

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİVO NÖROBLASTOM TÜMÖR  
MODELİNDE SİSPLATİN VE LİPOPLATİNİN  
SİTOTOKSİK, NEFROTOKSİK VE OTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

HANDE EVİN

**TEMEL ONKOLOJİ**  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İZMİR-2019**

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970126

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİVO NÖROBLASTOM TÜMÖR  
MODELİNDE SİSPLATİN VE LİPOPLATİNİN  
SİTOTOKSİK, NEFROTOKSİK VE OTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TEMEL ONKOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HANDE EVİN

Danışman Öğretim Üyesi: Dr. Öğr. Üye. Yüksel OLGUN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970

## İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET.....	1
İNGİLİZCE ÖZET.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
1.1. Problemin Tanımı.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı.....	3
1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri.....	4
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nöroblastoma Tanımı.....	5
2.2. Nöroblastom Epidemiyolojisi.....	7
2.3. Nöroblastom Etiyolojisi.....	7
2.4. Semptomlar.....	7
2.5. Nöroblastom Prognozu.....	10
2.6. Nöroblastom Tedavisi.....	11
2.6.1. Yüksek risk sınıfında olmayan nöroblastom tedavisi.....	11
2.6.2. Yüksek risk nöroblastom tedavisi.....	11
2.7. Nöroblastom Tedavilerinin Sağkalanlarda Ortaya Çıkan Geç Etkileri.....	13
2.8. Nöroblastomda Ototoksisite.....	15
2.9. Sisplatin Ototoksisitesine Yönelik Yaklaşımlar.....	15
2.10. Sisplatin ve Lipoplatinin Ototoksisite Açısından Değerlendirilmesi.....	17
2.11. Nude (çıplak) fare.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Araştırmanın Tipi.....	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	20
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	20

3.4.	Çalışma Materyali.....	23
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri.....	23
3.6.	Veri Toplama Araçları.....	23
3.7.	Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	30
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi.....	30
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	31
3.10.	Etik Kurul Onayı.....	31
4.	BULGULAR.....	32
4.1.	Tümör Dokularında TUNEL Yöntemi ile Tüm Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımı.....	32
4.2.	Tümör Dokularında TUNEL Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Bulgularının Kontrol ve Sisplatin Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	33
4.3.	Tümör Dokularında TUNEL Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Bulgularının Kontrol ve Lipoplatin Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	33
4.4.	Tümör Dokularında TUNEL Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Bulgularının Sisplatin ve Lipoplatin Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	34
4.5.	Spiral Ganglionda TUNEL Yöntemi ile Tüm Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımları.....	35
4.6.	Spiral Ganglionda TUNEL Yöntemi ile Kontrol ve CDDP Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması.....	35
4.7.	Spiral Ganglionda TUNEL Yöntemi ile Kontrol ve LİPO Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması.....	36
4.9.	Spiral Ganglionda TUNEL Yöntemi ile CDDP ve LİPO Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması.....	37
4.10.	Kokleada Tüm Gruplarda TUNEL Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımları.....	37
4.11.	Tüm Gruplarda Kokleada SOD2 ve INOS2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	39
4.12.	Tüm Gruplarda Kokleada COX2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	41
4.13.	CDDP ve LİPO Grupları Arasında Spiral Ganglionda SOD2, INOS2 ve COX2 Ekspresyonlarının Karşılaştırılması.....	42
4.14.	Tüm Gruplara Serum ve İdrar Kreatinin Değerleri Dağılımı ve İstatistiksel Karşılaştırılması.....	43
4.15.	Tüm Gruplarda İşitsel Değerlendirme Sonuçları ve İstatistiksel Karşılaştırılması.....	44
5.	TARTIŞMA.....	47

6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR.....	51
8.	EKLER.....	57



## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1. Nöroblastom semptomları.....	8
Tablo 2. Nöroblastomda prognostik faktörler ve özellikler.....	10
Tablo 3. Nöroblastoma yönelik tedaviler ve neden oldukları potansiyel geç etkiler.....	14
Tablo 4. Gruplara uygulanan işlemlerin zamansal çizelgesi.....	19
Tablo 5. İUBP testlerinde kullanılan kayıt ve uyarıcı parametreleri.....	23
Tablo 6. . Araştırma planı ve takvim.....	26
Tablo 7. Tüm gruplarda apoptoz ve nekroz düzeylerinin dağılımları.....	28
Tablo 8. Kontrol ve sisplatin gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması.....	29
Tablo 9. Kontrol ve lipoplatin gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması.....	30
Tablo 10. Kontrol ve lipoplatin gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması.....	30
Tablo 11. Tüm gruplarda spiral ganglionda apoptoz ve nekroz yüzdelerinin dağılımları.....	31
Tablo 12. Spiral ganglionda kontrol ve sisplatin gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 13. Spiral ganglionda kontrol ve lipoplatin gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 14. Spiral ganglionda sisplatin ve lipoplatin gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo 15. Tüm gruplarda kokleada apoptoz ve nekroz yüzdelerinin dağılımları.....	34
Tablo 16. Tüm gruplarda kokleada SOD2 ve İNOS2 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	36
Tablo 17. Tüm Gruplarda Kokleada COX2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	38
Tablo 18. Spiral ganglionda sisplatin ve lipoplatin gruplarında SOD2, İNOS2 ve COX2 yüzdelerinin karşılaştırılması.....	38
Tablo 19. Tüm gruplardaki serum kreatinin ve idrar kreatinin değerleri.....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1. Nöral krest orjinli olan hücreler.....	5
Şekil 2. Nöroblastom tümör kitlesi ile spinal kord kompresyonunun spinal MR görüntüsü.....	9
Şekil 3. Nude (çıplak) fare.....	17
Şekil 4. Hücre kültürü (a) ve üretilen C1300 hücrelerinin ışık mikroskopisi (b).....	22
Şekil 5. C1300 hücrelerinin kazınması (a), nude fareye enjeksiyonu (b) ve nude farede tümör oluşumu (c).....	23
Şekil 6. Nude fareye işitsel uyarılmış beyinsapı potansiyel testinin uygulanması.....	25
Şekil 7. LİPO verilmiş hayvanda kokleada TUNEL ile elde edilen görüntü.....	37
Şekil 8. LİPO verilmiş hayvanda immünohistokimyasal olarak COX2, İNOS2 ve SOD2 boyama görüntüsü.....	38
Şekil 9. Kontrol ve CDDP gruplarındaki idrar kreatinin değerlerinin istatistiksel anlamlı fark görülen dağılımları.....	42
Şekil 10. Tüm grupların bazal İUBP sonuçları.....	43
Şekil 11. Tüm grupların serum fizyolojik, CDDP ve LİPO uygulanmasından 72 saat sonraki İUBP sonuçları.....	43

## KISALTMALAR

ASCT: Otolog Kök Hücre Nakli

CCSS: Kuzey Amerika Çocukluk Çağı Kanseri Sağkalım Çalışması

CDDP:Sisplatin

CHS: Merkezi Hipoventilasyon Sendromu

COG: Çocuk Onkoloji Grubu

DEÜTFDHAD: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı

DIC: Yaygın İntravasküler Koagülasyon

DPOAE: Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Testi

EFS: Olaysız Sağkalım

HR: Yüksek Risk

I-131 MIBG: İyodin-131-meta-iodobenzilguanidin

INPC: Uluslararası Nöroblastoma Patolojisi Sınıflandırması

İP: İntraperitoneal

IR: Orta risk

İUBP: İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri Testi

LIPO: Lipoplatin

OMA: Opsoklonus-Miyoklonus-Ataksi

OS: Mevcut Genel Sağkalım Oranları

PEG: Polietilen Glikol

SF: Serum Fizyolojik

VIP: Vazoaktif İntestinal Peptidin

VIP: Zor tedavi Edilen Diyare



## TEŞEKKÜR

*Yüksek Lisans eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren tez danışmanım Prof.Dr. Safiye AKTAŞ ve Dr.Öğr.Üye. Yüksel OLGUN'a,*

*Akademik gelişimime büyük katkıları olan, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. H. Nur OLGUN'a, Prof. Dr. Günay Kırkım'a*

*Tezimin her aşamasında destek olan Prof. Dr. Zekiye S. ALTUN'a, Prof. Dr. Osman YILMAZ'a, Dr. H. Efsun KOLATAN'a,*

*Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez dönemimdeki katkı ve yardımları için Ayşe Pınar Erçetin, Efe Serinan ve Melek Aydın'a,*

*Son olarak yaşamımın, karakterimin yön bulmasında sonsuz emek ve sabırları için sevgili aileme sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.*

# İN VİVO NÖROBLASTOM TÜRÖR MODELİNDE SİSPLATİN VE LİPOPLATİNİN SİTOTOKSİK, NEFROTOKSİK VE OTOTOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hande EVİN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İnciraltı, İZMİR

## ÖZET

**Amaç:** Bu araştırmada subkutan ksenograft nude fare nöroblastom tümör modelinde lipoplatin (LİPO) uygulamasının sisplatin (CDDP) uygulamasına göre sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Deneysel olarak planlanan bu çalışmada 20 gr olan, 5-6 haftalık 21 adet erkek nude fareye subkutan yolla C1300 nöroblastom hücreleri verilmiştir. Tümör oluşup 150 mm<sup>3</sup> çapa eriştiğinde intraperitoneal yolla kontrol grubuna 20mg/ kg serum fizyolojik, CDDP 20 mg/kg ve LİPO 20 mg/kg verilmiştir. Ajanlar verilmeden önce (bazal) ve sonra (72. saat) işitsel fonksiyon testleri yapılmıştır. 72 saat sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek tümör ve koklea çıkarılmıştır. İdrar örneklerinde kreatinin değerlendirilmiştir. Parafine gömülen doku örneklerinde TUNEL ile apoptoz ve nekroz, immünohistokimya ile de COX2, SOD2 ve INOS anti-oksidan ve anti-inflamatuar ilişkili protein düzeyleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler gruplar arasında SPSS 22.0 versiyonu ile karşılaştırılmıştır. P değeri 0,05 'den küçük ise anlamlı kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Tümörde apoptoz ve nekroz oranları LİPO grubunda CDDP'ye göre daha fazladır (p=0,035 ve p=0,010). Spiral ganglionda apoptoz ve nekroz LİPO grubunda, CDDP'ye göre daha düşüktür (p=0,002 ve p=0,002). Kokleada LİPO ve kontrol grubunda pozitif COX2 paterni mevcut iken CDDP'de negatiftir (p=0,001). SOD2 ve INOS2 gruplar arası fark göstermemiştir (p>0,05). İşitsel fonksiyonlar bazal değerlerde benzer olup, LİPO grubunda CDDP'ye göre kısmen daha iyi işitme eşiklerine sahiptir.

**Sonuç:** Nöroblastom tedavisinde, CDDP'nin doz sınırlayıcı yan etkilerini gidermek üzere LİPO kullanımı yararlı gözükmektedir. Ayrıca LİPO, aynı dozda CDDP 'den daha yüksek anti-tümör etkiye sahiptir. İlerleyen çalışmalarda LİPO'nun bu üstün özelliklerinin mekanizmasının tümör mikroçevresi dahilinde de değerlendirilmesi önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nöroblastom, Lipoplatin, Sisplatin, Ototoksisite, Sitotoksisite

# COMPARISON OF THE CYTOTOXIC, NEPHROTOXIC AND OTOTOXIC EFFECTS OF CISPLATIN AND LIPOPLATIN IN IN VIVO NEUROBLASTOMA TUMOR MODEL

Hande EVIN, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, İnciraltı, İZMİR

## ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study was to compare the cytotoxic, cytostatic, ototoxic and nephrotoxic effects of lipoplatin (LIPO) administration according to cisplatin (CDDP) application in the subcutaneous xenograft nude mouse neuroblastoma tumor model.

**Method:** In this experimentally planned study, C1300 neuroblastoma cells were given subcutaneously to 21 male nude mice, weighted 20 gram. When the tumor reached 150 mm<sup>3</sup> diameter, 20 mg / kg of saline to the control group, 20 mg / kg of cisplatin and 20 mg / kg of LIPO were given intraperitoneally. The auditory function tests were performed before the agents were given (basal) and after 72 hours of administration. At 72nd hours, the animals were sacrificed and the tumor and cochlea were removed. Creatinine was evaluated in urine samples. In paraffin-embedded tissue samples, apoptosis and necrosis (TUNEL) and anti-oxidant and anti-inflammatory related protein levels (COX2, SOD2 and INOS) were determined by immunohistochemistry. The data were compared between the groups with SPSS 22.0 version. P value less than 0.05 is considered significant.

**Results:** Apoptosis and necrosis rates were higher in the LIPO group than in CDDP ( $p = 0.035$  and  $p = 0.010$ ). In the spiral ganglion, apoptosis and necrosis were lower in the LIPO group than in CDDP ( $p = 0.002$  and  $p = 0.002$ ). COX2 pattern in the cochlea was positive in both control and LIPO group and negative in CDDP ( $p = 0.001$ ). SOD2 and INOS2 showed no difference between groups ( $p > 0.05$ ). The auditory functions are similar in baseline values and have a better threshold value in the LIPO group than CDDP.

**Conclusion:** In the treatment of neuroblastoma, the use of LIPO seems to be beneficial to eliminate the dose-limiting side effects of CDDP. In addition, LIPO has a higher anti-tumor effect than CDDP. In further studies, it is recommended that the mechanism of these superior properties of LIPO should be evaluated within the tumor microenvironment.

**Keywords:** Neuroblastoma, Lipoplatin, Cisplatin, Ototoxicity, Cytotoxicity

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. Problemin Tanımı

Nöroblastom primordial nöral krest hücrelerinden gelişen, en sık görülen ekstrakraniyal yerleşimli solid bir tümördür ve tüm pediatrik onkoloji alanındaki ölümlerin %15'ini oluşturur (Yiallourous, 2013). Klinik olarak geniş bir spektruma; spontan regresyondan ölümle sonuçlanan hızlı bir progresyona sahiptir. Nöroblastomda tümör dokusundaki birçok sitogenetik ve moleküler genetik değişikliğin prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir. Örneğin; “near triploidi” iyi prognozla ilişkiliyken, MYCN onkogen amplifikasyonu diploidi kötü prognozu işaret etmektedir. “17q dengesiz translokasyonu (17q+)”, “1p veya 11q allelik kaybı” daha agresif tümör özellikleri ve kötü prognozla ilişkilidir (Zhijie ve ark, 2010).

CDDP, nöroblastom başta olmak üzere erişkin ve çocukluk çağı birçok neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ajandır. Bununla birlikte nefrotoksisite, ototoksisite, miyelotoksisite, periferik nörotoksisite gibi doz kısıtlayıcı ciddi yan etkileri mevcuttur (Alam ve ark, 2000). CDDP'nin ototoksik mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber kokleada dış tüy hücrelerini bazaldan apikale doğru reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve mitokondrinin oksidatif hasarı yoluyla progresif olarak hasar vererek etkisini gösterir (Rybak ve ark, 2000). CDDP'nin doz kısıtlayıcı yan etkilerini gidermek için tümörde sitotoksik etki gösterirken normal dokulara zarar vermeyeceği uygun formülasyonlarına ihtiyaç vardır. LİPO polietilen glikol (PEG) kaplamalı, küçük, tek lamelli veziküllerin içerisindeki bir lipozomal sisplatin formülasyonudur. Lipozomal sisplatin olup 110 nanometre çapta bir nanopartiküldür ve lipid ile sisplatinde oluşur. Literatürde LİPO'nun CDDP'ye göre nefrotoksisitesinin daha az olduğuna dair iki araştırma bulunmasına rağmen, ototoksik etkilerinin araştırıldığı in vivo herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Rybak ve ark, 2000; Aydemir ve Ayşe, 2011).

