

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İNTRATİMPANİK İLAÇ KULLANIMI DENEYSEL
HAYVAN MODELİ

UZMANLIK TEZİ

DR. BÜLENT KAMİL AYKAL

DANIŞMAN

PROF.DR. FAZIL NECDET ARDIÇ

DENİZLİ 2015

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İNTRATİMPANİK İLAÇ KULLANIMI DENEYSEL
HAYVAN MODELİ

UZMANLIK TEZİ

DR. BÜLENT KAMİL AYKAL

DANIŞMAN

PROF.DR. FAZIL NECDET ARDIÇ

BU ÇALIŞMA PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON
BİRİMİ'NİN 07.03.2013 TARİH VE 01 SAYILI 2013TPF005 NUMARALI KARARI İLE
DESTEKLENMİŞTİR.

DENİZLİ 2015

Prof. Dr. Fazıl Necdet ARDIÇ danışmanlığında Dr. Bülent Kamil AYKAL tarafından yapılan “İntratimpanik İlaç Kullanımı Deneysel Hayvan Modeli” başlıklı tez çalışması 29/04/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof.Dr. Fazıl Necdet ARDIÇ

ÜYE : Prof.Dr. Bülent TOPUZ

ÜYE : Prof.Dr. Ahmet Onur ODABAŞI

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.
.../.../....


Prof. Dr. Günfer TURGUT
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışma onuruna sahip olduğum, bana mesleğimden önce sabrı, hoşgörüyü öğreten, bilgi ve deneyimlerinden her zaman faydalandığım, yetişmemde büyük katkısı ve emeği olan hayatıma örnek aldığım saygıdeğer tez hocam Prof. Dr. Fazıl Necdet Ardiç'a,

Uzmanlık eğitimime büyük katkıları olan mesleki bilgi ve tecrübelerini aktarmaktan mutluluk duyan, mesleki ve sosyal hayatımda her zaman yanımda olacaklarını bildiğim saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Bülent Topuz ve Prof. Dr. Cüneyt Orhan Kara'ya

Tezimin hazırlanması süresince yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü'nden hocam Prof. Dr. Emin Erdem'e,

Varlığı ile beni her zaman rahatlatan ve her zaman destekleyen ve daima yanımda olacağını bildiğim canım ablam Uzm. Dr. Funda Tümkaya'ya,

Eğitimimin son 2 yılında aramıza katılan değerli hocam Yard. Doç. Dr.Fethullah Kenar'a,

Zorlu asistanlık sürecinde daima birlikteliklerinden keyif aldığım dostlarım, sevgili kardeşlerim asistan arkadaşlarıma,

Ameliyathane ve poliklinik koşullarında zamanı paylaştığım tüm mesai arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde emeğini esirgemeyen sevgili aileme,

Asistanlık sürecinde her zaman yanımda olan, sıkıntımı ve sevincimi paylaştığım, “kahrımı” çeken sevgili eşim Sezen'e, kızım Nehir'e ve hayatımıza 1 yıl önce katılan oğlum Emir Ege'ye,

Sevgi, teşekkür ve saygılarımla... İyi ki varsınız...

Dr. Bülent Kamil Aykal

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR VE SİMGELER	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XII
1.GİRİŞ	XIV
2.GENEL BİLGİLER	1
2.1 İç Kulağa İlaç Geçişi.....	1
2.2 İç Kulakta İlaç Dağılımı.....	3
2.3 IT İlaç uygulama metodları.....	3
2.4 Aminoglikozidler.....	6
2.4.1 Gentamisin Ototoksitesisi.....	7
2.4.2.1 Serbest Oksijen Radikalleri.....	7
2.4.2.2 Apoptozis.....	8
2.4.2 Klinik Uygulama Protokolleri	10
2.5 Glukokortikoidler	12
2.5.1 Klinik uygulama Protokolleri.....	14

	Sayfa No
2.6 Guinea Pig Temporal Kemik Anatomisi.....	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1 Kullanılan Deney Hayvanları.....	18
3.2 Deney Protokolü.....	18
3.3 Deney Grupları	19
3.4 Disseksiyon	20
3.5 Kimyasal Ölçümler.....	22
3.5.1 Dekametazon İçin Kalibrasyon Numuneleri Hazırlanması	22
3.5.2 Gentamisin İçin Kalibrasyon Numuneleri Hazırlanması...	23
4.BULGULAR	25
5.TARTIŞMA	47
6.SONUÇ	53
KAYNAKLAR	54

KISALTMALAR SİMGELER

İT: İntratimpanik

MH: Menier Hastalığı

YPM: Yuvarlak Pencere Membranı

BDFN: Brain derived neurotrophic factor

Dex HA: Dexhamethazone-hyalüronik asit

PLGA: poly-lactic/glycolic asit

Ca: Kalsiyum

DNA: Deoksiribonükleik asit

JNK: c-JUN N-terminal kinaz

cAMP: siklik adenozin monofosfat

Na: Sodyum

mg: Miligram

ml: Mililitre

D: Deksametazon

G: Gentamisin

ppm: Parts per million (mg çözünen/kilogram veya litre çözelti)

nm: Nanometre

UV: Ultraviyole

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

TMPA: Trimethylphenylammonium

ST: Skala Timpani

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Deksamatazon 0,5 saat ilaç derişimleri	26
Tablo 2. Deksametazon 2 saat ilaç derişimleri	27
Tablo 3. Gentamisin 0,5 saat ilaç derişimleri	28
Tablo 4. Gentamisin 2 saat ilaç derişimleri	29
Tablo 5. Gentamisin-Deksametazon 0,5-2 saat ortalama değerleri.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Guinea pig bulla,koklea ve timpanik membranı	17
Şekil 2. Enjeksiyon,diseksiyon ve dondurma işlemi yapılmış temporal kemik.....	21
Şekil 3. Denek 4 deksametazon için 0,5 saat UV grafiği.....	30
Şekil 4. Denek 5 deksametazon için 0,5 saat UV grafiği.....	31
Şekil 5. Denek 9 deksametazon için 2 saat UV grafiği.....	32
Şekil 6. Denek 10 deksametazon için 2 saat UV grafiği	33
Şekil 7. Gentamisin 0,5 saat sağ sol kulak derişim karşılaştırması.....	35
Şekil 8. Gentamisin 2 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması.....	36
Şekil 9. Deksametazon 0,5 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması.....	37
Şekil 10. Deksametazon 2 saat sağ-sol kulak karşılaştırması.....	38
Şekil 11. Deksametazon yapılan sol kulakların 0,5.saatteki koklea bölge-derişim grafiği...	39
Şekil 12. Deksametazon yapılan sol kulakların 2.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	40
Şekil 13. Deksametazon yapılan sağ kulakların 0,5.saatteki koklea bölge-derişim grafiği...	41
Şekil 14. Deksametazon yapılan sağ kulakların 2.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	42
Şekil 15. Gentamisin yapılan sol kulakların 0,5.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	43
Şekil 16. Gentamisin yapılan sol kulakların 2.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	44
Şekil 17. Gentamisin yapılan sağ kulakların 0,5.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	45
Şekil 18. Gentamisin yapılan sağ kulakların 2.saatteki koklea bölge-derişim grafiği.....	46

ÖZET

İntratimpanik ilaç kullanımı deneysel hayvan modeli

Dr. Bülent Kamil Aykal

İntratimpanik ilaç uygulamaları son yıllarda iç kulak hastalıkları tedavisinde giderek artan bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Bu amaçla en sık kullanılan ilaçlar kortikosteroidler ve aminoglikozidlerdir. İT olarak uygulanan ilaçların kokleaya geçtiği bilinmektedir. Ancak ilacın iç kulak dağılımı ve bu bölgelerdeki konsantrasyonu hakkında sınırlı bilgi vardır. Amacımız yeni bir deney hayvanı modeli oluşturarak YPM'ına lokal olarak uygulanan ilaçların iç kulaktaki varlığını, dağılımını ve konsantrasyonlarını göstermektir. Bu şekilde ileride kullanılabilecek yeni ilaçların ve özellikle de kök hücre tedavilerinin önünü açmaktır.