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada subkutan ksenograft nude fare nöroblastom tümör modelinde LİPO uygulamasının CDDP uygulamasına göre sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### 1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri

Bu araştırmanın ana hipotezi, LİPO uygulamasının sonucunda CDDP'nin sağlıklı dokularda neden olduğu sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin daha az olacağı şeklinde-dir. Buna dayanarak araştırmada řu soruların yanıtları aranmıştır:

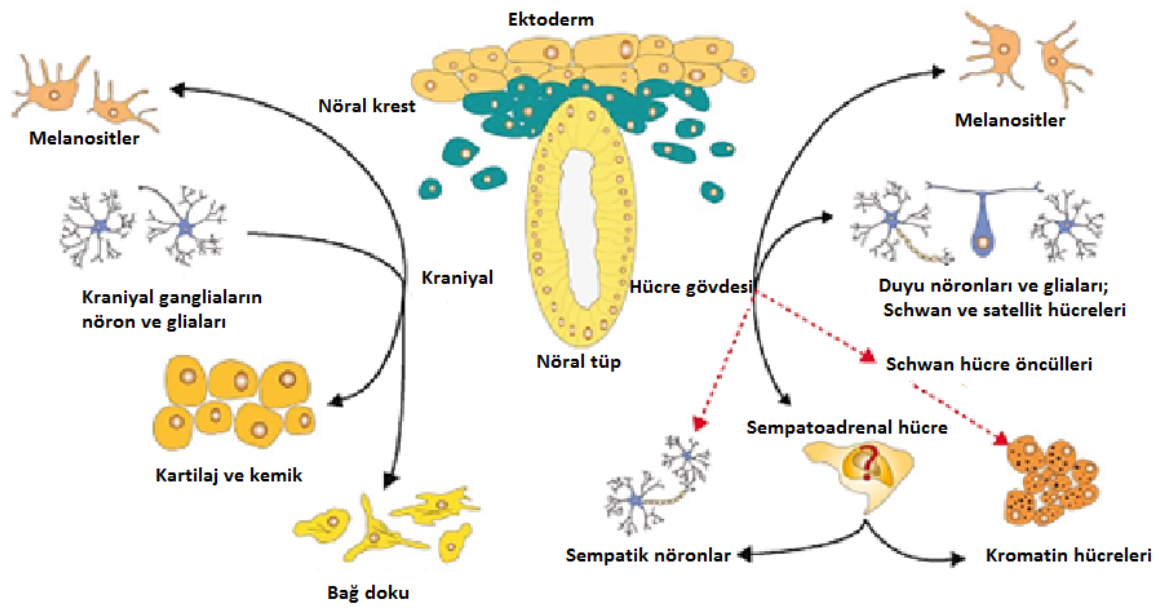
1. Tümöre karşı LİPO'nun apoptoz ve nekroz üzerindeki etkisi CDDP ile farklı mıdır?
2. Koklea ve spiral ganglion dokusundaki apoptoz ve nekroz oranları LİPO ile CDDP uygulanmasına göre farklı mıdır?
3. LİPO ve CDDP uygulanması kokleada COX2, INOS2 ve SOD2 ekspresyonu açısından fark gösterir mi?
4. LİPO ve CDDP uygulanması spiral ganglionda COX2, INOS2 ve SOD2 ekspresyonu açısından fark gösterir mi?



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nöroblastom Tanımı

Nöroblastom, primordiyal nöral krest hücrelerinden türetilmiş bir çocuk tümörü olup, çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Normal koşullar altında, nöral krest hücresi öncülleri dorsal nöral tüpten göç eder ve uygun yerlerine sempatik sinir sisteminin dokularına ve organlarına ulaştıklarında farklılaşır, fakat bazı durumlarda nöral krest hücre göçü, olgunlaşması veya farklılaşmasındaki bozukluklar nöroblastomun gelişmesine yol açabilir (Maris ve ark, 2007). Nöral krest orijinli hücre çeşitleri şekil 1 'de yer almaktadır.



Şekil 1. Nöral krest orijinli olan hücreler (Maris ve ark, 2007)

Nöroblastomun ilginç özelliklerinden biri tümörlerinin benzersiz klinik ve biyolojik heterojenliğidir. Bazı çocuklarda tamamen gerileyen veya tedavi edilmeden spontan olarak farklılaşan tümörler bulunurken, diğer çocuklarda agresif multimodal tedaviye rağmen kötü sonuçları olan yaygın metastatik tümörler vardır (Whittle ve ark, 2017). Klinik ve laboratuvar araştırmaları, nöroblastomun biyolojisinin anlaşılmasını sağlamış ve nöroblastom risk sınıflandırması, uygun hasta alt kümelerinde kullanım için terapiler geliştirmek üzere klinik ve biyolojik prognostik faktörlerin kullanımı için bir paradigma olarak önem taşımaktadır. Nöroblastomun anlamlı heterojenliği araştırmacıları etkilemiştir ve onlarca yıl süren araştırma çabaları sonucunda hedeflenebilen yeni hücresel yolların yanı sıra, prognoz için yeni

biyobelirteçler tanımlanmıştır. Günümüze kadar tanımlanmış olan prognostik faktörler, hastanın tanı yaşı ve tümör evresi gibi klinik faktörlerin yanı sıra MYCN onkojenin amplifikasyonu varlığında veya yokluğunda tümörün kendisinin biyolojik özelliklerini içermektedir (Stine ve ark, 2015; Huang ve Weiss, 2013). Büyük gruplar arasındaki hastalık riski sınıflandırma şemalarındaki farklılıkların ele alınması ile, dünya çapında tanı konmuş ve tedavi edilen hastaların daha tutarlı evrelendirilmesi için cerrahi öncesi risk faktörlerini içeren yeni, daha düzgün bir evreleme sistemini barındıran yeni bir uluslararası sınıflandırma sistemi benimsenmiştir. Seçilen klinik, patolojik ve genetik faktörleri kullanarak, hastalar tedavi için risk gruplarına ayrılabilir (Whittle ve ark, 2017). Yüksek riskli olmayan nöroblastom hastaları için mevcut genel sağkalım oranları (OS), sınırlı tedavi ile % 90'dan fazladır ve düşük ve orta riskli nöroblastomlu hastalarda tedavi rejimleri, terapötik yoğunluğu daha da azaltmak ve ilişkili toksisiteyi azaltmak için tasarlanmıştır. (Araçawa ve ark, 2014). Bununla birlikte, yüksek riskli nöroblastomlu hastalarda uzun süreli sağkalım oranları, agresif, multimodal tedaviye nöroblastom tümör hücreleri üzerindeki GD2 antijenine karşı antikorlarla immünoterapinin dahil edilmesine rağmen, günümüzde % 50'den azdır. Yeni prognostik faktörleri ve terapötik hedefleri tanımlamaya yönelik devam eden araştırmalar, bu hastalar için geliştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açacaktır (Yu ve ark, 2010).

## **2.2. Nöroblastom Epidemiyolojisi**

Tahmin edilen nöroblastom insidansı, Kuzey Amerika ve Avrupa'da 15 yaşın altındaki milyon çocuk başına 10,5 vaka olup, en az düzeyde etnik veya coğrafi değişkenlik göstermektedir (Irwin ve Park, 2015). Nöroblastom tüm pediatrik kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturur ve çocuklarda kanser nedenli ölümlerin % 15'inden sorumludur. Nöroblastom ağırlıklı olarak küçük çocuklarda görülen bir kanserdir, Bunun nedeni nöroblastomlu çocukların çoğunluğunun 5 yaşından önce teşhis edilmesidir. 19-aylık tanıları olan hastaların medyan yaşı daha yüksektir. Nöroblastom aynı zamanda bebeklerde biraz daha fazla görülmektedir. Genellikle erkeklerde kızlardan daha fazladır. Bu farklılıkların etiyolojileri belirsiz olmasına rağmen, Afrikalı Amerikalı ve Amerikan yerlilerinin daha düşük oranda sağkalım oranlarıyla daha agresif hastalıklara sahip olma olasılığı daha yüksektir (Henderson ve ark, 2011). Üriner katekolamin düzeylerinin değerlendirilmesi yoluyla yapılan büyük ölçekli ulusal tarama çalışmaları, daha fazla sayıda çocukta nöroblastom tanısı yapılmasına yol açmıştır. Saptanan bu tümörlerin çoğu düşük riskli, iyi klinik ve biyolojik özelliklere sahip bulunmuştur (Hiyama ve ark, 2008; Schilling ve ark, 2002; Woods ve ark, 2002; Yamamoto ve ark, 2002). Asemptomatik infantların tarandığı birçok çalışma sonucunda, genellikle ileri yaşta ortaya

çıkan progresif hastalık tespit edilmemiştir. Bununla beraber tarama ile düşük-riskli hastalığın erken tespitinin hastalığın daha agresif ve yüksek-riskli forma ilerlemesini önlemediği görülmüştür (Maris ve Woods, 2008).

### **2.3. Nöroblastom Etiyolojisi**

Çoğu nöroblastom tümörünün altta yatan etiyolojisi bilinmemektedir ve olası nedenler olarak çevresel faktörler öne sürülmekle birlikte, doğrudan bağlantı tespit edilmemiştir (Cook ve ark, 2004; Menegaux ve ark, 2004). Nöroblastom tümörlerinin büyük çoğunluğu ailelerde izole olarak ortaya çıkar, bu da nöroblastomlu hastalarda onkojenik germline mutasyonlarının oranlarının düşük olduğunu düşündürmektedir. Tüm nöroblastom vakalarının yaklaşık % 1-2 'sinde, pozitif bir aile öyküsü bulunmakta ve otozomal dominant kalıtımla birlikte eksik penetrans mevcuttur (Shojaei-Brosseau ve ark, 2004). Ailesel nöroblastom vakaları sıklıkla multifokal veya bilateral adrenal primer tümörlerle bulunur ve 9 aylık bir medyanda teşhis edilir. Nöroblastom, Hirschsprung hastalığı ve merkezi hipoventilasyon sendromu (CHS) gibi nörokristopatili hastalarda da ortaya çıkmaktadır. Ancak bu ilişkilerin altta yatan nedenleri açık olmasa da, bazı ailesel nöroblastom vakalarında Hirschsprung hastalığı ve merkezi hipoventilasyon ile ilişkili PHOX2B genindeki mutasyonlar da tespit edilmiştir (Trochet ve ark, 2004; Rohrer ve ark, 2002; Morse ve ark, 2004). Ayrıca, nörofibromatozisli hastalarda bildirilen birkaç nöroblastom olgusu olmasına rağmen, nöroblastomun etiyolojisinde germline NF1 mutasyonlarının rolü belirsizliğini korumaktadır.

### **2.4. Semptomlar**

Nöroblastomlu çocuklarda ortaya çıkan semptomlar, tümörlerin sayısına ve yerlerine göre değişmekte hem lokal hem de sistemik semptomları içermektedir (Tablo 1). Hastaların yaklaşık yarısı lokalize veya bölgesel hastalığa sahiptir, geri kalanı ise uzak metastaza sahiptir. En yaygın metastaz görülen yerler kemikler, kemik iliği ve karaciğerdir.



**Tablo 1.** Nöroblastom semptomları

---

<b>Asemptomatik kitle</b>	Boyun Toraks Abdomen/ pelvis
<b>Homer sendromu</b>	
<b>Spinal kord ve kompresyon</b>	Sırt ağrısı, güçsüzlük
<b>Kemik ağrısı</b>	Topallama Yürümekten kaçınma
<b>“Böğürtlenli kek” deri lezyonları</b>	
<b>Sistemik semptomlar</b>	Kilo kaybı İrritabilite Ateş Hipertansiyon Zor tedavi edilen diyare (VIP)
<b>Opsoclonus / Myoclonus / Ataxia Sendromu</b>	
<b>Sitopeni</b>	Anemi- solgunluk, yorgunluk Trombositopeni- morarma, kanama
<b>Yaygın intravasküler koagülasyon (DIC)</b>	
<b>Tümör lizis sendromu</b>	

---

Çoğu nöroblastom tümörü abdomende ortaya çıkar ve nöroblastom için en yaygın primer bölge adrenal bezdir. Abdominal kitleler asemptomatik olabilir veya abdominal organlarda lokal etkilerden hipertansiyon, abdominal ağrı, distansiyon veya kabızlık ile sonuçlanabilmektedir. Nöroblastomlu hastaların yaklaşık % 10-15'inde epidural veya intradural

boşluğa, omurilik kompresyonuna ve paraplejiye yol açabilen tümör uzantısı görülmektedir (De Bernardi ve ark, 2005) (Şekil 2).



**Şekil 2.** Nöroblastom tümör kitlesi ile spinal kord kompresyonunun spinal MR görüntüsü. Sagittal T2-ağırlıklı görüntüde ok ile tümör kitlesi gösterilmektedir.

Nöroblastom sıklıkla orbital kemiklere yayılır, bu da nöroblastomun karakteristiği olan periorbital ekimozlar (rakun gözleri) ve bunun yanı sıra protoz ve nihai görme bozukluğu ile sonuçlanır. Servikal veya torakal bölgelerden köken alan tümörler, infantlarda daha sık görülür ve Horner sendromu (tek taraflı pitoz, anhidrozis ve miyoz) ve solunumsal semptomlarla ilişkili olabilir.

Nöroblastom ile ilişkili ek paraneoplastik sendromlar arasında refrakter sekretuar diyare ve opsoklonus-miyoklonus-ataksi (OMA) sendromuna yol açan vazoaktif intestinal peptidin (VIP) fazla üretimi yer alır (Scheibel ve ark, 1982). OMA sendromu, nöroblastomlu çocukların yaklaşık % 2-3 'ünde görülür ve sıklıkla iyi diferansiye ve düşük riskli tümörlerin ortaya çıkmasında görülür (Matthay ve ark, 2005; Gorman, 2010). OMA semptomları genellikle immün aracılı olarak hissedilmekte ve OMA 'lı çocuklar bazen ataksi ile ilişkili miyoklonik sarsıntılardan ve rastgele göz hareketlerinden muzdariptir. OMA sendromu semptomları genellikle rezeksiyon sonrası devam etmekte ve ayrıca dramatik uzun süreli motor bozulma, konuşma- dil gecikmesi ve anlamlı bilişsel işlev bozukluğu ile ilişkili olabilmektedir (De Grandis ve ark, 2009; Catsman-Berrevoets ve ark, 2009).

## 2.5. Nöroblastom Prognozu

Nöroblastom tümörlerinin biyolojik ve klinik heterojenliğine göre hasta sonuçları ile ilişkili çeşitli prognostik özellikler tanımlanmıştır. Nöroblastomlu çocuklar için tedavi stratejileri, tedaviye ve 40 yıldan uzun süredir relaps riskine göre öngörülen yanıtı göre uyarlanmıştır (Zage, Louis ve Cohn, 2012). Bu prognostik faktörler, tümör evresi, hastanın tanı yaşı, tümörün histolojisi ve DNA ploidi gibi biyolojik özelliklerin yanı sıra, MYCN onkogen amplifikasyonu ve kilit kromozomal delesyon veya kazançlar dahil olmak üzere sitogenetik faktörler ve serum tümör belirteçleri gibi klinik faktörler yer almaktadır (Tablo 2)

**Tablo 2.** Nöroblastomda prognostik faktörler ve özellikler

	İyi prognoz	Kötü prognoz
<b>Klinik faktörler</b>		
Evre	1, 2, 45	3, 4
Tanı yaşı	<547 gün	>547 gün
<b>Biyolojik tümör özellikleri</b>		
Shimada histolojisi	İyi	Kötü
Ganglionöroblastom	İntermikst	Nodüler
DNA indeksi	Hiperdiploid, near triploid	Near diploid, near triploid
Vaskülarite	Düşük	Yüksek
<b>Sitogenetik</b>		
MYCN onkogeni	Amplifiye olmayan	Amplifiye (>10 kopya)
1p36 kromozomu	Normal	Delesyon/ LOH
11q kromozomu	Normal	Delesyon/ LOH
17 -q kromozomu	Normal	Kazanç
<b>Serum tümör belirteçleri</b>		
Ferritin	Düşük	Yüksek
LDH	Düşük	Yüksek
NSE	Düşük	Yüksek
<b>Diğer belirteçler</b>		
Kaspaz 8	Eksprese	Süprese (Metilasyon)
RASSF1A	Eksprese	Süprese (Metilasyon)
Trk A	Yüksek	Düşük
Trk B		Yüksek
CD44	Yüksek	Düşük
MRP	Düşük	Yüksek

Bilinen klinik ve biyolojik prognostik faktörler kullanarak, nöroblastomlu hastalar üç risk grubundan biri olarak sınıflandırılabilir: düşük risk, orta risk (IR) ve yüksek risk (HR).

Çocuk Onkoloji Grubu'nun (COG) risk sınıflaması için yakın zamanda kullandığı faktörler; tanı sırasında hasta yaşı, tümör evresi, Uluslararası Nöroblastom Patolojisi Sınıflandırması (INPC) sistemi ile tümör histopatolojisini, DNA indeksi (ploidi) ve MYCN amplifikasyonu varlığı/yokluğunu içermektedir (Shimada ve ark, 1999; Peuchmaur ve ark, 2003; Navarro ve ark, 2006). Nöroblastomlu birçok çocuk için, bu risk sınıflandırması ve sonraki tedavi tespiti başarılı olmuştur. Düşük ve orta riskli nöroblastom olan çocukların sonuçları yaklaşık % 90 uzun süreli olaysız sağkalım oranları ile mükemmel düzeydedir.

## **2.6. Nöroblastom Tedavisi**

### **2.6.1. Yüksek risk sınıfında olmayan nöroblastom tedavisi**

Yüksek riskli olmayan nöroblastom, düşük ve orta riskli hastalığı olan ve yeni tanı konmuş hastaların yarısından biraz daha fazlasını temsil eden heterojen bir gruptur. Grup, MYCN amplifiye olmayan lokalize tümörleri olan metastatik hastalıklı infantları içermektedir. Sonuçlar, bu çocuklar için genellikle tek başına gözlem, cerrahi rezeksiyon veya cerrahi rezeksiyonlu orta dereceli kemoterapi gibi değişken tedavi stratejileri ile mükemmeldir (Baker ve ark, 2010; Strother ve ark, 2012).

Orta riskli nöroblastom tedavisi, orta dozda çok-ajanlı kemoterapi ve cerrahi rezeksiyondan oluşur. Klinik ve genetik verileri kullanarak, son çalışmalar bu hastalar için tedavi girişimini azaltmış ve sonucunda başarılı bir sağkalım elde edilmiştir. Bu çalışmalarda risk sınıflandırması sadece hastanın yaşı ve tümör evresine değil aynı zamanda DNA içeriği, segmental kromozomal aberasyonlar ve histolojik özellikler de dahil olmak üzere tümörün biyolojik özelliklerine dayanılarak yapılmıştır.

Genel olarak, son yıllarda düşük veya orta riskli nöroblastom olan hastalar için tedavi sonuçları, tedavide önemli azalmaya rağmen mükemmel kalmaya devam etmektedir. Bu grubun bazı alt kümelerinde kemoterapi maruziyetini ve cerrahi morbiditeyi daha da azaltma çabaları devam etmektedir.

### **2.6.2. Yüksek risk nöroblastom tedavisi**

Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar, nöroblastom tanısı alan hastaların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Yıllar boyunca yüksek riskli nöroblastomlu hastalara yönelik çeşitli tedavi stratejilerine rağmen, iyi yanıt elde edilememektedir. Sonuç olarak, bu grup tedavi edilmesi en zor olanlardan biri olmaya devam etmektedir. Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar için uzun süreli sağkalım oranları büyük kooperatif grup çalışmalarında % 40-50 civarındadır (Kreissman ve ark, 2013; Yanik ve ark, 2013). Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar için

kullanılan tedavi rejimleri son on yılda gelişme göstermesine rağmen, standart rejimler 4 ana bileşene sahip olmaya devam etmektedir:

(1) **İndüksiyon kemoterapisi:** Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar, nöroblastom tanısı alan hastaların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Tedavi stratejisinde çeşitli değişikliklere rağmen “İndüksiyon” yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar için kritik öneme sahiptir ve önemli bir prognostik belirteçtir. Halihazırda kullanımda olan spesifik indüksiyon rejimleri farklı kooperatif grupları arasında farklılık göstermektedir. Yüksek riskli nöroblastoma yönelik halihazırda kullanılan indüksiyon rejimleri, antrasiklinler, platin içeren bileşikler, alkilleyici ajanlar ve topoizomera II inhibitörlerinin bir kombinasyonunu içermektedir (Yanik ve ark, 2013).

(2) **Lokal Kontrol:** Lokal kontrol, hastalığın nüksetmesini önlemek için yüksek riskli nöroblastom tedavisinin kritik bir bileşenidir. Lokal kontrol tedavi modaliteleri, genellikle 4–6 kür indüksiyon terapisi döngüsünden sonra cerrahi rezeksiyonu ve primer bölgeye ve aktif, rezidüel hastalığın diğer bölgelerine harici ışın radyasyonunu içermektedir. Cerrahi rezeksiyona ek olarak, nöroblastom tümörlerinin mükemmel radyo-duyarlılığı göz önüne alındığında, lokal kontrolün bir başka önemli bileşeni radyoterapidir (Yanik ve ark, 2013).

(3) **Konsolidasyon tedavisi:** Çoğu nöroblastom tedavi rejiminde konsolidasyon tedavisi, miyeloablatif kemoterapi ve otolog kök hücre naklini (ASCT) içermektedir. Yüksek riskli nöroblastom tedavi rejimlerinde ASCT ile miyeloablatif tedavinin yararı bir dizi çalışmada kanıtlanmıştır ve 2015'ten itibaren yapılan bir meta-analiz, ASCT ile birlikte miyeloablatif tedavinin hastalar için kullanıldığı zaman, olaysız sağkalımda (EFS') istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme ortaya koymuştur (Yalcin, Kremer ve van Dalen, 2015).

(4) **İdame tedavisi:** Yüksek riskli nöroblastoma sahip hastalar tipik olarak, indüksiyon kemoterapisi, cerrahi rezeksiyon, ASCT ile myeloablatif tedavi ve radyasyon terapisi tamamlandıktan sonra tedavinin idame aşamasına girerler. Birçok hasta yukarıdaki multimodal yaklaşımla tam bir klinik remisyona erişirken, relaps hala yaygındır ve minimal rezidüel hastalığın nöroblastom nüksünde önemli bir faktör olduğunu düşünülmektedir. Yıllar geçtikçe, rezidüel hastalığı ortadan kaldırmak ve olaysız sağkalım oranlarını daha da iyileştirmek amacıyla birkaç konsolidasyon sonrası tedavi seçeneği üzerinde çalışılmıştır (Matthay ve ark, 2009).

Genel olarak, yüksek riskli nöroblastomlu hastalar için son birkaç yıl içinde immünterapinin tedavi rejimlerine dahil edilmesiyle sonuçlar iyileşmiştir. Son sonuçlar, yüksek

riskli nöroblastoma sahip hastalarda uzun süreli idame tedavisinin ilk remisyon şeklinde olduğunu göstermektedir. Moleküler hedefli tedaviler kullanılarak sonuçların iyileştirilmesine yönelik çabalar da devam etmekte olup, bilinen ALK mutasyonları olan hastalarda ALK inhibitörü crizotinib kullanan araştırmalar ve halen devam etmekte olan başlangıç tanısı tümör örneklerinin genomik analizinden belirlenen hedeflenmiş tedavilerden yararlanma çalışmalarına devam edilmektedir.

## **2.7. Nöroblastom Tedavilerinin Sağkalanlarda Ortaya Çıkan Geç Etkileri**

Bazı analizler, nöroblastom sağkalanlarında hastalık sürecinin geç etkilerin nitelendirilmesine özel olarak odaklanmıştır. Kuzey Amerika Çocukluk Çağı Kanser Sağkalım Çalışması (CCSS) dahilinde 1970 ve 1986 yılları arasında teşhis edilen 954 adet nöroblastom sağ kalanlarının 5-yıllık bir analizine göre, yaş ve cinsiyet uyumlu ABD popülasyonu kontrollerine kıyasla 8 kat daha yüksek mortalite ve ikinci malignite oranlarına sahip olduğunu bulunmuştur. En yaygın kronik tıbbi durumlar nörolojik, duyuşal, endokrin ve kas-iskelet sistemi ile ilgilidir.

Multimodalite terapiler ile tedavi edilen sağ kalanlar, sadece cerrahi ile tedavi edilen sağ kalanlara kıyasla, kronik bir sağlık durumu geliştirme olasılığı 2,2 kat daha fazladır. Bu hastaların çoğunun düşük veya orta riskli bir hastalığı olması ve potansiyel olarak çok fazla tedavi görmüş olmaları muhtemeldir. Yüksek riskli hastalığı olanlarda risk sınıflandırması ve terapinin yoğunlaştırılmasıyla birlikte, son analizler sağ kalanların bu alt kümesi arasındaki uzun süreli toksisitelere odaklanmıştır.

1970 ve 2001 yılları arasında multimodalite terapi ile tedavi edilen 63 ileri evre nöroblastom sağ kalanları içeren tek merkezli bir çalışmada, işitme kaybı (% 62), primer hipotiroidizm (% 24), over yetmezliği (kadınlarda % 41), kas iskelet sistemi anomalileri (% 19) ve pulmoner anomaliler (%19) olmak üzere, hayatta kalanların % 95'inde geç komplikasyonlar tespit edilmiştir (Laverdiere ve ark, 2014). Diğer raporlar da bu kohortla benzer şekilde geç etkilerin yüksek oranda görülmesini sağlamıştır; bunların çoğunluğu endokrin sistemi, ototoksiste veya sonraki maligniteler ile ilişkilidir (Laverdiere ve ark, 2005; Applebaum ve ark, 2015)

Bu komplikasyonların çoğu orta derecede şiddetli iken, Danimarka, Finlandiya, İzlanda ve İsveç'teki çocukluk kanseri hastalarında uzun süreli yatış riskine ilişkin yakın tarihli bir değerlendirmeye göre, nöroblastom hastalarının hayatta kalanlarının tüm tanı grupları arasında en yüksek risk altında olduğunu bulmuştur (De Fine Licht ve ark, 2017). Tablo 3'de nöroblastoma yönelik tedavileri ve potansiyel geç etkilerini özetlenmektedir.

**Tablo 3.** Nöroblastoma yönelik tedaviler ve neden oldukları potansiyel geç etkiler

<b>Potansiyel geç etki</b>	<b>Terapötik Yaklaşım ve Maruziyet</b>
Tiroid konksiyon bozukluğu	Boyun bölgesine radyasyon Tüm vücut radyoterapi İyodin-131-meta-iodobenzilguanidin (I-131 MIBG) Transplant öncesi yüksek doz alkilleyici ajan
Büyüme hormonu hasarı	Hipotalamik-pituitary eksene radyasyon ( $\geq 18$ Gy) Tüm vücut radyoterapi
Gonadların fonksiyon bozukluğu	Alkilleyici ajanlar CDDP Gonadlara radyasyon
İskelet displazisi	Omurga ya da uzun kemiklere radyasyon Cis-retinoik asit
Diabetes Mellitus	Abdominal radyasyon Tüm vücut radyoterapi
İşitme kaybı	CDDP Karboplatinin miyeloablatif dozları Ototoksik antibiyotik maruziyeti
Pulmoner fonksiyon bozukluğu	Busulfan Göğüs veya abdomen üstü radyasyon
Kardiyak fonksiyon bozukluğu	Antrasiklinler Göğüs veya abdomen üstü radyasyon
Renal fonksiyon bozukluğu	Nefrektomi Platin bazlı kemoterapi (CDDP, karboplatin) Böbreğin dahil olduğu radyasyon
Ardından gelişen maligniteler	Epipodofilotoksinler Alkilleyici ajanlar Antrasiklinler Radyoterapi

## 2.8. Nöroblastomda Ototoksisite

Nöroblastomun tedavisinde platin bazlı kemoterapinin geniş kullanımı göz önüne alındığında, özellikle yüksek riskli hastalık öyküsü olanlarda derin işitme kaybı yaygın bir sorundur (Trahair ve ark, 2007; Bertollini ve ark, 2004; Grewal ve ark, 2010; Knight, Kramer ve Neuwelt, 2005; Kushner ve ark, 2006; Li, Womer ve Silber, 2004; Parsons ve ark, 1998; Simon ve ark, 2002). Bu kohortta ototoksisite prevalansı yayınlanan raporlarda %13 ile %95 arasında değişmektedir; CDDP ve miyeloablatif karboplatin dozları ile kombinasyon halinde maruz kalma riski önemli ölçüde artmaktadır (Landier ve ark, 2014). Terapi sırasında ototoksik antibiyotiklere maruz kalmak, bu riski büyük ölçüde artırmaktadır. İşitme kaybı olan nöroblastom sağ kalanların öğrenme problemleri ve psikososyal yetersizlikler için artmış risk altında olduğu bulunmuştur. Bu kohortta eğitim ve psikososyal sonuçları optimize etmek için, nöroblastom mağdurlarının ototoksisite açısından taranması ve işitme hizmetleri ve işitme cihazlarına atıfta bulunularak, zamanında belirtilmesi gerekir. Yakın zamanda yayınlanan bir raporda, derin işitme kaybı olan nöroblastom mağdurlarının, koklear implantasyon için iyi bir aday olabileceği belirtilmiştir, bu da etkilenen bazı sağ kalanlar için tedavi edici bir seçenek olabilir (Ryu ve ark, 2015).

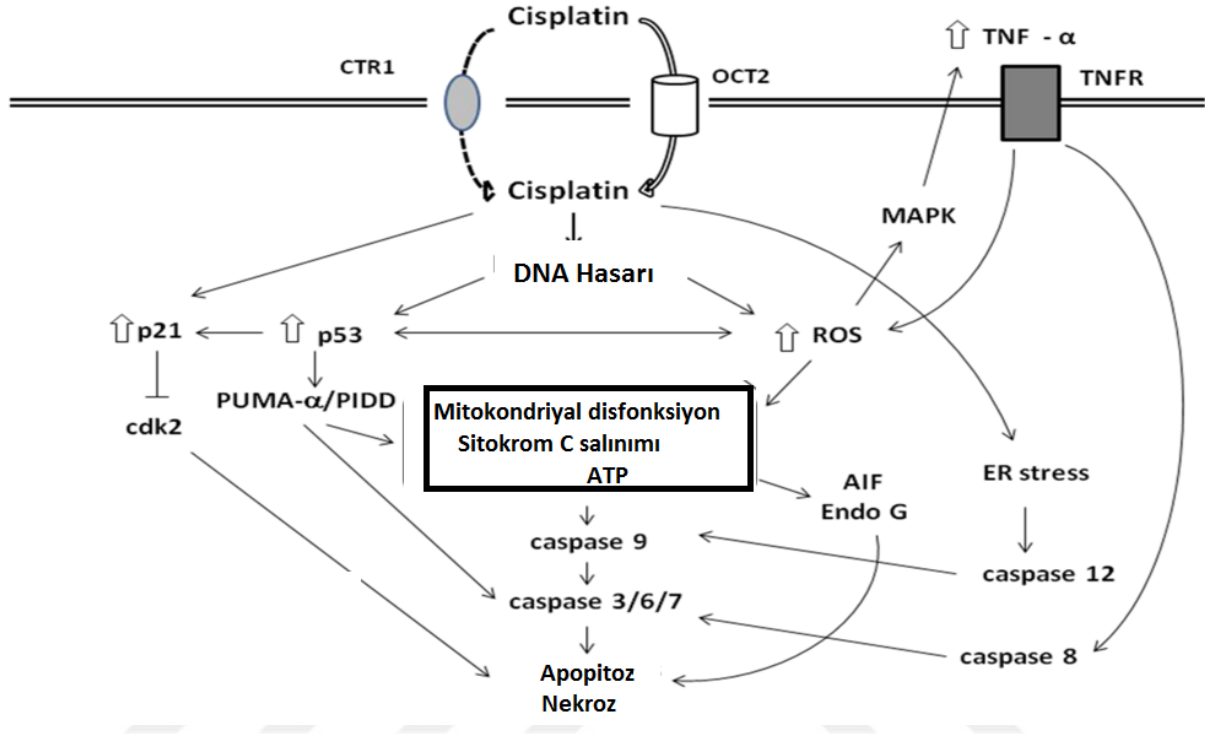
## 2.9. Sisplatin Ototoksisitesine Yönelik Yaklaşımlar

Sisplatin, nöroblastom başta olmak üzere erişkin ve çocukluk çağı çok çeşitli neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan hücre siklusundan bağımsız, platin bileşiklerinden antineoplastik bir ajandır. Bununla birlikte nefrotoksisite, ototoksisite, miyelotoksisite, periferik nörotoksisite gibi doz kısıtlayıcı ciddi yan etkileri mevcuttur.

Sisplatinin ototoksik mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber kokleada dış tüy hücrelerini bazaldan apikale doğru reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve mitokondrinin oksidatif hasarı yoluyla progresif olarak hasar vererek etkisini gösterir (Rybak ve ark, 2000). Ototoksisite sadece tüylü hücrelerle sınırlı değildir. Düşük doz sisplatin maruziyetinde ilk olarak sterosiliaların uç hasarı ortaya çıkmakta ve sonrasında sterosilia füzyonları görülmektedir. Sisplatin dozu arttırıldığında mitokondri ve endoplazmik retikulum hasarı, sterosilia ve tüy hücre kaybı gözlenmektedir. Yüksek doza maruz bırakıldığında ise stria vaskularis atrofisi, Reissner membranı kollapsı, corti organındaki destek hücre hasarı meydana gelir (Aydemir ve Ayşe, 2011). Sisplatinin hücre içerisindeki etkisi ilacın alım yoluna bağlıdır. İlk başlarda pasif difüzyon yoluyla hücre içine alındığı düşünülse de son zamanlarda yapılan araştırmalarda hücredeki transport membran proteinleri aracılığı ile alındığı düşünülmektedir.



(Örneğin bakır taşıyıcı CTR-1 ve CTR-2 platin bileşiklerinin hücre içine transportundan sorumlu proteinler olarak kabul edilmiştir ancak kesin mekanizması belirsizdir. Ayrıca, organik kation taşıyıcılarının (OCT'ler) sisplatinin taşınmasını kolaylaştırdığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle, pasif, aktif ve kolaylaştırılmış difüzyon mekanizmaları sisplatinin hücre içerisine alımında etkilidir (Kalkavan CŞ, 2009).



**Şekil 3.** Sisplatin maruz kalan hücrelerde gelişen apoptoz süreci için öne sürülen mekanizma (Ronald P, 2010).

Sisplatin indüklü işitme kaybını önlemek için yeni ajanları değerlendirmek, araştırma metodolojisi açısından zorluklarla doludur. Bunlar kemoterapinin antikanser etkilerine müdahale etmeyen ve hastalar için güvenli olan otoprotektif ajanları tanımlamayı içerir. Bu ajanların insan denemelerine dönüştürülmesini optimize eden uygun prelinik modelleri kullanmak; ve makul örnek büyüklükleri ile gerçekleştirilebilen pediatrik klinik çalışmaların tasarlanması gerekmektedir.