Bu amaçla yeni bir deney hayvanı modeli oluşturuldu. Tolamda 14 adet albino guinea pig kullandığımız çalışmada 10 adet deneğin sol kulağına deksametazon,4 adet deneğin yine sol kulağına gentamisin IT olarak uygulandı. Bütün deneklerin işlem yapılmayan sağ kulakları kontrol grubu olarak kullanıldı. Belli zaman dilimleri sonrasında (0,5–2 saat) denekler sakrifiye edilerek hızla temporal kemikleri çıkarıldı. Kokleaları açığa çıkarılan temporal kemikler sıvı nitrojen tankında yaklaşık 5 dakika bekletilip dondurulduktan sonra koklea parçalara ayrıldı. Vestibül ayrı olarak çıkarıldı. Daha sonra numuneler UV spektrofotometre ile ölçülerek ilaç konsantrasyonları belirlendi.

Deksametazon grubunda 0,5 saatte en yüksek ilaç konsantrasyonu vestibülde çıkarken,2 saatlik grupta en yüksek konsantrasyon koklea bazal kısımda tespit edildi. Koklea bazal kısım ile apeks arasındaki farklılık literatürle uyumlu görüldü. Gentamisin grubunda ise her 2 zaman diliminde de en yüksek ilaç konsantrasyonları vestibülde görüldü.

Bugüne kadar ortaya konan modellerden elde edilen veriler sınırlıdır. Üzerinde çalıştığımız modelle daha kesin sonuçlar elde edilmiştir. Her üç skaladaki (timpani, vestibuli ve media) toplam ilaç konsantrasyonunun aynı anda ölçülmesi bu modelin etkinliğini kısıtlayan bir nedendir. Bu metod farklı ilaçların iç kulak etkilerinin denenebilmesine uygundur.

ABSTRACT

Intratympanic drug use in experimental animal model

Dr. Bülent Kamil Aykal

It is well known that drugs administered intratympanically pass through the round window membrane and spread among the inner ear. There were small number of studies that show distribution of these drugs. They all have limitations like cerebrospinal fluid contamination.

Our purpose is to establish a new model to measure the amount of the drugs in the different parts of the inner ear.

Fourteen albino guinea pigs were used in the experiment Dexamethasone was applied to 10 guinea pigs' left ears, Gentamicin IT was applied to 4 guinea pigs' left ears again. Ten albino guinea pigs were used in Dexamethasone group. Dexamethasone (4 mgr/ml) were applied intratympanically left ears of the subjects. Right ears were selected as a control group. The experiment was terminated at two different time period. Group A (5) were sacrificed 0,5 hours later. Group B (5 animals) were sacrificed 2 hours later.

The temporal bones dissected quickly. The antrum and middle ear cavity were washed with the %0,9 NaCl for contamination. Cochlea and surrounding bone separated from the temporal bone, covered with aluminum folio and then put into the liquid nitrogen tank for 5 minutes. The frozen specimens were divided into 4 parts quickly, stored in refrigerator with Eppendorf tubes at -5° C. The four parts were basal turn, second turn, apex and vestibule.

The specimen were weighed, prepared and measured with UV spectrophotometry. The highest drug concentration was in the vestibule (11.01 ± 12.17) at 0,5 hour while it was basal turn of the cochlea (11.57 ± 20.72) at 2 hours.

It is possible to measure exact drug concentrations with this method. The limitation of this model is to show the total amount of drug in the three scalas (Tympani, vestibuli and media) together.

1.GİRİŞ

İntratimpanik (İT) tedaviler günümüzde koklear hastalıkların tedavisinde popülarite kazanmaya başlamış minimal invazif bir tedavi yöntemidir. Tanısı ve etyolojisi hala tam olarak aydınlatılamayan koklear hastalıkların tedavisinde birçok medikal ve cerrahi tedavi yöntemiyle birlikte veya tek başına kullanılmaktadır. Koklear hastalıklar içerisinde Meniere hastalığı(MH), ani sensörinöral işitme kayıpları, otoimmün iç kulak hastalıkları, tinnitus ve progresif sensörinöral işitme kayıpları sayılabilir. İT tedaviler, son yıllarda özellikle MH ve ani işitme kaybı tedavisinde giderek artan sıklıkta kullanım alanı bulmaktadır.

İT tedavi metodu, çeşitli ilaçların sıvı formda orta kulağa enjekte edilmesidir. Bu yöntemde amaç orta kulaktaki ilacın yuvarlak pencere yoluyla diffüzyonla emilerek iç kulak sıvılarına geçmesi ve diğer yollarla ulaşamayacak çok yüksek dozlarda etki etmesidir. Yuvarlak pencereye topikal uygulanan ilaçların, daha çok bazal kıvrım bölgesindeki skala timpanide yoğunlaştığı ve diğer bölgelere eşit dağılmadığı bilinmektedir. Bu dağılımı etkileyen faktörler, ilacın difüzyon kapasitesi ve atılma süresidir(1,2).

Yayınlanan birçok çalışmada İT tedavinin denge ve işitme ile ilgili iç kulak hastalıklarında yararlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. En çok kullanılan ilaçlar kortikosteroidler ve aminoglikozid antibiyotiklerdir. Çeşitli antioksidan ilaçlar ve aldesteron konusunda çalışmalar devam etmektedir. Yapılan öncü çalışmalarda bu yolun aynı zamanda kök hücre ve gen tedavileri içinde oldukça umut verici olduğu gösterilmiştir.

İT tedavi 1950'li yıllarda anestezi ajanlar ve antibiyotiklerin MH'nın tedavisi için kullanılmasıyla başlamıştır. Yüz güldürücü klinik sonuçların yayınlanmasından sonra bu konuda fizyopatolojiye yönelik daha güçlü çalışmalar yapılmıştır. Verilen ilacın iç kulağa emilimi, buradaki farmakodinamiği ayrıntılı olarak incelenmeye başlanmıştır. İç kulak, çok farklı dinamiği olan, iki farklı kompozisyondaki sıvının farklı kanallarda dolaştığı, beyin omurilik sıvısı ile ilişkili, kemiğin içine gömülü bir organdır. Bu yüzden bu konuda yapılan çalışmalar hep teknik güçlüklerle karşılaşmış ve bunlar farklı yollardan aşılmaya çalışılmıştır.

1990 yıllarda hayvan deneylerinin yaygınlaşmasıyla intratimpanik tedavinin farmakodinamiği daha iyi anlaşılmaya başlamıştır. Hayvan modellerinde orta kulağa verilen ilacın kokleanın çeşitli bölgelerindeki dağılım ölçülmeye çalışılmıştır. Burada temel sorun perilenfın örneklenmesinde ortaya çıkmaktadır. Yuvarlak pencereden alınan perilenf örneklerinde önemli oranda beyin omurilik sıvısı kontaminasyonu görülmektedir(3). Buna alternatif olarak sunulan apikal sıralı örnekleme metodunun sonuçları ümit vericidir(4). Fakat bu yöntemle de sadece koklear bölümden örnek alınırken, vestibüler bölümlerden örnek alınamamaktadır. İlacın markerlarla işaretlenmesi ve doku takibi metodu ulaşılan ilaç konsantrasyonu hakkında bilgi vermemekte sadece ilacın orada olduğunu göstermektedir. Bunlara dayanarak bilgisayarlı simülasyonlar geliştirilmiş ve koklea diğer kısımlarındaki ilaç miktarı tahmin edilmiştir. Bu yöntemi doğrulayacak bir çalışma yapılmamıştır. Aynı zamanda koklea dışında, iç kulağın diğer bölgelerindeki ilaç konsantrasyonu konusunda bilgi elde edilememiştir.