Sisplatinin antikanser aktivitesinin birincil mekanizması DNA replikasyonu ve onarımının bozulmasıdır (Martin, Hamilton ve Schilder, 2008; Dasari ve Rchounwou, 2014). Sisplatin indüklü işitme kaybı esas olarak mitokondriyal hasarı uyaran reaktif oksijen türlerinin oluşmasından ve koklear dış tüylü hücrelerinin apoptozisi kaynaklanır (Park, De Leon ve Devarajan, 2002; Bragado ve ark, 2007). Glutasyon gibi koruyucu endojen antioksidanların havuzları tükenmiştir. Sisplatin ayrıca iç kulağın stria vaskularisine ve onarıcı kök hücrelerine zarar verir gibi görünmektedir. Ototoxik ve otoprotektif ajanların destekleyici hücreler,

nöronlar ve merkezi işitsel yollar üzerindeki etkilerinin daha fazla tanımlanması, koklear tüylü hücrelerin kaybının ötesinde mekanizmaları açıklığa kavuşturmak ve hedefe yönelik müdahaleyi bilgilendirmek için gereklidir.

## **2.10. CDDP ve LİPO'nun Ototoksisite Açısından Değerlendirilmesi**

CDDP, çeşitli yetişkin ve pediatrik kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili bir kemoterapötik ajandır. Bununla birlikte, nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite dahil olmak üzere doz sınırlayıcı ciddi yan etkileri vardır. CDDP'nin birçok çalışmada ototoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bir nanomolekül olan 110 nM çapındaki LİPO, CDDP'nin lipozomal bir formülasyonudur ve lipidler ile CDDP'den oluşur. LİPO, CDDP'nin sistemik toksisitesini azaltmak için geliştirilmiştir Lipozomal platin, klinik koşullar altında en çok umut veren ilaç formülasyonudur. LİPO, CDDP'nin lipozom olarak kapsüllenmiş bir şeklidir. LİPO'nun CDDP'den daha düşük toksisiteye ve tümörde daha fazla ilaç birikimine sahip olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda CDDP'nin HEI-OC1 (*House inner ear organ of corti*) koklear hücrelerinde toksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Önceki in vitro ve in vivo araştırmalar LİPO'nun CDDP ile karşılaştırıldığında daha az nefrotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ilerlemiş gastrik kanser tedavisi için LİPO ile hemoradyoterapi, faz 1/2 çalışmasında hafif toksisite göstermiştir. Bir başka çalışmada LİPO tedavisinin klinik çalışmalarda akciğer ve meme kanseri tedavisinde CDDP'den daha az renal toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla beraber, LİPO, CDDP-duyarlı ve dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde anti-tümör etkisi göstermiştir. Bu tümör tipinde apoptoz, kaspazlar 3, 8 ve 9 aktivasyonu ile indüklenmiş, Bax upregulasyonu ve Bcl-2 downregulasyonu gerçekleşmiştir. LİPO, doksorubisin ve albumin-bağlı paklitaksel abraksan ile sinerjistik etki kombinasyonuna neden olmuştur. Ayrıca, LİPO, over ksenograft tümör büyümesini, minimum sistemik toksisite ile inhibe etmiştir. Başka bir in vitro çalışmada, LİPO'nun anti-tümör ve apoptotik etkisi, CDDP'den daha yüksek bir dozda nöroblastom hücrelerinde belirlenmiştir. LİPO 'nin, koklear hücrelerde anti-tümöral dozlarda CDDP'den daha az apoptotik hücre ölümüne neden olarak, CDDP'ye kıyasla koklear hücrelerde daha düşük bir toksisiteye neden olduğu düşünülmektedir. CDDP'ye karşı LİPO'nun ototoksik etki mekanizmasını anlamak için in-vivo karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır (Serinan ve ark, 2018; Altun ve ark, 2014).

## 2.11. Nude (Çıplak) Fare

Nude fareler Timus bezi olmadığı için T hücreleri üretemeyen, tüyleri olmayan ve anne sütü üretemeyen mutant immün yetmezliği olan farelerdir. İlk olarak, 1962 yılında Glasgow Ruchill Hastanesi Viroloji Laboratuvarı'nda Dr. N.R. Grist tarafından keşfedilmiştir. Normal türdeşlerinden daha büyük kulakları olan bir fare olarak tanımlanmıştır. Nude farelerin 11. kromozomunda kendiliğinden gelişen çekinik bir mutasyon vardır. Bu mutasyon farelerde timus bezini oluşturan epitel hücrelerinin gelişimini engellemekte ve T hücrelerinin olgunlaşmasını önlemektedir. Sızıntı halinde de olsa enfeksiyonlara yanıt olarak bir miktar T hücresi üretilebilirler.

Nude farelerin timus bezleri gelişmemiş olduğu için olgun T lenfositlerini üretemezler. Bu nedenle de aşağıda sıralanan bağışık yanıtlara ilişkin sorunları yaşarlar (Pantelouris et als. 1970, Schumann et als. 1998).

1. CD4+ yardımcı T lenfositleri olmadığı için patojene özgül antikor üretiminde sorun yaşarlar.
2. CD4+ ve/veya CD8+ T lenfositleri olmadığı için hücresel bağışık yanıtları veremezler.
3. CD4+ yardımcı T lenfositleri olmadığı için yüksek duyarlılıkta gecikmiş tipte bir bağışık yanıt oluturamazlar.
4. CD8+ sitotoksik T lenfositleri olmadığı için virusla enfekte olmuş dokuların ya da kanser hücrelerin yok edilmesinde sorun yaşarlar.
5. Hem CD4+ hem de CD8+ T lenfositleri olmadığı için doku nakline sessiz kalır ve nakledilmiş dokuyu red edemezler.

Bu özelliklerden ötürü nude fareler laboratuvarlarda lösemi, solid tümörler, AIDS ve cüzzam gibi hastalıklara verilen bağışık yanıtların anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.



**Şekil 3.** Nude (çıplak) fare

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi**

Subkutan ksenograft nude fare nöroblastom tümör modelinde LİPO uygulamasının CDDP uygulamasına göre sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlandığı bu çalışma deneysel çalışma olarak planlandı.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Bu araştırma ksenograft in vivo nöroblastom tümör modelinde CDDP ve LİPO'nun sitotoksik, nefrotoksik ve ototoksik etkilerini karşılaştırmak üzere planlandı.

Araştırmanın hücre kültürü bölümü, sakrifikasyon sonrası immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde, deneysel bölümü, odyolojik değerlendirmeler ve sakrifikasyon Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Araştırmaya Ekim 2016'da başlandı, Ocak 2019'da tez savunmasıyla sonlandı.

#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları**

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda üretilen nude farelerle deneysel olarak gerçekleştirildi. Nude farelerin onkoloji araştırmalarında tümör modeli oluşturma açısından sağladığı pratik avantajlar nedeniyle literatürde yapılan araştırmalar sonucunda model indüksiyonu açısından nude farelerin kullanıldığı görülerek bu model seçildi.

Araştırmaya ortalama ağırlıkları 20 gr olan, 5-6 haftalık 21 adet erkek nude fare dahil edildi. Tüm nude farelerin işitme ölçümünden önce otoskopik bakısı yapılarak dış kulak kanalları temiz olanlar ile otoskopik bakısı normal olanlar araştırmaya dahil edildi. Bazal işitme değerlendirmesinin ardından tümör modeli oluşturuldu.

Deney grupları aşağıdaki şekilde dzenlendi:

***Grup 1 (Serum fizyolojik (20 mg/kg) uygulanan kontrol grubu, n=7)***

Kontrol grubunun bazal işitme olęımının ardından Nude farelere  $10^6$  hcre/mL C1300 nroblastom huresinin subkutan enjeksiyonu ile tımör gelişimi sağlandı. Oluşturulan tımör hacmi  $150 \text{ mm}^3$  e ulaştığında 20 mg/kg/gün intraperitoneal (İP) yol ile serum fizyolojik uygulandı. Tedavinin 3. gününde işitme olęümleri geręekleřtirildi ve 3. günün sonunda eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

***Grup 2 (CDDP (20 mg/kg) uygulanan grup, n=7)***

CDDP grubunun bazal işitme olęımının ardından Nude farelere  $10^6$  hcre/mL C1300 nroblastom huresinin subkutan enjeksiyonu ile tımör gelişimi sağlandı. Oluşturulan tımör hacmi  $150 \text{ mm}^3$  e ulaştığında 20 mg/kg/gün intraperitoneal (İP) yol ile CDDP uygulandı. Tedavinin 3. gününde işitme olęümleri geręekleřtirildi ve 3. günün sonunda eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

***Grup 3 (LİPO (20 mg/kg) uygulanan grup, n=7)***

LİPO grubunun bazal işitme olęımının ardından Nude farelere  $10^6$  hcre/mL C1300 nroblastom huresinin subkutan enjeksiyonu ile tımör gelişimi sağlandı. Oluşturulan tımör hacmi  $150 \text{ mm}^3$  e ulaştığında 20 mg/kg/gün intraperitoneal (İP) yol ile LİPO uygulandı. Tedavinin 3. gününde işitme olęümleri geręekleřtirildi ve 3. günün sonunda eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

Deneysel modeller uygun şartlarda ve cerrahi setler ile geręekleřtirildi. Sakrifikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbı atık torbalarına alınarak Deney Hayvanları Multidisipliner Laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda ve şekilde yok edildi. Gruplara yapılan uygulamalar, işitme değerlendirmeleri ve ratların sakrifikasyonunun zamansal çizelgesi Tablo 4 'de verildi.

**Tablo 4.** Gruplara uygulanan işlemlerin zamansal çizelgesi.

	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>
<b>Çalışmanın 0. günü</b>	DPOAE ve ABR ile bazal değerlendirme	DPOAE ve ABR ile bazal değerlendirme	DPOAE ve ABR ile bazal değerlendirme
<b>Çalışmanın 1.günü</b>	C1300 nöroblastoma hücresinin subkutan enjeksiyonu	C1300 nöroblastom hücresinin subkutan enjeksiyonu	C1300 nöroblastom hücresinin subkutan enjeksiyonu
<b>Çalışmanın 10.günü</b>	Serum fizyolojik enjeksiyonu (İP)	CDDP enjeksiyonu (İP)	LİPO enjeksiyonu (İP)
<b>Çalışmanın 13. günü</b>	ABR ölçümü, idrar alınması ve sakrifikasyon	ABR ölçümü, idrar alınması ve sakrifikasyon	ABR ölçümü, idrar alınması ve sakrifikasyon

### 3.4. Çalışma Materyali

Ortalama ağırlıkları 20 gr olan, 5-6 haftalık 21 adet erkek nude fare Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAD) sağlandı. Fareler araştırma süresince oda ısısında ( $20 \pm 2$  °C) ve 12' şer saatlik aydınlık / karanlık ortamda hepafiltre ile havalandırması olan özel bir odada tutularak standart pellet fare yemi ile beslenmeleri ve suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Tüm nude farelerin barındıkları kafeslerle su ve yiyecek kapları, yemleri her kullanımdan önce otoklavlandı. Araştırmaya başlamadan önce nude fareler bir hafta süreyle bu ortamda izlenip ortama uyum göstermeleri sağlandı.

### 3.5. Araştırmanın Değişkenleri

*Araştırmanın bağımlı değişkeni:* İşitme kaybındaki değişim, tümör modeli

*Araştırmanın bağımsız değişkeni:* Sisplatin, Lipoplatin, tümör boyutu, süre

*Araştırmanın kontrollü değişkeni:* Cinsiyet, ağırlık

### 3.6. Veri Toplama Araçları

Farelerin işitme duyarlılıklarının 0.25 kHz ile 80 kHz arasında olması ve odyolojik değerlendirmelerinin yüksek frekans uyarılarla gerçekleştirilmesi gerekmesi nedeniyle araştırmada ototoksite araştırmalarında işitsel fonksiyonların değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan yüksek frekans işitsel uyarılmış beyinsapı potansiyelleri (İUBP) testi ve distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) testi uygulandı (45; 97). Ancak mevcut DPOAE test cihazı ile 1 kHz - 8 kHz frekans aralığında ölçüm yapılabildiği, yüksek frekans ölçüm özelliklerine sahip olmadığı için 8 kHz üzeri DPOAE değerlendirmesi gerçekleştirilemedi.

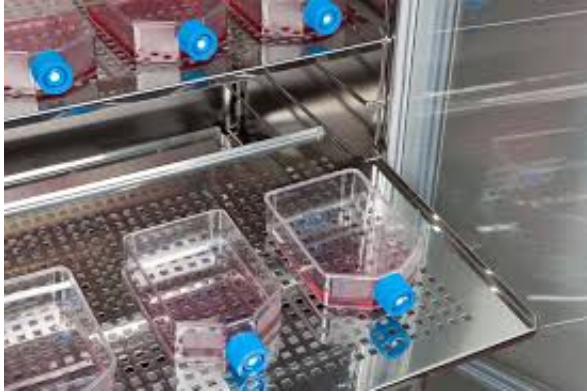
Görülebilir bir dış kulak yolu olan, kulak zarında veya orta kulakta herhangi bir patoloji olmadığı otomikroskopi ile doğrulanan, DPOAE testinde sinyal-gürültü oranı elde edilen nude fareler araştırmaya dahil edildi. İşitme fonksiyonlar değerlendirilmeden önce ratlara Ketamin hidroklorid (40mg/kg) ve Ksilazin hidroklorid (5mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandı (98). Otoskopik bakışı doğal ve DPOAE testinde sinyal-gürültü oranı elde edilen nude farelere yüksek frekans işitsel uyarılmış beyinsapı potansiyelleri testi uygulandı. İşitmesinin normal olduğu odyolojik değerlendirme ile belirlenen nude farelere  $10^6$  hücre/mL C1300 nöroblastom hücresinin subkutan enjeksiyonu ile tümör gelişimi sağlandı ve nude

farelerin rasgele seçilmesiyle üç grup oluşturuldu. Oluşturulan tümör hacmi  $150 \text{ mm}^3$  e ulaştığında  $20 \text{ mg/kg/gün}$  intraperitoneal (İP) yol ile gruplara serum fizyolojik, CDDP ve LİPO uygulandı. Tedavinin 3. gününde iştme ölçümleri gerçekleştirildi ve 3. günün sonunda eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

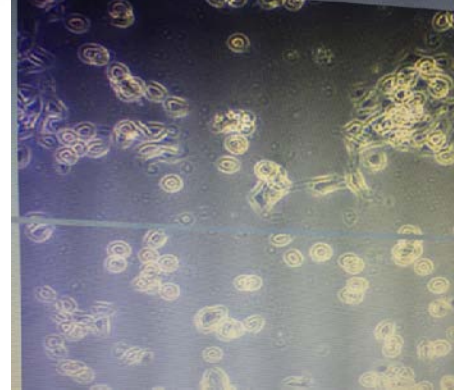
#### ***Nöroblastom Tümör Modelinin Oluşturulması:***

##### ***Hücre Kültürü:***

C1300 hücreleri, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin ilaveli 10% fetal bovin serum içeren RPMI 1640 ve DMEM ortamlarında kültüre edildi. Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek  $37^\circ\text{C}$  de % 5  $\text{CO}_2$  'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Kültürler yaklaşık %80 sıklığına eriştiğinde Tripsin/EDTA solüsyonuyla kültür kaplarından kaldırılarak 1:2 oranında pasajlandı. Nude farelere  $10^6$  hücre/mL C1300 nöroblastomahücrelerinin subkutan enjeksiyonu ile tümör gelişimi sağlandı. Oluşturulan tümör hacmi  $150 \text{ mm}^3$  e ulaştığında (1 cm çap altı) (yaklaşık 10 gün) her bir grupta  $n=7$  olacak şekilde fareler randomize edildi.



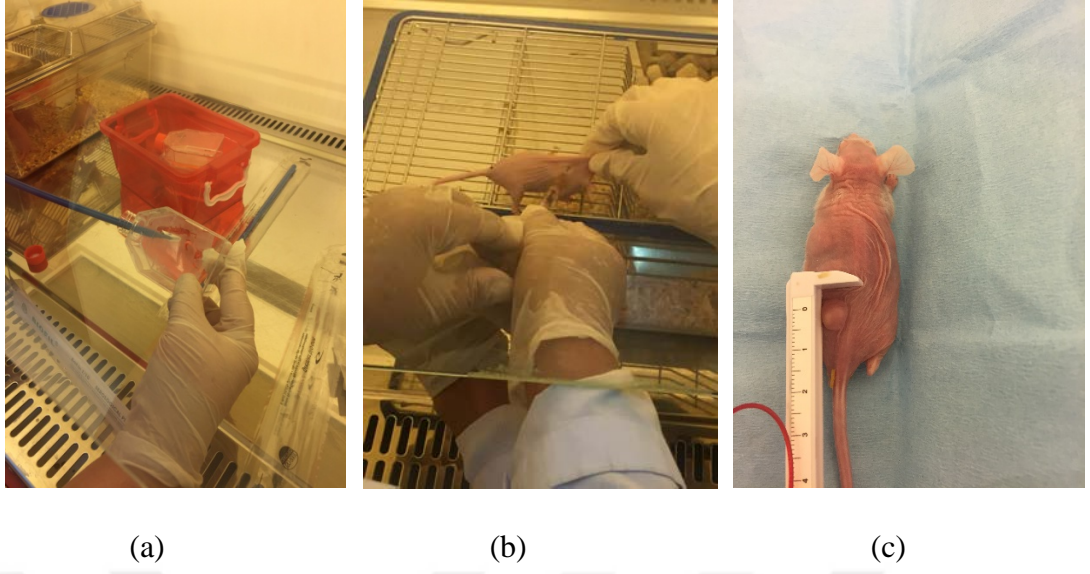
(a)



(b)

**Şekil 4.** Hücre kültürü (a) ve üretilen C1300 hücrelerinin ışık mikroskopisi (b)





**Şekil 5.** C1300 hücrelerinin kazınması (a), nude fareye enjeksiyonu (b) ve nude farede tümör oluşumu (c).

#### ***Anestezi Yöntemi:***

Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Testi (DPOAE) ve İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri Testleri (İUBP) öncesinde nude farelere anestezi uygulandı. Öncelikle 40 mg/kg % 10'luk Ketamin (Ketalar flk, Pfizer) ve 10 mg/kg Ksilazin (Basilazin %2, Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş) intraperitoneal yolla verilerek anestezileri sağlandı. Nude farelerin ilaç tedavisi sonrası 3. günde İUBP testlerinden sonra yüksek doz eter solutularak sakrifikasyonları gerçekleştirildi.

#### ***İşitsel Değerlendirme***

##### ***İşitme Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi***

Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Testi (DPOAE) ve İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri Testi (İUBP); nude farelere tümör enjeksiyonu öncesinde işitmenin bazal değerlendirilmesi amacıyla, İUBP testi ise CDDP, LİPO ve serum fizyolojik uygulaması sonrasında 3. günde işitsel fonksiyonları değerlendirmek amacıyla uygulandı. Odyolojik testler anestezi altında ve ortam gürültüsü 40 dB SPL (A)'nın altında olan sessiz odada uygulandı. DPOAE testinde 1 kHz sonrası tüm frekanslarda sinyal-gürültü oranı elde edilen ve İUBP testinde işitme eşikleri 25 dB SPL ve altında elde edilen nude fareler araştırmaya dahil edildi. Test süresince nude farelerin hipotermiye girmelerini önlemek amacıyla gözleri spanç ile kapatılarak spot ışığı

kullanıldı. Spot ışığından gözlerinin kurumaması için steril serum fizyolojik gözlerine aralıklarla damlatıldı.

### ***Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) Testi***

DPOAE testleri anestezi altındaki nude farelere yatar pozisyon verilip proba uygun pozisyon verilmesi sağlandı. Sağ ve sol kulakları ayrı ayrı “Otodynamics ILO-V6 Cochlear Emission Analyzer”, 5.61 (Otodynamics, London) versiyonu kullanılarak test edildi. DPOAE testi için  $f_2$  ve  $f_1$  frekansları arasındaki oran ( $f_2/f_1$ ) 1.22 olacak şekilde ayarlandı.  $L_1$ - $L_2$  seviyeleri arasındaki fark 10 dB SPL ( $L_1 = 65$  dB SPL,  $L_2 = 55$  dB SPL) şiddetinde tutuldu. DPOAE,  $f_1$  ve  $f_2$ 'nin geometrik ortalamalarında 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 ve 8000 Hz'deki sinyal-gürültü oranları kaydedildi (Şekil 15). DPOAE'lar,  $2f_1-f_2$  frekansında ölçüldü. Her bir frekansta cevabın sinyal gürültü oranı 3 dB pe SPL'den büyük olarak elde edilen değerler OAE var olarak değerlendirildi.

### ***İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri (İUBP) Testi***

İşitsel uyarılmış beyinsapı potansiyelleri kayıtlamaları için Intelligent Hearing Systems (IHS, Miami, FL) cihazı Smart-EP 10 versiyonu kullanıldı. Cihazın kalibrasyonu IHS Corp. tarafından gerçekleştirildi. Kayıt sırasında sub-dermal iğne elektrodlar kullanıldı. Aktif elektrod vertekse, referans elektrod test kulağına, toprak elektrod ise karşı kulağın ventrolateraline (kulak altı) yerleştirildi. Elektrod dirençleri 1 kohm'nin altında tutuldu. Elektrodlarla toplanan biyoelektriksel yanıtlar 31.3 mikrosaniye örnekleme hızında analogdan dijitale çevrildi. İUBP testinde 4, 8, 12, 16, 20 ve 32 kHz'de, uyarının frekans spektrumunu daha darlaştırmak amacıyla Blackman zarfıyla, iniş-çıkış süresi 1000 ms olan ton burst uyarın kullanıldı. III. dalganın elde edildiği en düşük şiddet düzeyi ratın o frekanstaki işitme eşiği olarak kabul edildi. 70 dB SPL şiddetinden başlanarak III.dalga elde edildiğinde eşik üstü seviyelerde uyarın şiddeti 10 dB, eşiğe yaklaştıkça uyarın şiddeti 5 dB azaltılırken, III. dalga elde edilmediğinde uyarın şiddeti 5 dB arttırılarak her iki kulağın işitme eşikleri belirlendi. İUBP testinde kullanılan kayıt ve uyarın parametreleri Tablo 5' te belirtildi.



**Şekil 6.** Nude fareye işitsel uyarılmış beyinsapı potansiyel testinin uygulanması

**Tablo 5.** İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyel testlerinde kullanılan kayıt ve uyarın parametreleri

---

<b>Kayıt-Uyarın Parametreleri</b>	
<b>Polarite</b>	Alterne
<b>Uyarın</b>	8 kHz, 12 kHz, 16 kHz, 20 kHz, 32 kHz Ton Burst uyarın
<b>Uyarın Sıklığı</b>	37.1/sn
<b>Kulaklık</b>	Yüksek frekans (8000 Hz-32000 Hz) ölçümlerinde Intelligent Hearing Systems yüksek frekans insert kulaklık
<b>Averaj</b>	1024
<b>Kayıtlama</b>	25 ms
<b>Penceresi</b>	
<b>Amplifikasyon</b>	0.5 $\mu$ V

---

---

<b>Kayıtlama</b>	30 - 3000 Hz bant geçirgen filtre
<b>Filtresi</b>	

---

### ***İlaç Uygulaması***

CDDP (1mg/ml steril konsantrasyon ONCO-TAIN,) 20 mg /kg /gün olacak şekilde hazırlanarak intraperitoneal yol (İP) ile tek doz tümör hacmi 150 mm<sup>3</sup> e ulaştığında (1 cm çap altı) (yaklaşık 10 gün) Grup 2'ye uygulandı. CDDP için uygun ototoksisite açısından İP dozu, 4 nude farede pilot çalışma yapılarak belirlendi. Aynı koşullarda ve aynı dozlarda serum fizyolojik ve LİPO Grup 1 ve 3'e İP yolla uygulandı.

### ***Araştırmada Alınan Tedbirler:***

Nude fareler rutin olarak kilo kaybı açısından monitorize edildi. CDDP ve LİPO uygulamaları yapılmadan hemen önce araştırmacılar tarafından eldiven, gözlük ve özel önlük giyilerek steril şartlarda ve günlük olarak hazırlanarak, farelere uygulandı. Tümör büyüklüğü her gün sırttan takip edildi.

### ***Nude Farelerin Sakrifikasyonu, Organ ve Dokuların Disseke Edilmesi***

CDDP, LİPO ve eşdeğer hacimde salin uygulamalarından 96 saat sonra (izlemin 4. gününde) nude fareler feda edildi. Fareler feda edilmeden önce eter inhalasyon anestezisi şeklinde uygulandı. Nude farelerin organ ve dokuları disseke edilerek, dekapitasyon uygulanarak, her iki koklealar ve beyinsapı çıkarılıp immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Tüm organların yarısı ileriki zamanlarda yapılabilecek biyokimyasal analizler için direkt olarak ayrılıp, -80°C'e kaldırıldı. Yarısı immünohistokimyasal analizler için formol içine konarak ışık mikroskopik analizlere ayrıldı.

### ***Dokularda Yapılan Histopatolojik İncelemeler:***

Steril koşullarda nude fareler sırttan açılarak tümör dokusu alındı. Alınan tümörden bir kısım kesit alınırken, bir kısmından da taze tümör hücre süspansiyonu elde edildi. Disseke edilen dokuların yarısı formalin içinde fikse edilip doku takibi işlemi sonrası parafine gömüldü. Gerekli doku takip işlemlerinden sonra nöroblastom dokusunda ve koklealarda histopatolojik inceleme yapıldı. Nöroblastom varlığı ve kimyasalların

etkileri için beyin, adrenal bez, sempatik gangliyonlar, böbrek, karaciğer, siyatik sinir toplandı. Taze tümör dokusunun fiziksel homojenizasyonu ve filtrasyonu ile tek hücre süspansiyonu elde edilerek Annexin V- FITC+PI akım sitometrik analizi ile apoptoz ve nekroz kantitatif olarak değerlendirildi. Parafin bloktan hazırlanan 5 mikrometre kalınlıkta polilizin kaplı lamlardaki TUNEL yöntemi ile apoptoz boyaması yapıldı. Değerlendirme 5 farklı alanda 1000'er hücrede sayım yapıp yüzde ortalama olarak kaydedildi. Tümör dokusundaki nekrotik ve apoptotik alanlar ışık mikroskobu altında değerlendirilerek oranlandı.

### ***TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini:***

Bu teknik için in situ cell death detection TUNEL system kiti kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilip, azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika 20 µg/ml proteinase K ile enkübe edildikten sonra, distile su ile 5 dakika yıkanıp doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı. Kesitler TdT-enzimi 37 °C de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanacak kesitler anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanacak kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine ile boyanıp yıkandıktan sonra Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapılacak kesitler %70-%80 ve %96'lık alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dakika 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobunda koklea ve spiral gangliondaki tüm hücreler sayılacak bu alanlardaki pozitif kahverengi boyanan hücreler ile oranlanıp % olarak apoptoz pozitifliği elde edildi.

### ***SOD2, COX-2 ve İNOS Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Tayini***

İmmünohistokimya analizleri için temel onkoloji laboratuvarında bulunan Ventana Discovery cihazı kullanıldı. Boyamalar otomatik olarak gerçekleştirildi. Koklea dokulardan alınan kesitler 3 mikron çapta pozitif yüklü lamalar üzerine alındı. 60 derecede bir gece etüvde bekletildikten sonra Ventana Discovery cihazına yüklenerek deparafinizasyon, fiksasyon, permeabilizasyon, antijenlerin açığa çıkarılması gibi

hazırlık aşamaları gerçekleştirildi. Ardından blokan ve primer antikor ve devamında streptavidin biotin peroksidasyon yöntemiyle DAB kromojen ile renklendirme yapıldı. Bu işlem sonrasında hemotoksidan zemin boyası yapıp şeffaflaştırılan lamalar entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda gözlem yapıldı. İncelenen kesitlerdeki hedeflenen antijen ekspresyon oranları yüzdesel olarak kaydedildi.

### ***İdrar örneklerinin analizi***

Tüm gruplardaki nude farelerin sakrifikasyon esnasında kalpten alınan tam kan örnekleri Serumda kreatinin düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ayrıca 24 saatlik alınan idrar örneğinden de kreatinin düzeyleri çalışıldı.

### **3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi**

Araştırmaya dair plan ve uygulama takvimi Tablo 6’te verildi.

**Tablo 6.** Araştırma planı ve takvim



### **3.8. Verilerin Değerlendirilmesi**

CDDP, LİPO ve serum fizyolojik uygulanan grupların radyolojik test sonuçları birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca tüm grupların bazal ve tedavi sonrası radyolojik test sonuçları da karşılaştırıldı. Veriler % 95 persantil tarzında sunuldu. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 22.0

versiyonu kullanılarak  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde incelendi. Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi. Tanımlayıcı istatistik ile birlikte, gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Friedman varyans analizi ile analiz edildi. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grup içi ölçümler ise Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon İşaretli Sıralar testi ile değerlendirildi.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Bu araştırmada deney hayvanı kullanıldığı için tümör oluşum süresinin standart olmaması, işitsel fonksiyon değerlendirmesi sırasında anesteziye bağlı ölümler, ilaç uygulamaları ardından nedeni belirlenemeyen ölümlerin gerçekleşmesi, eş zamanlı olarak tüm grupların sakrifikasyonunun gerçekleştirilememesi gibi araştırma sınırlılıkları ile karşılaşıldı. Ancak ksenograft çalışmalarında bu sınırlılıklar sıklıkla karşılaşıldığı için araştırma bulgularına olumsuz bir etkisinin olmadığı göz önünde bulundurulmuştur.

### **3.10. Etik Kurul Onayı**

Tüm çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 75/2016 protokol no'lu 27.12.2016 gün ve 15 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (Ek 1).

#### 4. BULGULAR

Bu bölümde araştırma dahilinde yapılan değerlendirmelerin istatistiksel olarak analizi sonucu elde edilen bulgular detaylı olarak yer almaktadır.

##### 4.1. Tümör Dokularında Tüm Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımı

Kontrol grubunda apoptoz miktarı %12,70 ile %30,30 arasında değişmekte olup ortalama %23,21 ( $\pm 5,72$ ) bulundu. CDDP verilen grupta apoptoz miktarı %26,10 ile %59,50 arasında değişmekte olup ortalama %37,57 ( $\pm 11,25$ ) bulundu. LİPO verilen grupta ise apoptoz miktarı %11,20 ile %83,60 arasında değişmekte olup ortalama %61,16 ( $\pm 24,58$ ) bulundu.

Kontrol grubunda nekroz miktarı %1,80 ile %6,40 arasında değişmekte olup ortalama %3,99 ( $\pm 1,70$ ) bulundu. CDDP verilen grupta nekroz düzeyi %2,20 ile %19,50 arasında değişmekte olup ortalama %6,21 ( $\pm 5,94$ ) bulundu. LİPO verilen grupta ise nekroz yüzdesi %0,10 ile %4,30 arasında değişmekte olup ortalama %1,39 ( $\pm 1,46$ ) bulundu (Tablo 7).

**Tablo 7.** Tüm gruplarda apoptoz ve nekroz düzeylerinin dağılımları

	Grup	Min-Max	Ortalama	$\pm$ SD
<b>Kontrol</b>	Apoptoz	12,70-30,30	21,21	5,72
	Nekroz	1,80-6,40	3,99	1,70
<b>CDDP</b>	Apoptoz	26,10-59,50	37,57	11,26
	Nekroz	2,20-19,50	6,21	5,94
<b>LİPO</b>	Apoptoz	11,20-83,60	61,15	24,59
	Nekroz	0,10-4,30	1,39	1,46



#### 4.2. Tümör Dokularında Apoptoz ve Nekroz Bulgularının Kontrol ve CDDP Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Kontrol grubu ile CDDP uygulanan gruplar arasında tümördeki apoptoz ve nekroz oranlarının Mann Whitney U non-parametrik testine göre karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında apoptoz düzeyinde anlamlı fark tespit edilirken ( $p=0,006$ ) nekroz açısından fark görülmedi ( $p=0,655$ ). Buna göre CDDP grubunda apoptoz miktarı ortalama %37,57 iken kontrol grubunda %23,21 ile daha düşük görüldü (Tablo 8).

**Tablo 8.** Kontrol ve CDDP gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması

	Grup	Ortalama	$\pm$ SD	P
<b>Apoptoz</b>	Kontrol	23,21	5,72	<b>0,006*</b>
	CDDP	37,57	11,25	
<b>Nekroz</b>	Kontrol	3,99	1,70	0,655
	CDDP	6,21	5,94	

#### 4.3. Tümör Dokularında Apoptoz ve Nekroz Bulgularının Kontrol ve LİPO Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Kontrol grubu ile LİPO uygulanan gruplar arasında tümördeki apoptoz ve nekroz oranlarının Mann Whitney U non-parametrik testine göre karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında apoptoz düzeyinde ( $p=0,025$ ) ve nekroz açısından fark görülmüştür ( $p=0,018$ ). Buna göre LİPO grubunda apoptoz miktarı ortalama %61,15 iken kontrol grubunda %23,21 görüldü. Ayrıca nekroz açısından kontrol grubu ortalama %3,99 iken LİPO grubunda daha az olarak %4,30 olarak daha yüksek görüldü (Tablo 9).

**Tablo 9.** Kontrol ve LİPO gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>Ortalama</b>	<b>± SD</b>	<b>P</b>
<b>Apoptoz</b>	Kontrol	23,21	5,72	<b>0,025*</b>
	LİPO	61,15	24,59	
<b>Nekroz</b>	Kontrol	3,99	1,70	<b>0,018*</b>
	LİPO	4,30	1,46	

#### **4.4. Tümör Dokularında Apoptoz ve Nekroz Bulgularının CDDP ve LİPO Uygulanan Gruplar Arasında Karşılaştırılması**

CDDP grubu ile LİPO uygulanan gruplar arasında tümördeki apoptoz ve nekroz oranlarının Mann Whitney U non-parametrik testine göre karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında apoptoz düzeyinde ( $p=0,035$ ) ve nekroz açısından fark görülmüştür ( $p=0,010$ ). Buna göre CDDP grubunda apoptoz miktarı ortalama %37,57 iken LİPO grubunda %61,15 daha yüksek olarak görüldü. Ayrıca nekroz açısından CDDP grubu ortalama %6,21 iken LİPO grubunda daha az olarak %4,30 görüldü (Tablo 10).