Bu çalışmanın amacı iç kulakta ilaç dağılımını gösteren yeni bir model oluşturmaktır. Hem daha önce ortaya konmuş modellerle oluşturulan simülasyonların doğruluğu denetlenecektir, hem de bütün uygun ilaçlar iç kulak etkileri açısından daha yeterli bir şekilde denenebileceklerdir.

2.GENEL BİLGİLER

Koklear hastalıkların tedavisinde, İT ilaç uygulamaları son yıllarda popülarite kazanmış ve MH'daki vertigo kontrolünde en sık kullanılan tedavi yöntemleri arasına girmiştir. Yarım yüzyıl önce lokal anestezi ve antibiotikler MH tedavisinde kullanılmıştır(5).

İT olarak uygulanan gentamisin MH'nın vestibüler semptomları üzerinde etkili bir tedavi yöntemi olduğu 1990'lerden beri bilinmektedir. Aminoglikozidler ve lokal anesteziye ek olarak çok çeşitli ilaçlar ekstrakoklear olarak yuvarlak pencere nişine uygulanmıştır; bu ilaçlar tinnitus için nörotransmitterler ve antagonistleri, otoimmün iç kulak hastalıklarının için monoklonal antikorlar, gürültüye bağlı işitme kaybı için apoptozis inhibitörleridir. Glukokortikoidlerin, kullanımını destekleyen kanıtlar sınırlı da olsa MH'da, idiopatik ani işitme kaybında, otoimmün iç kulak hastalığında ve tinnitus tedavisinde en yaygın kullanılan İT ilaçlar haline gelmişlerdir(5).MH tedavisinde vestibuler fonksiyonların ablasyonunda vestibulotoksik etkisi daha belirgin olan gentamisin, medikal tedavi ile kontrolü zor vertigolu hastalarda başarıyla kullanılmaktadır(6).

2.1 İç Kulağa Geçiş:

İT tedavinin, diğer tedavi yöntemlerine göre başlıca 2 önemli avantajı vardır: İlacın direk yuvarlak pencere membranı yoluyla geçişi sonucu yüksek perilenf düzeyleri elde edilmesi ve ilacın sistemik yan etkilerinden kaçınılmış olması(6).

Uygulanan ilacın orta kulaktan iç kulak perilenfine geçiş yolları; en fazla YPM olmak üzere,oval pencere etrafındaki annüler ligaman, otik kapsüldeki küçük laminalar, preforme yollar(anomali, kırık gibi),kan ve lenfatik kapillerlerdir(6).

YPM, insanlarda, maymunlarda kedigillerde ve kemirgenlerde 3 ana katman içerir; orta kulak kavitesini kaplayan epitel dokudan oluşan dış tabaka, konnektif dokudan oluşan orta tabaka ve skala timpani perilenfinin yüzeyini kaplayan iç selüler tabaka(7).

Dış tabakanın hücreleri arasında sıkı bağlantılar(tight junctions),orta tabakada fibroblastlar, fibrositler, kollegen, elastin, kapiller damarlar, myelinli ve miyelinsiz

sinir dokuları olduğu gösterilmiştir. Dış tabakadaki sıkı bağlantılar ve devamındaki bazal membran, iç kulağı orta kulak enfeksiyonlarından koruyan bariyer görevi görür. Bu hücreler içinde yer alan iyi gelişmiş endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi orta kulaktan iç kulağa geçişin aktif transport ile olabileceğini gösterir. Özellikle orta tabakada yoğun olarak bulunan konnektif doku YPM'nin kompliansını sağlamaktadır. İç epitel tabaka ise perilenfe doğru uzanım gösteren pinositik veziküller ve intrasellüler komponentler içerir. Bu yapılarda YPM'da aktif bir transport olduğunu gösterir(8).

Membran geçirgenliğinin deneysel manipulasyonlara duyarlı olduğu gösterilmiştir. Lokal anestezipler, endotoksin ve ekzotoksinler, histamin, yuvarlak pencere nişinin kurutulması, osmotik değişiklikler ve uygulanan solüsyonda benzil alkol olması membran geçirgenliğini artırır(5). Chanrasekhar ve ark. nın yaptıkları çalışmada histamin, hyalüronik asit ve dimetil sülfoksit adjuvanlarının deksametazonun YPM'dan perfüzyonunu artırıp arttırmadığını karşılaştırılmış. Deksametazonun histaminle olan kombinasyonunda, diğer kombinasyonlara oranla çok daha yüksek perilenf steroid düzeyleri elde edilmiş(9).

Maddelerin yuvarlak pencere membranından geçişi, maddenin boyutuna, elektrik yüküne ve membranın kalınlığına bağlıdır. Koklear sıvılarda gentamisin hareketlerinin simülasyon programı ile incelendiği çalışmada yuvarlak pencere membran alanı ve skala timpani ile geometrik ilişkisi, vestibül boyutu, YPM permeabilitesi, gentamisin difüzyon oranı ve gentamisinin iç kulaktan temizlenme oranının sonuçları etkilediği belirtilmiştir(10).YPM, insanlarda diğer küçük memelilere göre daha kalındır(11).Orta kulağın inflamasyonu sonrası membran kalınlığı artabilir. Ratlarda yapılan bir çalışmada, pürülan otitis media sonrası membran kalınlığının yaklaşık 5 kat arttığı gösterilmiştir(12).Yapılan diğer bir çalışmada YPM kalınlığının Pseudomonas ekzotoksini maruziyeti sonucu 2 kat arttığı ve permeabilitesinin azaldığı ifade edilmiştir(13).Buna karşılık, YPM'da yıkıma yol açarak membranda incelmeye neden olan Streptolizin-O' nun permeabiliteyi arttırdığı gösterilmiştir(14).

Alzamil ve Linthicum yaptıkları 202 temporal kemiği içeren çalışmalarında, bireylerin %22'sinde yuvarlak pencere membranının bilateral bir tür zar, yağ veya

fibröz doku ile kaplı olduğunu gösterdiler. %21 kulakta ise tek taraflı obstrüksiyon tespit edilmiştir. Yuvarlak pencere nişini obstrükte eden tıkaçın kalınlığı ise yaklaşık 1 mm olarak tespit edilmiştir(YPM'nın kalınlığı yaklaşık 20 µm'dir)(15). Yapılan bir diğer çalışmada ise 41 hastanın %17'sinde parsiyel,%12'sinde ise total yuvarlak pencere obstrüksiyonu olduğu gösterilmiştir(16). Bu tür engeller, bazı hastalarda birkaç İT gentamisin enjeksiyonuna rağmen, neden vertigo kontrolü sağlanamadığını veya vestibuler hipofonksiyon gelişmediğini açıklayabilir(17).

2.2 İç kulakta ilaç dağılımı:

YPM yoluyla uygulanan terapötik ajanlar, kokleada perilenf içinde homojen dağılım göstermemektedir. İlaç konsantrasyonları genellikle koklea bazal kıvrımda yüksek, apikal kıvrımda ise düşüktür. Perilenfteki maddelerin dağılımları, YPM'dan olan permeabilite karakterlerine ve perilenften klerens oranlarına bağlıdır. Plontke ve ark. yaptıkları bilgisayar simülasyon modelinde; iç kulak sıvılarında gentamisinin farmatokinetik özelliklerini, iç kulak boyutlarını, ilaç dağılım süreçlerini, klerensini ve interskalar ilaç değişimlerini tanımlamışlar ve in vivo verilere yakın sonuçlar bulmuşlardır. YPM'nına uygulanan ilacın vestibüle helikotremadaki difüzyondan çok, skalalar arası iletimle geçtiğini göstermişlerdir(10).