**Tablo 10.** Kontrol ve LİPO gruplarında apoptoz ve nekroz karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>Ortalama</b>	<b>±SD</b>	<b>P</b>
<b>Apoptoz</b>	CDDP	37,57	11,26	<b>0,035*</b>
	LİPO	61,15	24,59	
<b>Nekroz</b>	CDDP	6,21	5,94	<b>0,010*</b>
	LİPO	4,30	1,46	

#### 4.5. Spiral Ganglionda Tüm Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımları

Kontrol grubunda spiral gangliondaki apoptoz düzeyi %0,00 ile %2,00 aralığında olup ortalama %1,15 ( $\pm 0,90$ ) dir. CDDP verilen grupta apoptoz düzeyi %9,00 ile %15,00 aralığında olup ortalama %11,43 ( $\pm 1,90$ ) düzeyindedir. LİPO verilen grupta ise apoptoz aralığı %3,00 ile %5,00 aralığında ve ortalama %4,00 ( $\pm 0,82$ ) düzeyindedir.

Kontrol grubunda spiral gangliondaki nekroz düzeyi %0,00 ile %2,00 aralığında olup ortalama %0,71 ( $\pm 0,76$ ) dir. CDDP verilen grupta nekroz düzeyi %10,00 ile %20,00 aralığında olup ortalama %15,43 ( $\pm 3,46$ ) düzeyindedir. LİPO verilen grupta ise nekroz aralığı %3,00 ile %8,00 aralığında ve ortalama %5,71 ( $\pm 1,60$ ) düzeyindedir (Tablo 11).

**Tablo 11.** Tüm gruplarda spiral ganglionda apoptoz ve nekroz yüzdelerinin dağılımları

	Grup	Min-Max	Ortalama	$\pm$ SD
<b>Kontrol</b>	Apoptoz	0,00-2,00	1,14	0,90
	Nekroz	0,00-2,00	0,71	0,76
<b>CDDP</b>	Apoptoz	9,00-15,00	11,43	1,90
	Nekroz	10,00-20,00	15,43	3,46
<b>LİPO</b>	Apoptoz	3,00-5,00	4,00	0,82
	Nekroz	3,00-8,00	5,71	1,60

#### 4.6. Spiral Ganglionda Kontrol ve CDDP Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması

Kontrol ve CDDP verilen gruplarda spiral gangliondaki apoptoz ve nekroz oranlarının karşılaştırılmasına göre Mann Whitney U non-parametrik teste göre

apoptoz ve nekroz açısından istatistiksel anlamlı fark görüldü ( $p=0,002$  ve  $p=0,002$ ). Buna göre CDDP verilen grupta apoptoz ve nekroz daha yüksektir (Tablo 12).

**Tablo 12.** Spiral ganglionda kontrol ve CDDP gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>Ortalama</b>	<b>±SD</b>	<b>P</b>
<b>Apoptoz</b>	Kontrol	0,00	0,00	<b>0,002*</b>
	CDDP	11,43	1,90	
<b>Nekroz</b>	Kontrol	0,71	0,76	<b>0,002*</b>
	CDDP	15,43	3,46	

#### 4.7. Spiral Ganglionda Kontrol ve LİPO Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması

Kontrol ve LİPO verilen gruplarda spiral gangliondaki apoptoz ve nekroz oranlarının karşılaştırılmasına göre Mann Whitney U non-parametrik teste göre apoptoz ve nekroz açısından istatistiksel anlamlı fark görüldü ( $p=0,002$  ve  $p=0,002$ ). Buna göre LİPO verilen grupta apoptoz ve nekroz daha yüksektir (Tablo 12).

**Tablo 13.** Spiral ganglionda kontrol ve LİPO gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>Ortalama</b>	<b>±SD</b>	<b>P</b>
<b>Apoptoz</b>	Kontrol	0,00	0,00	<b>0,002*</b>
	LİPO	4,00	0,82	
<b>Nekroz</b>	Kontrol	0,71	0,76	<b>0,002*</b>
	LİPO	5,71	1,60	

#### 4.9. Spiral Ganglionda CDDP ve LİPO Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Karşılaştırılması

CDDP ve LİPO verilen gruplarda spiral gangliondaki apoptoz ve nekroz oranlarının karşılaştırılmasına göre Mann Whitney U non-parametrik teste göre apoptoz ve nekroz açısından istatistiksel anlamlı fark görüldü ( $p=0,002$  ve  $p=0,002$ ). Buna göre CDDP verilen grupta apoptoz ve nekroz daha yüksektir (Tablo 13).

**Tablo 14.** Spiral ganglionda CDDP ve LİPO gruplarında apoptoz ve nekroz yüzdelerinin karşılaştırılması

	Grup	Ortalama	$\pm$ SD	P
Apoptoz	CDDP	11,43	1,90	<b>0,002*</b>
	LİPO	4,00	0,82	
Nekroz	CDDP	15,43	3,46	<b>0,002*</b>
	LİPO	5,71	1,60	

#### 4.10. Kokleada Tüm Gruplarda Apoptoz ve Nekroz Yüzdelerinin Dağılımları

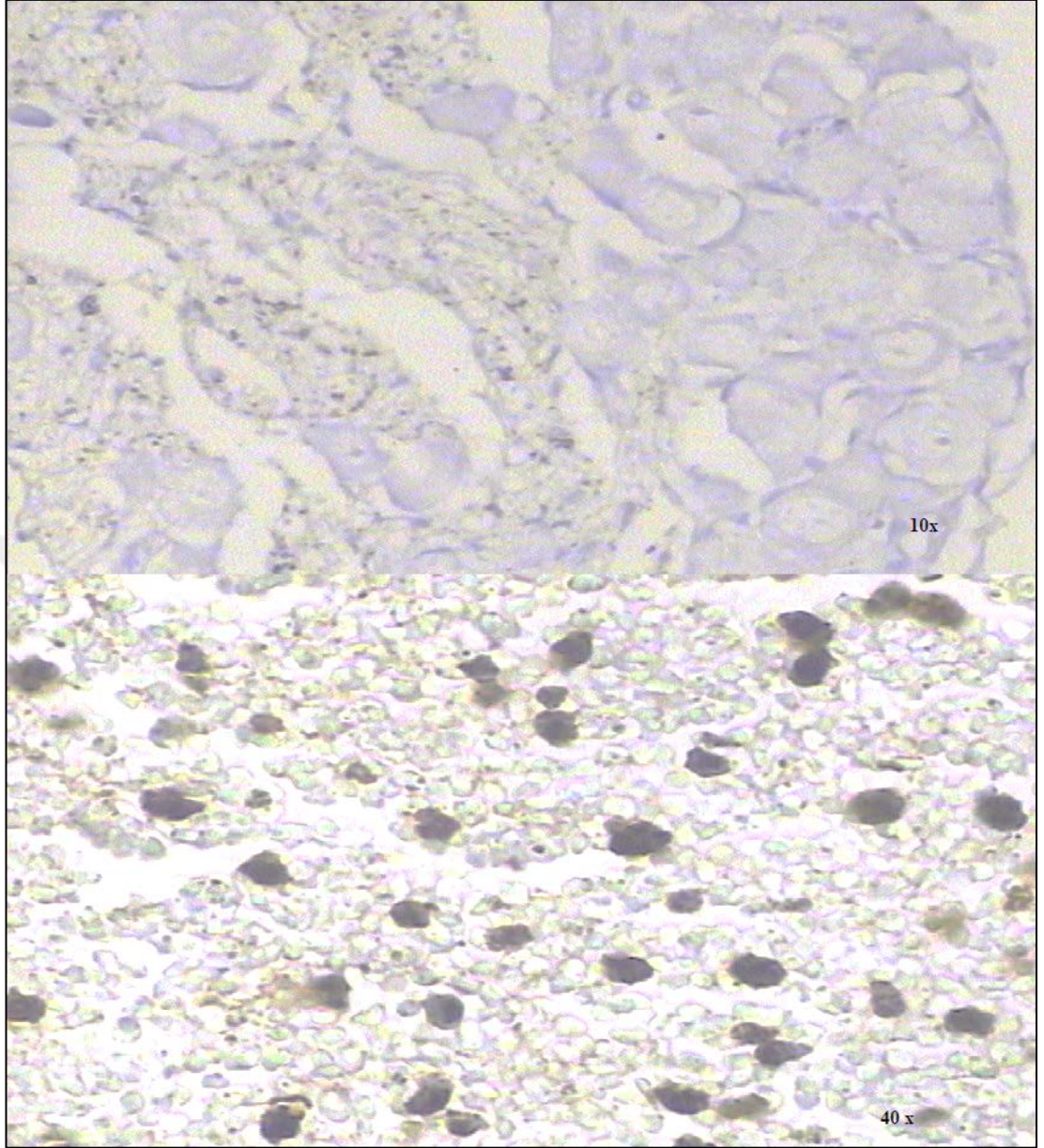
Kontrol grubunda kokleadaki apoptoz düzeyi %0,00 ile %0,00 aralığında olup ortalama %0,00 ( $\pm 0,00$ ) dır. CDDP verilen grupta apoptoz düzeyi 0,00 ile %0,00 aralığında olup ortalama %0,00 ( $\pm 0,00$ ) düzeyindedir. LİPO verilen grupta ise apoptoz aralığı %3,00 ile %5,00 aralığında ve ortalama %4,00 ( $\pm 0,82$ ) düzeyindedir.

Kontrol grubunda kokleadaki nekroz düzeyi %0,00 ile %0,00 aralığında olup ortalama %0,00 ( $\pm 0,00$ ) dır. CDDP verilen grupta nekroz düzeyi %0,00 ile %0,00 aralığında olup ortalama %0,00 ( $\pm 0,00$ ) düzeyindedir. LİPO verilen grupta ise nekroz aralığı %0,00 ile %0,00 aralığında ve ortalama %0,00 ( $\pm 0,00$ ) düzeyindedir (Tablo 14).

**Tablo 15.** Tüm gruplarda kokleada apoptoz ve nekroz yüzdelerinin dağılımları

	<b>Grup</b>	<b>Min-Max</b>	<b>Ortalama</b>	<b>± SD</b>
<b>Kontrol</b>	Apoptoz	0,00-2,00	1,14	0,90
	Nekroz	0,00-2,00	0,71	0,76
<b>CDDP</b>	Apoptoz	9,00-15,00	11,43	1,90
	Nekroz	10,00-20,00	15,43	3,46
<b>LİPO</b>	Apoptoz	3,00-5,00	4,00	0,82
	Nekroz	3,00-8,00	5,71	1,60

Tüm gruplardaki TUNEL boyama ile Şekil 3'deki örnekte yer aldığı üzere görüntülenerek yüzde değerler elde edilmiştir. Aşağıdaki örnekte LİPO verilen gruptan bir hayvanın koklea dokusundaki ölü hücreler görülmektedir. Kahverengi boyanmış odaklar apoptozu göstermektedir.



**Şekil 7.** Lipoplatin verilmiş hayvanda kokleada TUNEL ile elde edilen görüntü

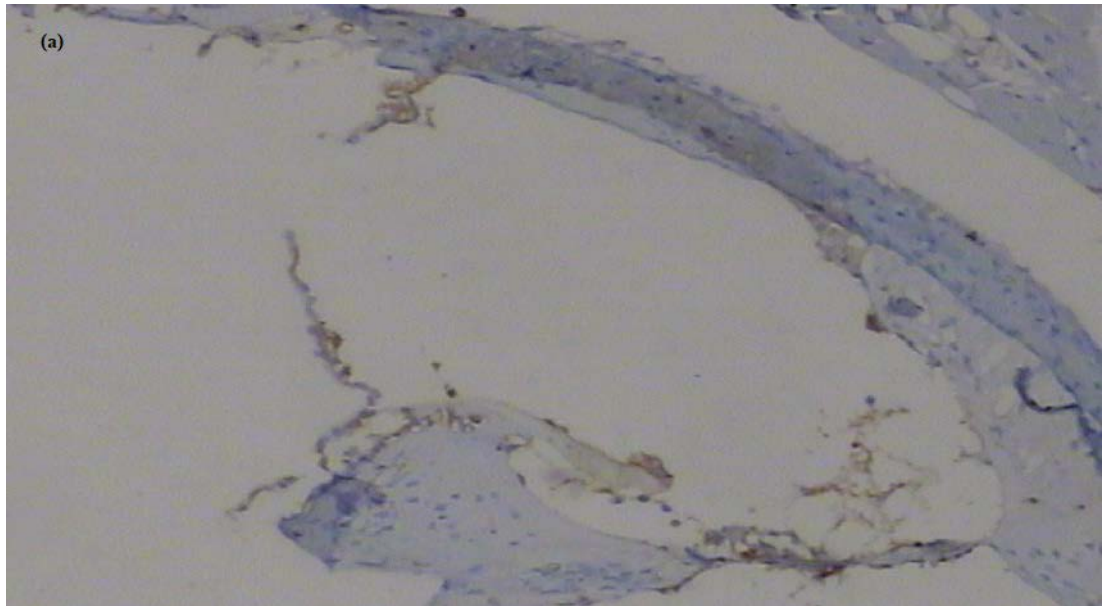
#### **4.11. Tüm Gruplarda Kokleada SOD2 ve INOS2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Kokleada Kontrol, CDDP ve LİPO verilen gruplar arasında SOD2 ve INOS2 ekspresyon düzeyinin (+: hafif ++: orta düzey ekspresyon şeklinde) Ki-Kare testi ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p=0,466$  ve  $p=0,350$ , sırasıyla). Bu nedenle ikili gruplar arası değerlendirme yapılmamıştır (Tablo 15).

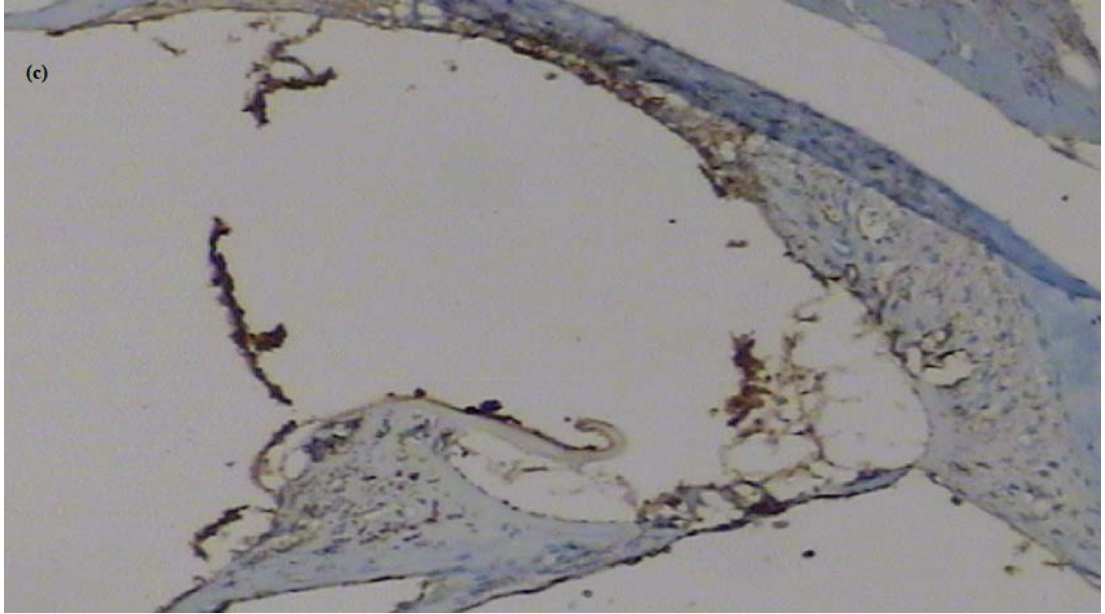
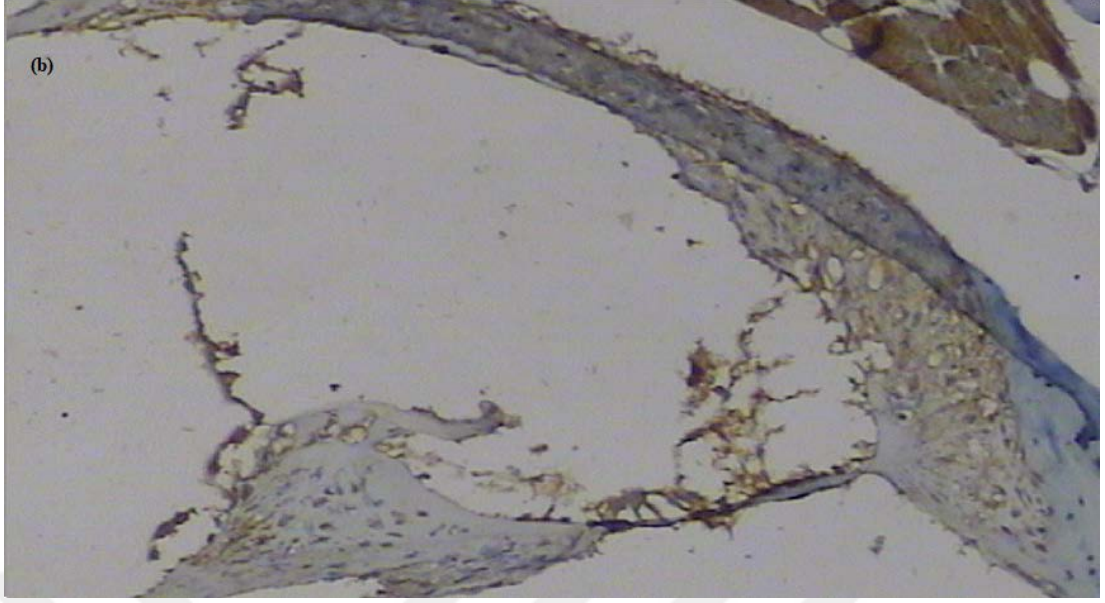
**Tablo 16.** Tüm Gruplarda Kokleada SOD2 ve INOS2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>P</b>
<b>SOD2</b>	Kontrol	2	5	0,466
	CDDP	4	3	
	LİPO	4	3	
<b>INOS2</b>	Kontrol	7	0	0,350
	CDDP	7	0	
	LİPO	6	1	

Bu bulgular Şekil 4. 'de yer alan immünohistokimya görüntüsünde yer aldığı üzere kahverengi ile görülen ve koklea dokusu içindeki hücrelerin (ekspresyon +) değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. Aşağıdaki örnek doku, LİPO uygulanmış bir hayvana aittir.