2.3 İT İlaç Uygulama Metodları:

İT enjeksiyon yönteminde hasta etkilenmiş kulağı yukarı doğru olacak şekilde uzanır. Dış kulak yolu temizlenir ve timpanik membran mikroskopla görülür. Yuvarlak pencere nişi, malleus uzun procesi ile yaklaşık 113° derece açı yapar ve umbodan yaklaşık 3,44 mm mesafede bulunur. Kulak zarına lokal anestezi olarak topikal tetrakain veya topikal %15 fenol kullanılır. Enjeksiyon 1ml'lik tüberkülin şırıngası veya 22 gauge spinal iğneler kullanılarak yapılabilir. Enjeksiyon yavaş yapılmalı ve mümkün oldukça yuvarlak pencere nişine doğru yapılmalıdır. Hastalar enjeksiyondan sonra sırtüstü yatar konumda ve baş 45 derece karşı kulağa dönük olarak yatırılırlar. Hasta bu konumda yaklaşık 15–30 dakika kalmalıdır.

Plontke ve ark. Çalışma kanalı ve aspirasyon kanalını birleştiren ince bir fiberoptik endoskop geliştirerek, transtimpanik yolla YPM'nın doğrudan gözlenmesi,

aynı anda adezyonların açılmasını ve ilacın direk hedefe yönelik yapılmasını sağlamışlardır(18).

İT enjeksiyonlar ile orta kulağa verilen ilaç, östaki tüpünden boşalabilir, orta kulakta sekestre olabilir. Bu nedenle etkisi kesin değildir. Bu problemi aşmak için, orta kulak infüzyonu yoluyla iç kulağa sürekli ilaç geçişini sağlayan, kontrollü salınım yapan yeni teknikler geliştirilmiştir.

Yuvarlak pencere nişine yerleştirilen ve daha uzun süre orada kalan kuru bir gelfoam üzerine tekrarlayan enjeksiyonlar yapılarak istenilen etki sağlanmaya çalışılmıştır(19).

Günümüzde insanlarda da kullanımı onaylanmış olan ilk kontrollü salınım yapan cihaz Silverstein MicroWick'tir. Timpanostomi tüpü içinden yuvarlak pencere nişine ilerletilen küçük bir fitilden oluşur(20). Fitol, dış kulak yoluna damlatılan ilacı absorbe eder ve YPM'ndan ilacın emilimini sağlar. Suryanarayanan ve ark.nın yaptığı çalışmada refrakter MH olan 15 hastaya 24 ay sonra geriye dönük anket uygulandı. Hastalar 2 hafta boyunca günde 3 kez 3 damla gentamisin(10mg/ml) kulaklarına damlattılar. Hastaların %80'inde tam vertigo kontrolü sağlandı.%26 hastada da tedavi sonrası işitmede bozulma tespit edildi(21).

İç kulağa ilaç sunumu için tasarlanmış bir diğer cihaz, yuvarlak pencere mikrokateridir. Timpanomeatal flep elevasyonu ile yuvarlak pencere nişine yerleştirilen kateterin dış parçası kulak heliksine yerleşir ve elektronik bir pompaya bağlıdır(22). Plontke ve ark. Yaptıkları prospektif, çift-kör, randomize ve plasebo kontrollü çalışmalarında, sistemik tedavinin başarısızlığı sonrası ani işitme kaybı olan hastalarda mikrokater sisteminin etkinliğini araştırdılar. Hastalar 14 gün boyunca deksametazone(4mg/ml) veya salin infüzyonu ile tedavi edildiler. Tedavi grubunda daha iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen test edilen parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme saptanmadı. Bu çalışma iç kulak hastalıkları tedavisinde YP mikrokater sisteminin etkinliğini gösteren ilk büyük çalışmadır(23).

İlaç emdirilmiş çözünebilir matriksler içeren, kontrol edilebilen hidroliz ve difüzyon sağlayan biodegradable hidrojeller, iç kulağa ilaç dağılımı için yakın zamanda geliştirilen tekniklerdir. Yapılan hayvan modellerinde BDNF (brain derived

neurotrophic factor) hidrojelin porcine tip 1 kollejene çapraz bağlandığı ve YPM'na yerleştirildiğinde 7 gün boyunca iç kulağa BDNF salınımı yaparak spiral ganglionda dejenerasyon yaptığı gösterilmiştir(24). Yapılan bir diğer çalışmada, gürültüye maruz bırakılan hayvanlarda recombinant insan IGF-1 salınımı sağlayan jelatin bazlı hidrojeller (10 mmol/l glutaraldehit) kullanılmış ve tedavi edilen hayvanların koklear sıvılarında ilaç varlığı, ABR eşiklerinde yükselme ve dış saçlı hücrelerde korunma olduğu gösterilmiştir(25). Borden ve ark. son zamanlarda hyalüronik asit içeren yeni bir hidrojel kullandılar. Hayvanlar rastgele seçilerek, bir bulla sadece deksametazonla, karşı bulla ise deksametazon-hyalüronik asit(Dex-HA) jel ile dolduruldu.24 saatte, Dex-HA jel ile tedavi edilen tarafta perilenf deksametazone konsantrasyonları diğer tarafa göre anlamlı derecede yüksek bulundu($p=0,01$)(26).

Nanopartiküller; çapları genellikle 200 nm altında olan, biodegradable terapötik ajan içerebilen ve membranları hızla geçen iyi bir taşıyıcı olmaları nedeniyle YPM'dan ilaç geçişi için iyi bir adaydır. Guinea piglerde yapılan çalışmada kokleada, karaciğer ve böbrekte floresan boyalı rodamine dağılımı incelenmiştir. YPM'na yerleştirilen rodamine kapsüllü poly-lactic/glycolic asit (PLGA) nanopartiküllerin kolaylıkla skala timpaniye geçtiği gösterilmiştir. Daha da önemlisi lokal uygulamada sistemik uygulamaya göre daha etkili perilenf düzeyleri elde edilmiş(27). Lidokain yüklü PLGA nanopartiküllerin kobay YPM'na uygulandığı bir diğer çalışmada da uygulamadan sonra 3 gün süre ile perilenfte yüksek lidokain düzeyleri tespit edilmiştir(28).

Zou ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise lipid nanokapsüller (LNCs) YPM'na uygulanmış ve 30 dk içinde spiral ganglion hücreleri, sinir lifleri, saçlı hücreler ve spiral ligament fibrositlerinde tespit edilmiştir(29).

Plontke ve ark. yaptıkları çalışmada, ani işitme kaybı olup yüksek doz glukokortikoid tedavisine rağmen yeterli iyileşme sağlanamayan 5 hastada, intravitreal uygulama için onaylanmış ve toplam 0,7 mg deksametazone içeren steril çubuklar halindeki PLGA polimer matriksleri yuvarlak pencere nişine uygulamışlar. Kontrollü salınım yapan implant uygulaması sonrasında 2 hastada işitmede tam düzelme, 1 hastada ise kısmi düzelme olduğunu ifade etmişlerdir(30).

Yapılan bir diğerk çalışmada ise ani işitme kaybı olan hastalarda YPM vibrasyonu ile İT deksametazonun iç kulağa perfüzyonunun kolaylaşıp kolaylaşmayacağı araştırılmıştır. 55 refrakter işitme kaybı olan hasta 2 gruba bölünmüş. 36 hastaya sadece IT deksametazon yapılmış,19 hastaya ise deksametazon sonrası 3 dakika boyunca 90 db HL click uyaran dinletilmiştir. YPM vibrasyonu yapılan grupta diğerk gruba göre daha iyi odyolojik sonuçlar elde edilmiştir(31).

2.4 Aminoglikozidler:

İlk kez 1948 yılında intraktabl MH'nın tedavisinde sistemik streptomisin kullanılarak aminoglikozidlerin labirent ablasyonunda kullanımı tarif edilmiştir(32). Ancak bilateral koklear hasar olması bu uygulamanın terk edilmesine yol açmıştır. Schuknecht,1957 yılında intratimpanik streptomisin uygulamasını tarif etmiş ve 8 hastalık bir seri yayınlamıştır(33) .Bu çalışma IT yolla kimyasal ablasyon yöntemleri geliştirilmesinin önünü açmıştır.

Aminoglikozidlerin vestibulotoksik ve kokleotoksik etkileri değişkendir. Streptomisin ve gentamisin esas olarak vestibulotoksik iken, amikasin, neomisin, dihidrostreptomisin ve kanamisin kokleotoksiktir. Kokleotoksik etki kalıcı işitme kaybı yaparken, vestibulotoksik etki dizziness, ataksi ve nistagmus bulguları ile kendini gösterir(34).Yapılan histopatolojik çalışmalarda aminoglikozidlerin ototoksik etkileri karşılaştırılmıştır. Gentamisin, amikasin ve netilmisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada gentamisinin kokleotoksik etkisinin en fazla olduğu gösterilmiştir(35).Yapılan bir diğerk çalışmada ise, kanamisin ve amikasinin özellikle kokleada daha toksik, gentamisin ve streptomisinin ise vestibuler sistemde daha toksik olduğu belirtilmiştir(36).

Korti organında ve vestibuler makulada aminoglikozidlerin bağlandığı farklı bölgeler olduğu gösterilmiştir. Bu durum neden bazı aminoglikozidlerin vestibulotoksik bazılarının ise kokleotoksik olduğunu göstermektedir.

Ototoksisitenin kokleanın bazal kısmından başlayarak apekse doğru ilerlediği, ilk olarak dış tüylü hücrelerde dejenerasyonun başladığı, tip 1 tüylü hücrelerin, tip 2 tüylü hücrelerden daha duyarlı olduğu, sonrasında ise sırasıyla i titrek tüylü hücreler, destek hücreleri, ganglion spirale ve sinir lifi hücrelerinin etkilendiği

bilinmektedir(37). Koklea bazal kısmının ve dış titrekle tüylü hücrelerin kokleotoksik etkiden daha fazla etkilenmesi antioksidan düzeylerinin farklılığına bağlanmıştır. Yapılan in vitro çalışmada antioksidan glutatyon düzeylerinin, apikal hücrelerde bazal hücrelere göre %25 daha yüksek olduğu gösterilmiştir(38).

2.4.1 Gentamisin Ototoksitesisi:

2.4.1.1 Serbest oksijen radikalleri:

Gentamisin ototoksik etkisini serbest oksijen radikalleri üzerinden gerçekleştirdiği ortak görüş olarak kabul edilmektedir. Yapısında eşleşmemiş, yani tek elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır. Süperoksit ve hidroksil radikali doku hasarının en önemli mediatörleri olan serbest oksijen radikalleridir. Yapılan bir çalışmada gentamisin uygulaması sonrasında serbest oksijen radikallerinin ortaya çıktığı ve bu radikallerin üretilmesinden 24 saat sonra koklear hücre hasarının başladığı gösterilmiştir(39).

Pruiska ve Schacht yaptıkları in vitro çalışmada gentamisin ototoksik etkisini lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ile yaptığını belirtmişlerdir. Gentamisin tek başına lipid peroksidasyonuna neden olmadığı ancak ortamda önemli ölçüde demir tuzları ve araşidonik asit olması halinde serbest oksijen radikali oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir(40).

Fosfatidil inositol esansiyel bir membran fosfolipididir ve yapısında araşidonik asit içerir. Gentamisin fosfatidil inositol lipidlerine güçlü olarak bağlanır ve ototoksik etkilerini bu yolla gösterir. Hücre membranlarında oluşan lipid peroksidasyonu sonucu membranların transport sistemleri etkilenir. Hücre içine kalsiyum(Ca) girer ve kalmoduline bağlanır. Ca kalmodulin kompleksi sonucu hücre içinde proteazlar aktive olur. Aktive olan proteazlar ksantin dehidrogenaz enziminin irreversibl olarak ksantin oksidaz enzimine dönüşümünü sağlar. Ksantin oksidaz süperoksit ve hidrojen peroksit oluşturmak üzere elektronları moleküler oksijene aktarır ve oksijen radikalleri oluşur.

Koklea, tripeptid glutatyon ve onunla ilişkili glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler içeren bir korunma sistemine sahiptir. Gentamisin

uygulanmasından sonra aşırı miktarda üretilen serbest oksijen radikalleri antioksidan enzimlerin nötralizasyon kapasitesini aşar, bu durum membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açar. Reaktif oksijen radikallerinin plazma membranı ile reaksiyona girmeleri, 4-hidroksinonenal gibi yüksek reaktivite gösteren lipid peroksidasyon ürünlerini ortaya çıkarır sonuçta hücre hasar ve hücre ölümü gerçekleşir(41).

2.4.1.2 Apoptozis:

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kontrollü ve programlı bir şekilde ölümüne apoptozis denir. İlk kez Kerr ve ark. tarafından 1972 yılında tarif edilmiştir(42).

Enerji bağımlı, genlerle kontrol edilen programlanmış fizyolojik bir süreç olan apoptozis, hücrede belirli morfolojik ve fizyolojik değişimlerle karakterizedir. Spesifik endonükleazlarla DNA'nın fragmanlara parçalanması, kaspazların aktivasyonu ile proteinlerin sindirilmesi fizyolojik değişimlerken, nükleer kondensasyon, hücre büzülmesi, membran şişmesi ise morfolojik değişimlerdir(43).

Apoptozis aşamaları ölüm sinyali, kromatinde sıkışma, hücrede parçalanma, fagositoz şeklinde özetlenebilir.

Apoptozisi iyonize radyasyon, steroid tedavisi, kemoterapi, insektisitler, tarım ilaçları, iskemi sonrası reperfüzyon, mekanik travmalar ve sepsis indükleyebilir(44). Kronik gentamisin tedavisi sonrası koklear dış tüylü hücrelerde meydana gelen dejenerasyon sürecinin bazı özelliklerinin, apoptozisde meydana gelen morfolojik değişiklikleri andırdığı Forge tarafından ortaya atılmış ve aminoglikozidlere bağlı hücre dejenerasyonunda apoptozisin etkili olduğu gündeme gelmiştir(45).

Yapılan bir çalışmada apoptozisin kokleanın doku bütünlüğünü korumak adına bir defans mekanizması olduğu, endolenfatik sıvıdaki potasyumun hücre içine girişi ile başladığı ve makrofajların fagositozu ile sonlandığı belirtilmiştir(46). İlaça bağlı koklear hasar sonrası etkilenen tüylü hücrelerin iyi kontrol edilen bir

mekanizma ile ortadan kaldırıldığı, böylece Korti organında herhangi bir kollaps meydana gelmediği ve kokleanın korunduğu gösterilmiştir(47).

Nakagawa ve ark tarafından yapılan çalışmada, sistemik kanamisin tedavisi sonrası guinea pig dış ve iç tüylü hücrelerinde apoptozis oluşumunu düşündüren DNA fragmanları olduğu görülmüştür(48). Aynı çalışmada dış tüylü hücrelerin iç tüylü hücrelere göre daha hassas olduğu ve apoptozisin daha kolay indüklendiği gösterilmiştir.