**Şekil 8.** Lipoplatin verilmiş hayvanda immünohistokimyasal olarak COX2, İNOS2 ve SOD2 boyama görüntüsü (a: COX2, b: İNOS2 ve c: SOD2)

#### **4.12. Tüm Gruplarda Kokleada COX2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Kokleada Kontrol, CDDP ve LİPO verilen gruplar arasında COX2 ekspresyon düzeyinin (-: negatif, +: pozitif ekspresyon şeklinde) Ki-Kare testi ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ). Buna göre COX2, CDDP verilen grupta eksprese olmazken LİPO ve Kontrol grubunda tüm hayvanlarda eksprese durumda aynı (+) paterne sahiptir.

**Tablo 17.** Tüm Gruplarda Kokleada COX2 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>P</b>
<b>COX2</b>	Kontrol	7	0	<b>0,001*</b>
	CDDP	0	7	
	LİPO	7	0	

#### **4.13. CDDP ve LİPO Grupları Arasında Spiral Ganglionda SOD2, İNOS2 ve COX2 Ekspresyonlarının Karşılaştırılması**

CDDP ve LİPO verilen gruplarda spiral gangliondaki SOD2 (p=0,593), İNOS2 (p=0,299) düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05). Ayrıca COX2 tüm gruplarda negative çıktığı için değerlendirme yapılmamıştır (Tablo 17).

**Tablo 18.** Spiral ganglionda Sisplatin ve Lipoplatin gruplarında SOD2, İNOS2 ve COX2 yüzdelerinin karşılaştırılması

	<b>Grup</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>P</b>
<b>SOD2</b>	CDDP	4	3	0,593
	LİPO	3	4	
<b>İNOS2</b>	CDDP	7	0	0,299
	LİPO	6	1	

#### **4.14. Tüm Gruplara Serum ve İdrar Kreatinin Değerleri Dağılımı ve İstatistiksel Karşılaştırılması**

Kontrol grubunda serum kreatinin değerleri 0,20 ile 0,50 mg/dL arasında değişmekte olup ortalama 0,357 ( $\pm 0,0976$ ) değerindedir. İdrar kreatinin değerleri ise

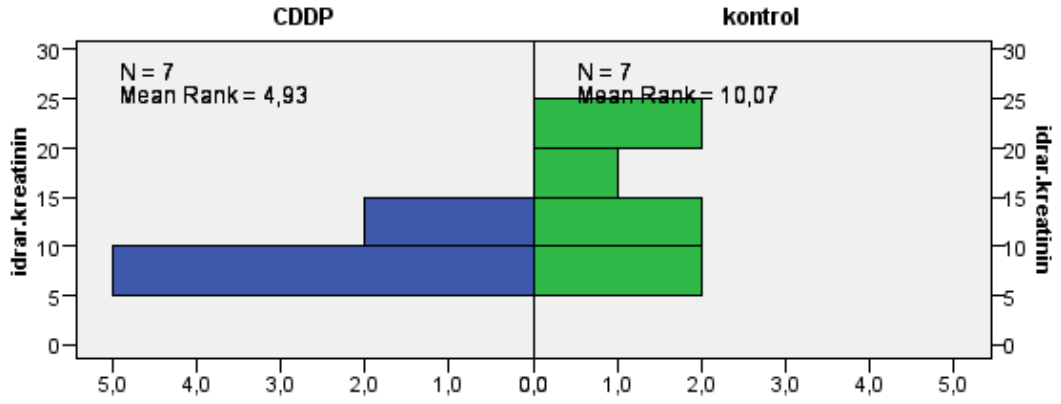
7,80 ile 24,30 arasında değişmekte olup ortalama 14,99 ( $\pm 6,29$ ) mg/dL düzeyindedir. CDDP verilen grupta serum kreatinin 0,30 ile 0,50 arasında değişmekte olup ortalama 0,40 ( $\pm 0,082$ ) mg/dL 'dir. İdrar kreatinin düzeyi ise 5,80 ile 14,70 aralığında, ortalama 8,44 ( $\pm 3,2$ ) değerindedir. Son olarak LİPO grubunda serum kreatinin 0,20 ile 1,40 mg/dL arasında olup ortalama 0,47 ( $\pm 0,42$ ) mg/dL değerindedir. İdrar kreatinin düzeyi 3,40 ile 21,60 aralığında ve ortalama 13,69 ( $\pm 8,24$ ) mg/dL olarak tespit edilmiştir. Deney gruplarında ölçülen serum ve idrar kreatinin düzeyleri Tablo 18 'de yer almaktadır.

**Tablo 19.** Tüm gruplardaki serum kreatinin ve idrar kreatinin değerleri

	SERUM KREATİNİN (mg/dL)	İDRAR KREATİNİN (mg/dL)
Kontrol	0,2	12,1
Kontrol	0,3	7,8
Kontrol	0,4	14
Kontrol	0,3	24,3
Kontrol	0,4	18,1
Kontrol	0,4	8
Kontrol	0,5	20,6
CDDP	0,3	7,4
CDDP	0,4	6,5
CDDP	0,5	6,2
CDDP	0,5	5,8
CDDP	0,4	7,8
CDDP	0,4	10,7
CDDP	0,3	14,7
LİPO	0,2	16,3
LİPO	0,4	21,3
LİPO	0,4	3,4
LİPO	1,4	21,2
LİPO	0,3	6
LİPO	0,3	6
LİPO	0,3	21,6

Kontrol ve CDDP verilen gruplar karşılaştırıldığında Man Whitney U Non-parametrik teste göre serum kreatinin değerleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,456$ ). Ancak idrar kreatinin değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark görülmektedir ( $p=0,017$ ). Buna göre kontrol grubunda ortalama idrar kreatinin değeri

14,99 ( $\pm 6,29$ ) mg/dL iken CDDP verilen grupta bu deęer 8,44 ( $\pm 3,20$ ) düzeyinde, bir bařka deyiřle CDDP verilen grupta idrar kreatinin deęeri daha dūřuktur (řekil 5).

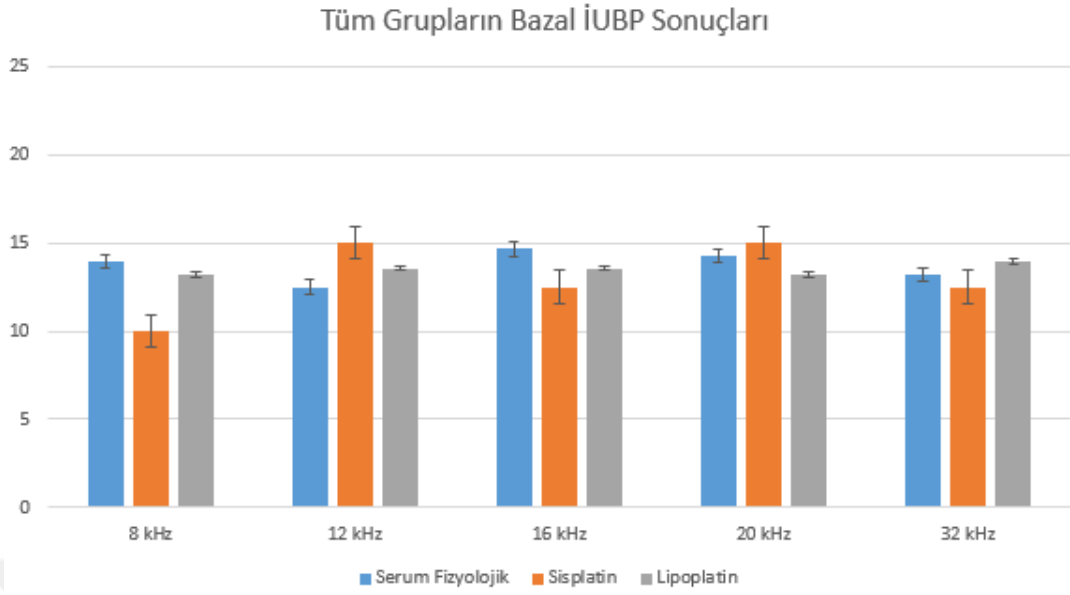


**şekil 9.** Kontrol ve Sisplatin gruplarındaki idrar kreatinin değerlerinin istatistiksel anlamlı fark görülen dağılımları

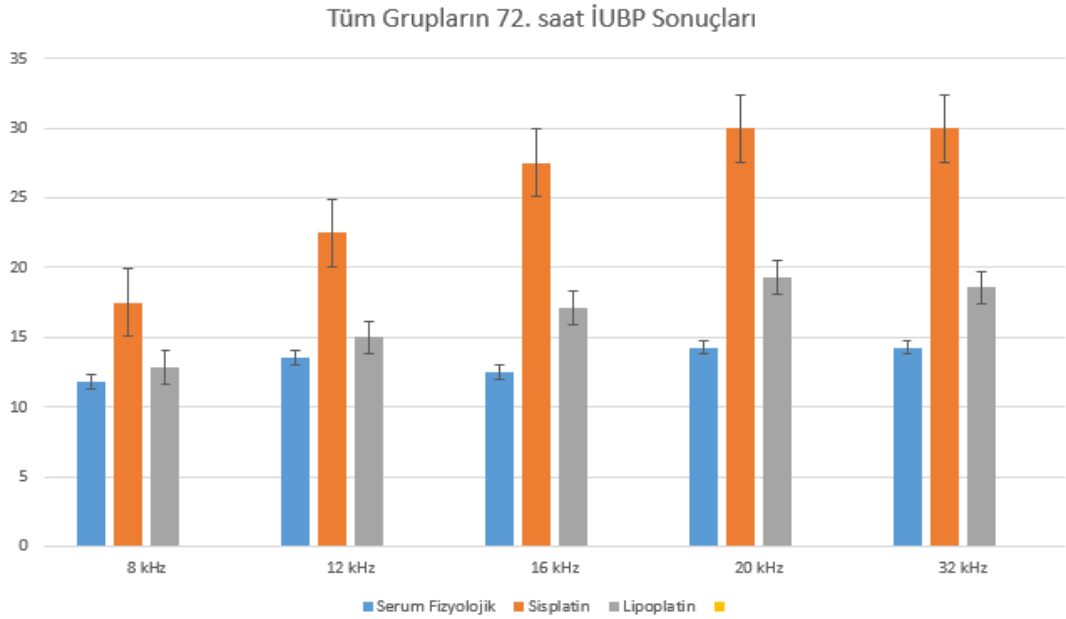
Kontrol grubu ile LİPO verilen gruplar arasında serum kreatinin düzeyleri arasında ( $p=0,805$ ) ve idrar kreatinin değerleri arasında ( $p=0,805$ ) istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı şekilde CDDP grubu ile LİPO verilen gruplar arasında serum kreatinin düzeyleri arasında ( $p=0,303$ ) ve idrar kreatinin değerleri arasında ( $p=0,535$ ) istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

#### **4.15. Tüm Gruplarda İşitsel Değerlendirme Sonuçları ve İstatistiksel Karşılaştırılması**

Wilcoxon testine göre tüm gruplarda işitsel fonksiyonlar değerlendirilmiştir. Buna göre serum fizyolojik verilen kontrol grubunda sağ kulak ve sol kulakta bazal ve 72. saat İUBP testlerinde 8,12,16,20 ve 32 kHz frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. CDDP verilen grupta sağ kulak ve sol kulakta bazal ve 72. saat İUBP testlerinde 8 kHz'te istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, 12,16,20 ve 32 kHz frekanslarında 72. Saatte bazal İUBP bulgularına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. LİPO verilen grupta sağ kulak ve sol kulakta bazal ve 72. saat İUBP testlerinde 8, 12,16 kHz frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, 20 ve 32 kHz frekanslarında 72. saatte bazal İUBP bulgularına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Özetle; CDDP grubunda 12,16,20 ve 32 kHz'de, LİPO grubunda ise 20 ve 32 kHz'de işitsel hasar oluşmuştur. (şekil 6 ve şekil 7).



**Şekil 10.** Tüm grupların bazal İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyel test sonuçları



**Şekil 11.** Tüm grupların serum fizyolojik, sisplatin ve lipoplatin uygulanmasından 72 saat sonraki işitsel uyarılmış beyinsapı potansiyel test sonuçları

Mann Whitney U testine göre, control grubu ile CDDP grubunu karşılaştırıldığında bilateral 8 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmezken 12,16,20,32 kHz frekanslarında ise bilateral anlamlı fark elde edildi. ( $p=0,002$ ). Kontrol grubu ile LİPO grubunu karşılaştırıldığında ise bilateral 8 ve 12 kHz’de

istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmezken, 16,20 ve 32 kHz'de istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir ( $p=0,003$ ). Sonuç olarak LİPO grubunda CDDP grubuna göre kısmi olarak daha iyi işitme eşikleri elde edilmiştir.



## 5. TARTIŞMA

Nöroblastom primordial nöral krest hücrelerinden gelişen, en sık görülen ekstrakraniyal yerleşimli solid bir tümördür ve tüm pediyatrik onkoloji alanındaki ölümlerin %15 'ini oluşturur. Sisplatin nöroblastom başta olmak üzere erişkin ve çocukluk çağı bir çok neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ajandır. Bununla birlikte nefrotoksisite, ototoksisite, miyelotoksisite, periferik nörotoksisite gibi doz kısıtlayıcı ciddi yan etkileri mevcuttur. LİPO, PEG kaplamalı, küçük, tek lamelli veziküllerin içerisindeki bir lipozomal sisplatin formulasyonudur. Lipozomal sisplatin olup 110-nanometre çapta bir nanopartiküldür ve lipid ve sisplatinden oluşur. Literatürde LİPO'nun sisplatine göre nefrotoksisitesinin daha az olduğuna dair iki araştırma bulunmasına rağmen, ototoksik etkilerinin araştırıldığı in vivo herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada subkutan ksenograft nude fare nöroblastom tümör modelinde LİPO uygulamasının sisplatin uygulamasına göre sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç dahilinde her grupta yedi atimik nude fare olmak üzere kontrol, CDDP ve LİPO gruplarında subkutan enjeksiyonla nöroblastom modeli oluşturulmuştur. Tümörde ve kulak (koklea, spiral ganglion) dokularında apoptoz ve nekroz yüzdeleri ile SOD2, INOS2 ve COX2 ekspresyon paterni değerlendirilmiştir. Ayrıca hayvanların ajan uygulanmasından önce bazal ve ajan uygulanmasından 72 saat sonra işitsel fonksiyonların değerlendirilmesi ile gruplar arası farklılıklar değerlendirildi.

Tümörde tüm gruplarda da apoptoz ve nekroz görülmüştür. Kontrole göre hem CDDP ( $p=0,006$ ) hem de LİPO ( $p=0,025$ ) belirgin olarak apoptoza neden olmuştur. Bu etkinin ajanlardan hangisi ile daha fazla sağlandığı değerlendirildiğinde LİPO uygulanan grupta CDDP uygulanan hayvanlara kıyasla belirgin olarak daha yüksek apoptoz yüzdesi (%61,15 vs %37,57) tespit edilmiştir. Bir başka deyişle LİPO 'nun tümördeki öldürücü etkisi CDDP 'den daha yüksek bulunmuştur. Ototoksik etki açısından spiral gangliondaki ölüm miktarları karşılaştırıldığında CDDP ve LİPO 'nun her ikisinin de kontrole kıyasla belirgin apoptoz ve nekroza neden olduğu görülmüştür. Ancak bu apoptoz ve nekroza neden olan istenmeyen etkinlik, CDDP verilen grupta belirgin olarak daha yüksek tespit edilmiştir ( $p=0,002$ ). Bu durum LİPO 'nin hipotezde

belirtildiği üzere CDDP 'ye kıyasla daha az ototoksik etkiye sahip olduğunu desteklemektedir. İşitsel fonksiyon değerlendirmesi sonucunda da görüldüğü üzere LİPO verilen grupta CDDP 'e kıyasla kısmi olarak daha iyi işitme eşiğinin saptanması, CDDP 'nin ototoksik doz sınırlayıcı yan etkisini gidermek üzere hem daha iyi sitotoksik etkisi hem de daha az ototoksik etkisi ile LİPO 'nin avantajlı olduğunu göstermektedir.