İnternal ve eksternal yollar üzerinden olan enzim aktivasyonu apoptozisin regülasyonunu sağlar. İnternal yolda, direk mitokondriden sitoplazmaya salınan apoptotik faktörler ile enzim aktivasyonu olurken, eksternal yolda ise Fas ve TNRF-1 gibi reseptörler aracılığı ile enzim aktivasyonu gerçekleşir(34). Gentamisin ototoksitesinde intrensek yolk rol oynar. Mitokondride oluşan serbest oksijen radikalleri apoptozisi indükler(49).Yapılan bir çalışmada gentamisin kaynaklı işitme kaybının, iç kulak tüylü hücrelerdeki c-JUN N-terminal kinaz(JNK) yolunun aktivasyonu sonucu oluşan apoptozise bağlı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada sistemik olarak uygulanan ve JNK yolunu inhibe eden CEP-1347 adlı molekülün gentamisin ototoksitesini zayıflattığı ve özellikle koklear tüylü hücreleri ve vestibuler organlardaki tip 1 tüylü hücreleri koruduğu gösterilmiştir(50).

Gentamisinin selektif vestibuler etkisini açıklamak için ortaya atılan teorilerden biri de dark cell teorisidir. Bu teoriye göre gentamisin primer olarak sensöryal hücrelerden çok, sekretuar hücreleri etkilemektedir. Vestibuler dark hücreler, iç kulakta iyon homeostazını oluşturma ve idame ettirmede görevli sekretuar hücrelerdir. Aminoglikozidlerin vestibuler dark hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Oluşan bu hasarın, iç kulak iyon homeostazını ve endolenfatik hidropsta oluşan iyon düzensizliğini yeniden dengeye getirdiği düşünülmektedir. İyonik homeostazın yeniden sağlanması, koklea ve labirentteki temel fonksiyonları geri döndürür. İşitmenin yeniden kazanılması ve vestibuler iyileşmenin nasıl daha erken meydana geldiği bu şekilde açıklanabilir. Yapılan bir hayvan deneyinde ise, aminoglikozid maruziyeti sonrası hem sensöryal hemde sekretuar hücreler incelenmiş koklear ve vestibuler saçlı hücrelerde yoğun hasarlanma tespit edilirken, vestibuler dark hücrelerde önemli bir değişikliğe

ratlanılmamıştır. Bu teorinin preklinik hayvan modelleri ile ortaya konması gerekmektedir(51).

2.4.2 Klinik uygulama protokolleri:

İT gentamisin tedavisinde üç temel uygulama metodu vardır; sabit protokoller, titrasyon protokolleri ve uzatılmış salınım protokolleri. Sabit protokollerde bütün hastalara spesifik bir doz ve enjeksiyon sayısı uygulanır. Titrasyon protokollerinde ise verilen total doz, paralitik nistagmus, azalmış tandem gait, subjektif dengesizlik veya daha sıklıkla da vertigodan kurtulma gibi önceden belirlenmiş son noktaya göre ayarlanır. Uzatılmış salınım protokolleri, uygulanım mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli prensiplerle çalışır(51).

Uygulama protokolü labirent fonksiyonlarının total veya parsiyel ablasyonun hedeflenmesine göre değişiklik gösterir. Total ablasyon yöntemi 1992 yılında Nedzelski tarafından tariflenmiştir(52).Nedzelski'nin tariflediği klasik "shotgun"protokolünde 40 mg/ml gentamisin stok solüsyonu sodyum bikarbonat ile tamponlanmış ve 26,7 mg/ml nihayi gentamisin dozu elde edilmiş. Ardışık dört gün boyunca, günde üç kez olmak üzere toplam 12 doz yapılmış.(208 mg)Bu protokolde vertigo kontrol oranı %94,işitme kaybı oranı ise %26 olarak tespit edilmiştir(53). Toth ve Parnes, klasik "shotgun"protokolü uyguladıkları 18 hastada %57 gibi kabul edilemez oranda işitme kaybı saptadıklarını ve haftalık enjeksiyonları içeren titrasyon yöntemine geçtiklerinde işitme kaybı oranının %19'a düştüğünü belirtmişlerdir(54).

Titrasyon yöntemi ile parsiyel ablasyon veya vestibuler yanıtın azaltılması ise Magnusson ve Padoan tarafından tariflenmiştir(55). Bu yöntemde standart veya azaltılmış dozlarda gentamisin uygulandıktan sonra hasta, bir hafta bir-ay arasında değişen zamanlarda kontrollere çağrılır. Hastanın semptomları, vestibuler testleri, kontrol odyoları ve elektronistagmografi(ENG) bulguları değerlendirilir ve tedaviye devam edilip edilmeyeceğine karar verilir. Titrasyon yöntemi ile düşük doz gentamisinin(26,7mg/ml) uygulandığı 71 hastalık bir çalışmada 2 yıllık takip sonrası%83 vertigo kontrolü sağlanırken,%32,4 işitme kaybı meydana geldiği belirtilmiştir(56).

Mikrodoz ve yavaş salınım protokolünün uygulandığı 26 Meniere hastasını içeren bir çalışmada Hoffner ve ark. yuvarlak pencere mikrokateri yoluyla mikrodoz gentamisin infüzyonu yapmışlar ve 3 yıllık sonuçları bildirmişler. Hastalara 10 gün boyunca 10 mg/ml pediatrik gentamisin solüsyonundan total doz 2,4–3,75 mg. olacak şekilde mikrokater pompası yoluyla uygulanmış. Bütün hastalara tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve sonrasında işitme testi ve vestibuler testleri yapılmış. Bu strateji ile %89 hastada vertigo kontrolü sağlanırken,%60 hastanın tinnitus ve kulaktaki basınç hissine azalma olmuş. İşitme kaybı oranı ise %11 olarak tespit edilmiş. Sadece 1 hastada(%3) önemli ölçüde işitme kaybı oluşmuştur(57).

Hill ve ark. Silverstein MicroWick sistemi ile YPM'na gentamisin uyguladıkları 69 kesin veya muhtemel MH tanılı hastanın 53'ünde(%76,8) en az iki yıllık takip sonrası vertigo semptomlarının kontrol altına alındığını ayrıca bu yöntemin minimal invaziv, hastanın kendi kendine uygulayabileceği ve kolay tolere edilebilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir(58).

IT gentamisin tedavisi önerilen hastalara, tek doz gentamisin enjeksiyonu sonrası bile total işitme kaybı komplikasyonunun oluşabileceği mutlaka söylenmelidir(59).

Salt ve ark.'nın yaptığı meta-analitik çalışmalarda, devamlı gentamisin infüzyonu veya tekrarlı enjeksiyonlarla kokleada daha yüksek ilaç konsantrasyonu elde edilmekle birlikte komplikasyonların da daha yüksek görüldüğü belirtilmiştir(60).

Casani ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise gentamisin ile tedavi edilen 77 hasta retrospektif olarak analiz edilmiş. Günde 2 kez,3 gün ara ile toplam 6 doz(yüksek doz) IT gentamisin yapılan grupta(35 hasta),toplam 1-2 doz(düşük doz) yapılan grup(42 hasta) odyolojik bulguları ve vertigo yakınmaları açısından karşılaştırılmış. Hastalar 2 yıl boyunca takip edilmiş. Vertigo yakınması devam eden hastalara aynı tedavi tekrar verilmiş. Takip sonunda her 2 grupta benzer oranlarda vertigo kontrolü sağlanmış. İşitme kaybı ve tedavi sonrası dengesizlik oranları yüksek doz alan grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Düşük doz IT gentamisin

tedavisinin vertigo atak kontrolünde iyi sonuçlar verdiği ve yan etkinin daha az olduğu ancak uzun süreli takiplerde tekrarlanma ihtiyacının yüksek doz tedaviye göre daha fazla olduğu belirtilmiştir(61).

Yapılan retrospektif literatür taramasında İT gentamisin tedavisi ile ilgili 18 yayın taranarak değişik teknikler karşılaştırılmış ve optimal etkili teknik bulunmaya çalışılmıştır(62). MH'daki epizodik vertigoyu tedavi etmedeki etkinlik tüm çalışmalarda %80 ile %100 arasında yüksek saptanırken, işitme kaybı oranları ise ortalama %30 civarındadır. Yapılan çalışmalarda uygulama tekniği, doz, süre ve tedavi metodu büyük değişiklikler göstermiştir. Vertigo kontrolü ve işitme kaybı oranı ile uygulama tekniği ve metodu arasında tutarlı bir ilişki saptanmamıştır. Total doz ve uygulama sayısı ile işitme kaybı oranları arasında orantısız bir ilişki görülebilmiştir. Vertigo kontrolünde tüm yöntemlerin başarılı olduğu bu nedenle total ablasyonun gerekli olmadığı vurgulanmıştır. İT gentamisin tedavisinde hiçbir tekniğin diğerlerine göre medikal bir avantaj sağlamadığı ifade edilmiştir. Tedavinin yeterli yarar sağlandığında bırakılması, gerektiğinde tekrarlanması önerilmektedir.

2.5 Glukokortikoidler:

Glukokortikoidler ani nörosensoriyel işitme kaybı, otoimmün işitme kaybı, gürültü kaynaklı işitme kaybı ve MH gibi bazı iç kulak hastalıklarında kullanılmaktadır.

Otoimmün iç kulak hastalıklarında işitme kaybının immün sistemin kokleada yarattığı enflamasyona bağlı olduğu kabul edilir. Bu hastalıklar dolaşımdaki bakteriyel ve viral kaynaklı immün komplekslerin, spesifik iç kulak antijenlerine yönelik T hücreleri kaynaklı immün sistemin veya Tip 2 kollejenine karşı oluşmuş otoantikörlerin etkisiyle ortaya çıkabilir(63). Bu öngörü ile steroidler antiinflamatuvar ve immün baskılayıcı etkilerinden yararlanmak için iç kulak hastalıklarında kullanılmaktadırlar.

Hedef hücrelerde hücre membranını geçen kortikosteroidler, sitoplazma ve çekirdek içindeki kendilerine özgü reseptör proteini ile birleşirler(64). Bu reseptörlerin insan iç kulağında koklear ve vestibuler dokularda varlığı gösterilmiştir. En yoğun spiral ligamanda olmak üzere, corti organı ve stria vaskulariste glukokortikoid hormon reseptör varlığı gösterilmiştir(65). Hücre çekirdeğinde

kromatin ile birleşen kortikosteroid reseptör protein kompleksi, kendilerine özgü genleri etkilemek suretiyle o genlerin ekspresyonunu yani o genlere özel mRNA yapımını artırır. Bu hücre içi etkileşim sonucu hedef organda ve tüm vücut düzeyinde fizyolojik ve farmakolojik etkilerini meydana getirirler: Bu etkiler protein, karbonhidrat, yağ metabolizması üzerine olan etkiler, antiinflamatuvar ve immunsupresif etki, strese karşı koruma, böbrekler, kardiovasküler sistem, hematopoetik sistem, santral sinir sistemi üzerine etkiler, çizgili kaslar üzerine etkiler şeklinde sayılabilir.

En iyi anlaşılmış olan kortikosteroid etkisi, immun cevabın azaltılmasına yönelik olan etkidir. Kortikosteroidler, dolaşımdaki lökositlerin sayılarını düşürür, inflamatuvar mediatörlerin salınımını ve formasyonunu değiştirirler. Vazoaktif ve kemoatraktif faktörlerin salınımını inhibe ederler, lipolitik ve proteolitik enzimlerin sekresyonunu azaltırlar. İnterferon, granülosit/monosit koloni stimule edici faktör, interlökinler ve tümör nekrozis faktör- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ederler. Bu etkiler mekanik, hipoksik, iskemik, enfeksiyöz veya otoimmun nedenlerle oluşan inflamatuvar kaynaklı hasarı azaltır(66).

Hidrokortizon'un koklear iskemiye vasodilatatör ajanlardan daha iyi önlediği ve bu etkinin doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Kimyasal olarak başlatılmış koklear iskemide koklear kan akımını ve vasküler iletkenliği koruduğu, stria vasküleriste oluşan hasarı azalttığı bulunmuştur(67).

Semisirküler kanal epiteli endolenfle geniş bir temas alanına sahiptir. Bu özelliğin endolenf-perilenf iyon dengesinin sağlanmasında bir görevi olma olasılığı yüksektir. Son çalışmalarda bu epitelin cAMP yoluyla çalışan β 2-adrenerjik reseptör sayesinde Cl iyonlarını salgıladığı ve transportunu kontrol ettiği, epitelyal sodyum kanalları aracılığı ile Na Emilimi yaptığı bildirilmiştir(68).

Bu bilgiler ışığında deksametazon ve prednizolon'un MH'da semisirküler kanal epitelinde Na Emilimini arttırarak endolenf hacmi üzerinde etkili olduğu düşünülmüştür.

2.5.1 Klinik uygulama protokolleri:

Birçok iç kulak hastalığında steroidlerin yararlı etkileri olduğu klinik çalışmalarla gösterilmiş, muhtemel etki mekanizmaları hayvan çalışmalarında ortaya konmuştur. Fakat en etkili steroid türü, dozu ve veriliş yolu konusunda henüz bir netlik oluşmamıştır. Steroidler genellikle sistemik ve lokal yolla olmak üzere iki şekilde kullanılırlar.

Steroidler immun reaksiyon üzerinde baskılayıcı etki gösterirler. Bugüne kadar maddenin ana kullanım şekli sistemik olarak verilmesi idi. Niedermeyer ve ark. 250 mg. sistemik prednizolon enjeksiyonu yapılan hastalarda perilenf kortizol seviyesinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Daha düşük dozlarda ise bu etki gözlenmemiştir(69). Glukokortikoidler özellikle yüksek dozda ve uzun süre kullanıldıklarında ciddi yan etkiler meydana getirirler(64): İyatrojenik Cushing sendromu, osteoporoz ve osteonekroz, peptik ülser oluşumu, yara nedbeleşmesinde gecikme, enfeksiyon gelişiminin kolaylaşması, ciltte atrofi, diyabet oluşumu, miyopati ve halsizlik, büyümenin baskılanması, ödem ve hipokalemi, göze lokal uygulamada kornea ülseri, lokal yada sistemik uygulamada göz içi basınç artışı meydana gelmesi, adrenal korteks atrofisi, intrakranial basınç yükselmesi, hiperkoagulabilite, ateroskleroz gelişiminin hızlanması, konvülsiyonlar, impotans ve kadınlarda amenore. Bu sistemik yan etkilerden kaçınmak için steroidler, son yıllarda lokal yolla orta kulak boşluğuna uygulanmaya başlamıştır. Lokal yolla en sık uygulanan steroidler; hızlı etkili hidrokortizon, orta etkili metilprednizolon ve uzun etkili deksametazon'dur.

Topikal uygulanan solüsyonların sistemik verilenlerden çok daha ileri düzeyde endolenf ve perilenfe geçtiği gösterilmiştir. Hidrokortizon, metilprednizolon ve deksametazon içinde en yüksek konsantrasyon ve en uzun süre kalma açısından en iyi performansı metilprednizolon göstermiştir(70). Chandrasekhar ve ark. yaptıkları çalışmada intratimpanik olarak verilen deksametazonun intravenöz yolla oranla çok daha yüksek perilenf konsantrasyonuna ulaştığını bulmuşlardır(9).

Broughton ve ark. 2004 yılında, otoimmün iç kulak hastalığı olan 42 hastanın 10 yıllık takibini yayınlamışlardır. Vestibüler şikayetleri ön planda olan 33 hastanın

21'i MH kriterlerine uygun olarak bulunmuş. Hastaların %70'inin steroid tedavisine cevap verdiği ve 68-kd antikorunun varlığının steroid tedavisine cevapla bağlantılı olmadığı rapor edilmiştir(71).