Antioksidan ve anti-inflamatuar mekanizmalarda önemli roller olan COX2, SOD2 ve İNOS ekspresyon paternleri değerlendirildiğinde COX2, CDDP verilen grupta koklea dokusunda eksprese olmazken LİPO ve Kontrol grubunda tüm hayvanlarda eksprese durumda aynı (+) paterne sahiptir (p=0,001). SOD2 ve İNOS2 'de böyle bir fark saptanmamıştır. COX-2, prostaglandin üretimi sürecinde kanser hücrelerinde pro-apoptotik nitrik oksit (NO) seviyelerini azaltmaktadır (Cao, 2002). .Bu anlamda literatürde bir kıyaslama mevcut değildir ancak Santos ve arkadaşlarının çalışmasında (2008) mitokondride üretilen reaktif oksijen türlerinin, CDDP'nin nefrotoksisitesini açıklayan hücrel hasarın ana nedeni olduğu öne sürülmektedir. Çalışma bulgularına göre sıçanlara tek bir CDDP (10 mg / kg vücut ağırlığı, i.p.) enjeksiyonu, antioksidan savunma molekülleri NADPH ve glutatyonun tükenmesine neden olmuş ve proapoptotik kaspaz-3'ün aktivitesini arttırmıştır (Santos ve ark, 2008). Yaptığımız çalışma sonucunda LİPO ve kontrol gruplarının koklea dokusunda COX2 'nin aynı pozitiflikte olması LİPO 'nun pro-apoptotik faktörleri azaltarak koklea hücrelerinin apoptozunu önleyebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde LİPO ile CDDP 'nin sitotoksik etkisinin ve yan etki profilinin kıyaslandığı in vivo çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. In vitro ve in vivo araştırmalar LİPO'nun CDDP ile karşılaştırıldığında daha az nefrotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ilerlemiş gastrik kanser tedavisi için LİPO ile hemoradyoterapi, faz 1/2 çalışmasında hafif toksisite göstermiştir. Bir başka çalışmada LİPO tedavisinin klinik çalışmalarda akciğer ve meme kanseri tedavisinde CDDP'den daha az renal toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla beraber, LİPO, CDDP-duyarlı ve dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde anti-tümör etkisi göstermiştir. Bu tümör tipinde apoptoz, kaspazlar 3, 8 ve 9 aktivasyonu ile indüklenmiş, Bax upregulasyonu ve Bcl-2 downregulasyonu gerçekleşmiştir. LİPO, doksorubisin ve albumin-bağlı paklitaksel abraksan ile sinerjistik etki kombinasyonuna neden olmuştur. Ayrıca,



LİPO, over ksenogreft tümör büyümesini, minimum sistemik toksisite ile inhibe etmiştir. Başka bir in vitro çalışmada, LİPO'nun anti-tümör ve apoptotik etkisi, CDDP'den daha yüksek bir dozda nöroblastom hücrelerinde belirlenmiştir (Serinan ve ark, 2018; Altun ve ark, 2014).

Bu araştırma LİPO ve CDDP 'nin nöroblastom in vivo modelinde birçok mekanizma dahilinde etkilerini karşılaştıran ilk çalışma olmuştur. Bu özgün değeri araştırmanın güçlü yanını oluşturmaktadır. Araştırmanın sınırlılıkları değerlendirildiğinde çalışmada deney hayvanı kullanıldığı için tümör oluşum süresinin standart olmaması, işitsel fonksiyon değerlendirmesi sırasında anesteziye bağlı ölümler, ilaç uygulamaları ardından nedeni belirlenemeyen ölümlerin gerçekleşmesi, eş zamanlı olarak tüm grupların sakrifikasyonunun gerçekleştirilememesi gibi araştırma sınırlılıkları ile karşılaşılmıştır.

Araştırma sonucunda LİPO 'nin tümördeki apoptoz indükleyici etkisi, kokleadaki pro-apoptotik faktörleri inhibe edici COX2 ekspresyonu sağlaması, spiral ganglionda CDDP 'den daha az düzeyde apoptoz ve nekroza neden olması ve işitsel eşik değerinin CDDP verilen gruptan kısmen daha yüksek olması bulguları elde edilmiştir. Tüm bu bulgular literatürle uyumlu olarak LİPO, CDDP 'nin doz sınırlayıcı yan etkilerini büyük ölçüde gidererek ve bununla beraber tümörde güçlü apoptoz indükleyici etkinliği ile daha güvenli ve etkin bir kemoterapötik yaklaşım imkanı sunmaktadır. Literatürde LİPO 'nin CDDP'e kıyasla tümördeki etkinliği açısından avantajı, büyüyen tümörün vaskülatürünün geçirgenliğini kullanarak ve insan çalışmalarında gösterildiği gibi tümör dokusuna normal dokuya kıyasla daha büyük bir hasara neden olmak üzere, primer tümörleri ve metastazları hedefleme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanopartiküllerin ya fagositoz yoluyla ya da hücre zarı ile doğrudan füzyon yoluyla tümörler tarafından alındığı öne sürülmektedir. Araştırma bulgularımızdaki LİPO avantajlarının tümör, mikroçevre ve diğer sağlık doku hücrelerindeki hangi moleküler yollar üzerinden gerçekleştiği bir sonraki çalışmalarda değerlendirilmesi önerilmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada subkutan ksenograft nude fare nöroblastom tümör modelinde LİPO uygulamasının CDDP uygulamasına göre sitotoksik, sitostatik, ototoksik ve nefrotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ana hipotez, LİPO uygulamasının CDDP ‘nin sağlıklı dokulardaki öldürücü etkisinden belirgin düzeyde daha az olacağı şeklinde kurulmuş olup araştırma bulgularımız spiral ganglion, koklea ve kreatin değerleri ile bu hipotezi desteklemektedir. Bununla beraber araştırmanın alt sorularına yanıtlar elde edilebilmiştir. Buna göre LİPO ‘nun tümördeki apoptoz ve nekroz etkisi CDDP ‘den farklı ve daha güçlü bulunmuş, spiral ganglionda LİPO, CDDP ‘den farklı olarak daha düşük ölüme neden olmuş, kokleada COX2 ekspresyon paterni LİPO ile kontrolde aynı olup CDDP’den farklı tespit edilmiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında ileri çalışmalarda LİPO ‘nun CDDP ‘ne kıyasla bu güvenilir ve güçlü etkilerinin tümör- tümör mikroçevresi dahilinde ve hangi moleküler mekanizmalar ve yollar üzerinden gerçekleştiğine dair detaylı incelemeler yapılması önerilmektedir.

## **7. KAYNAKLAR**

Altun Z, Olgun Y, Ercetin P, Aktas S, ve ark. Protective effect of acetyl-l-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis- related genes and pro-inflammatory cytokines. *Cell Prolif* 2014; 47: 72-80.

Applebaum M.A, Henderson T.O, Lee S.M, Pinto N, ve ark. Second malignancies in patients with neuroblastoma: The effects of risk-based therapy. *Pediatr. Blood Cancer* 2015; 62: 128–133.

Arakawa A, Oguma E, Aihara T. Long-term followup results of the observation program for neuroblastoma detected at 6-month mass screening. *The Journal of Pediatrics*. 2014; 165(4): 855-857.

Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *New Engl J Med*. 2010; 363:1313–1323.

Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin M.A, ve ark. Platinum compound-related ototoxicity in children: Long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*. 2004; 26: 649–655.

Bragado P, Armesilla A, Silva A, Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*. 2007; 12:1733-1742

Cao Y. and Prescott, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2002; 190(3): 279-286.

Catsman-Berrevoets CE, Aarsen FK, Van Hemsbergen ML. Improvement of neurological status and quality of life in children with opsoclonus myoclonus syndrome at long-term follow-up. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 53:1048–1053.

Cohen L.E, Gordon J.H, Popovsky E.Y, Gunawardene S, ve ark. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma:High incidence of endocrine and growth problems. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49: 502–508

Cook MN, Olshan AF, Guess HA. Maternal medication use and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol*. 2004;159:721–731.

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740:364-378.

De Fine Licht S, Rugbjerg K, Gudmundsdottir T, Bonnesen T.G, ve ark. Long-term inpatient disease burden in the adult life after childhood cancer in scandinavia (ALiCCS) study: A cohort study of 21,297 childhood cancer survivors. *PLoS Med.* 2017; 14: e1002296.

De Grandis E, Parodi S, Conte M. Long-term follow-up of neuroblastoma-associated opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome. *Neuropediatrics.* 2009; 40:103-11

Gorman MP. Update on diagnosis, treatment, and prognosis in opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 2010; 22:745–750.

Grewal S, Merchant T, Reymond R, McInerney M, ve ark. Auditory late effects of childhood cancer therapy: A report from the children’s oncology group. *Pediatrics* 2010, 125, e938–e950.

Henderson TO, Bhatia S, Pinto N. Racial and ethnic disparities in risk and survival in children with neuroblastoma: a Children’s Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2011; 29:76–82.

Hiyama E, Iehara T, Sugimoto T. Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population based cohort study. *Lancet.* 2008; 371:1173–1180.

Huang M, Weiss W. A. “Neuroblastoma and MYCN,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2013; 3(10): e1014415.

Irwin MS, Park JR. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin NA.* 2015; 62:225–256.

Kalkavan CŞ. Ototoxik ajanların iç kulak üzerine olan etkilerinin otoakustik emisyon ile fonksiyonel olarak değerlendirilmesi. İstanbul, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,Uzmanlık Tezi. 2009;1-40.

Knight K.R, Kraemer D.F, Neuwelt E.A. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 8588–8596.

Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK. Purged vs. non-purged peripheral blood stem cell transplantation for high risk neuroblastoma (COG A3973): a randomized phase III trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14:999–1008.

Kushner B.H, Budnick A, Kramer K, Modak S, ve ark. Ototoxicity from high-dose use of platinum compounds in patients with neuroblastoma. *Cancer* 2006; 107: 417–422.

Landier W, Knight K, Wong F.L, Lee J, ve ark. Ototoxicity in children with high-risk neuroblastoma: Prevalence, risk factors, and concordance of grading scales—A report from the children’s oncology group. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32: 527–534.

Laverdiere C, Cheung N.K, Kushner B.H, Kramer, K, ve ark. Long-term complications in survivors of advanced stage neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* 2005; 45: 324–332.

Laverdiere C, Liu Q, Yasui Y, Nathan P.C, ve ark. Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: A report from the childhood cancer. 2011; 12:189-195

Li Y, Womer R.B, Silber J.H, Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose. *Eur. J. Cancer* 2004; 40: 2445–2451.

Maris J.M, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn S.L. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007; 369(9579): 2106- 2120.

Maris JM, Woods WG. Screening for neuroblastoma: a resurrected idea? *Lancet.* 2008; 371:1142–1143.

Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:1291-1295.

Matthay KK, Blaes F, Hero B. Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma: a report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. *Cancer Lett.* 2005; 228:275–282

Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: A Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1007–1013.

Menegaux F, Olshan AF, Nelgia JP. Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiol.* 2004; 159:843–851.

Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004; 75:727–730

Navarro S, Amann G, Beiske K. Prognostic value of international neuroblastoma pathology classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol. *J Clin Oncol.* 2006; 24:695–699.

Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:858–865.

Parsons S.K, Neault M.W, Lehmann L.E, Brennan L.L, ve ark. Severe ototoxicity following carboplatin-containing conditioning regimen for autologous marrow transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 669–674.

Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV. Revision of the international neuroblastoma pathology classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer.* 2003; 98:2274–2281.

Rohrer T, Trachsel D, Engelcke G. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 33:71–76.

Ryu N.G, Moon I.J, Chang Y.S, Kim B.K, ve ark. Cochlear implantation for profound hearing loss after multimodal treatment for neuroblastoma in children. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2015; 8: 329–334.

Santos NA, Bezerra CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and

apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:145-1055.

Schilling FH, Spix C, Berthold F. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med.* 2002; 346:1047–1053.

Serinan E, Altun Z, Aktaş S, Cecen E, Olgun N. Comparison of Cisplatin with Lipoplatin in Terms of Ototoxicity. *J Int Adv Otol* 2018; 14(2): 211-5.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the international neuroblastoma pathology committee. *Cancer.* 1999; 86:349–363.

Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave- Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer.* 2004; 42:99–105.

Sholler G, Ferguson W, Bergandahl G. DFMO maintains remission and increases overall survival in high-risk neuroblastoma: results of a phase ii prevention trial. Presented at the Advances in Neuroblastoma Research Conference, Cairns, Australia, 2016 June

Simon T, Hero B, Dupuis W, Selle B, ve ark. The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma. *Klin. Padiatr.* 2002; 214: 149–152.

Stine Z. E, Walton Z. E, Altman B. J, Hsieh A. L. “MYC, metabolism, and cancer,” *Cancer Discovery.* 2015; 5(10): 1024–1039.

Strother DR, London WB, Schmidt ML. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low risk neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30:1842–1848.

Trahair T.N, Vowels M.R, Johnston K, Cohn R.J, ve ark. Long-term outcomes in children with high-risk neuroblastoma treated with autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 741–746.

Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004; 74:761–764.

- Whittle S. B, Smith V, Doherty E, Zhao S. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2017; 369–386,
- Woods WG, Gao RN, Shuster JJ. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2002; 346:1041–1046.
- Yalcin B, Kremer LCM, van Dalen EC. High dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell rescue for children with high risk neuroblastoma (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 10: CD006301.
- Yamamoto K, Ohta S, Ito E. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol*. 2002; 20:1209–1214
- Yanik GA, Parisi MT, Shulkin BL. Semiquantitative MIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children’s Oncology Group. *J Nucl Med*. 2013; 54:541–548.
- Yu A. L, Gilman A. L, Ozkaynak M. F. “Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 14, pp. 1324–1334, 2010.
- Zage PE, Louis CU, Cohn SL. New aspects of neuroblastoma treatment: ASPHO 2011 symposium review. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 58:1099–1105.



## 8. EKLER

### EK-1: Etik Kurul Raporu

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

35390 İncirli, İzmir-Tel: 0232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yılı : 04/24/2016  
Toplantı Tarihi : 27 Aralık 2016

Sayın,Uzm.Dr.Yüksel OLGUN  
DEÜ Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

**75/2016 Protokol No'lu;** yürütücüsü olduğunuz **"In vivo nöroblastom tümör modelinde sisplatin ve lipoplatinin sitotoksik, nefrotoksik ve ototoksik etkilerinin karşılaştırılması"** isimli; Hatice Nur Olgun, Safiye Aktaş, Günay Kırkım, Zekiye Altun, Osman Yılmaz, H.Efsun Kolatın, Hande Evin, Efe Serinlerin araştırmacı olduğu, 21 adet fare'nin verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı (Araştırmacı)	Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye (Araştırmacı)	Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN Üye (Araştırmacı)
Prof.Dr. Gülgün OKTAY Üye(Topl. Katılmadı)	Prof.Dr. Günay KIRKIM Üye (Araştırmacı)
Doç.Dr.Nergiz DÜRMÜŞ Üye	Prof.Dr. Pembe UYGUN KEŞİNOĞLU Üye
Doç.Dr.Türkan ERTAY Üye	Doç.Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye
Doç.Dr. Zekiye Sultan ALTUN Üye (Araştırmacı)	Yard.Doç.Dr. Orhan KALEMCI Üye
Zehra KINAM Üye	Vet Hekim Adnan SERPEN Üye

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

## EK 2 : ÖZGEÇMİŞ

<b>TC Kimlik No / Pasaport No:</b>	11536056478
<b>Doğum Yılı:</b>	1986
<b>Yazışma Adresi :</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB AD İsteme-Konusma-Denge Unitesi Inciralti İzmir 35340 İzmir/Türkiye
<b>Telefon :</b>	232-4123291
<b>Faks :</b>	232-4123269
<b>e-posta :</b>	handevin1@gmail.com

## EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Erciyes Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2009
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kulak-Burun-Boğaz Odyoloji	Yüksek Lisans	2012-2015

## AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	SHMYO Odyometri Programı	Öğretim Görevlisi	2017-

## UZMANLIK ALANLARI

<b>Uzmanlık Alanları</b>
Diğer

## DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

<b>Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı</b>		
<b>Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı</b>		
<b>Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı</b>		
<b>Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı</b>	<b>Tamamlanan</b>	<b>Devam Eden</b>
	<b>Yüksek Lisans</b>	
	<b>Doktora</b>	
	<b>Uzmanlık</b>	
<b>Diğer Faaliyetler</b> (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)		

## ÖDÜLLER

<b>Ödülün Adı</b>	<b>Alındığı Kuruluş</b>	<b>Yılı</b>
-------------------	-------------------------	-------------

## YAYINLARI

## Diger yayınlar

---

**Düzenleme Tarihi : 12.12.2018**