Tomoda ve ark. 30 Meniere hastasını sistemik ve otoimmün reaksiyon açısından araştırmışlardır. Birçoğunda hipergamaglobunemi, tip 2 kollejene karşı antikor, endolenfatik kesede immünglobulinler,C3 ve hücre infiltrasyonu bulmuşlardır. Hastaların %28'i sistemik prednizolona iyi cevap vermiştir(72).Barrs yaptığı çalışmada, 32 hastadan %47'sinde baş dönmesinin İT deksametazon ile en az 2 yıl kontrol edilebildiğini, ama sadece %24'ünde tek bir kür steroid tedavisinin yeterli olduğunu rapor etmiştir(73).

İT ve intravenöz deksametazonun kombine kullanılarak tedavi edildiği 28 Meniere hastasında baş dönmesinde %96 başarı elde edilirken, işitmede düzelme oranı %67 olarak bildirilmiştir(74).

Itoh ve Sakata yaptıkları çalışmada,322 hastayı incelemişler ve IT deksametazon'un lidokain'e göre MH'da daha üstün, fakat iç kulak kaynaklı baş dönmesinde daha zayıf olduğunu söylemişlerdir(75).

2.6 Guinea Pig'lerin Temporal Kemik Anatomisi:

Guinea pig temporal kemiği, içerisinde işitme ve dengenin periferik organı olan kulağı bulunduran, kafatasının alt ve lateral duvarının yapımında yer alan bir kemiktir. Timpanik halka, timpanik bulla, mastoid benzeri çıkıntı, squamöz parça ve petrozal parçalardan oluşur.

Timpanik halkanın insandaki karşılığı timpanik kemiktir, bullanın lateralinde yerleşir ve bullaya sıkıca yapışıktır. Timpanik zarın çapı 8x7mm olup, timpanik halkanın çapından 3x4 mm daha büyüktür. Diseksiyon yapılmaksızın eksternal olarak timpanik membran değerlendirildiğinde ancak yarısı görülebilmektedir.

Timpanik bulla düzgün yüzeyli yarım küre benzeri havalı bir boşluktur. Timpanik bulla içinde göze çarpan en önemli yapı kokleadır. Koklea orta kulak boşluğunda mediolateral ve posteroanterior yönlerde projeksiyon yapar. Koni şeklinde yapısı olan koklea uzunluğu yaklaşık 5 mm.'dir. Bazal kıvrımdan apekse

kadar yaklaşık 3,5 tur döner. Bazal kıvrım yuvarlak pencere nişinden başlar ve tensor timpani kanalının seviyesine kadar uzanır. Bu kıvrım kokleanın en belirgin çıkıntısıdır. Apikal kıvrım bulanlın medial duvarına ince bir kemik lamella ile birleşir. Koklea bazal orta kulak iç duvarına gömülü iken diğer kıvrımlar orta kulak boşluğunda rahatlıkla izlenebilir. Oval pencere, vertikal planda yerleşir ve horizontal planda yerleşen yuvarlak pencere planına diktir.

İç kulak, koklea, vestibül ve semisirküler kanallardan oluşur ve petröz kemik derinliğinde yerleşir. Vestibül ve semisirküler kanallar iç kulağın en önemli yapılarıdır. Vestibül, temporal kemiğin medial derinliğinde yerleşmiştir. Semisirküler kanallar ile koklea arasında geçiş özelliği sağlayan bu yapı içerisinde sakkül ve utrikül yerleşmiştir.

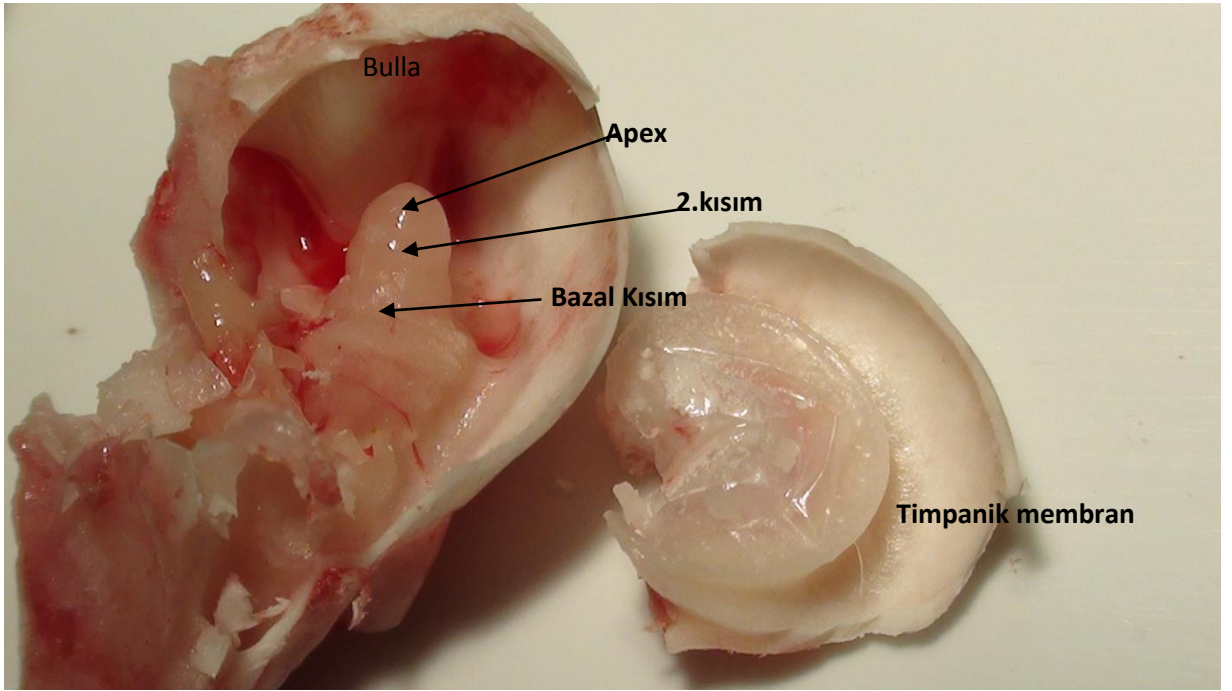
Guinea pig temporal kemik anatomisi, timpanik kavite ve iç kulak yapılarına hızlı ve kolay bir ulaşım olanağı tanıdığından deneysel araştırmalar için uygundur. İnsan temporal kemiği ile birçok benzer özellikler göstermesine rağmen bazı farklılıklar da mevcuttur:

- 1.** Dış kulak yolu, süperiora aurikuler kırıkdağın devamı olan bir adet kırıkdağ halka ve inferiora 3 adet kemik halka birleşmesi ile oluşur. Dış kulak yolu en dar yeri kırıkdağ ve kemik halkanın birleşim yeridir.(3mm)
- 2.** Foramen Huschke dış kulak yolu dehisansı olup tüm Guinea pig'lerde izlenir.
- 3.** Timpanik membranlarında fibröz tabaka olmadığından ince, şeffaf ve kırılmandır.(Pars flaccida yoktur)Zar gizli boşluk nedeniyle dış kulak yolundan ancak %50 oranında izlenebilir.
- 4.** Orta kulak genellikle insan orta kulağına benzerdir. Mezoimpanum ve hipotimpanumu içeren geniş bir bulla vardır.
- 5.** Koklea yaptığı projeksiyon ile bir orta kulak yapısı olarak dikkati çeker.3,5 kıvrımı bulunur.
- 6.** Malleus ve incus füzyon halindedir.

7. En önemli farklılık havalı hücre sistemindedir. Guinea pig'lerde ince trabeküllerle ayrılmış multipl hücreler yerine büyük kaviteden oluşan 3 adet hücre bulunur.

8. İnternal akustik kanal bulunmaz ve fasial sinirin orta kulaktaki seyri rahatlıkla izlenebilir. Temporal kemik lateralından temporal kemiği terk eder.

9. Anterior semisirküler kanal ile lateral semisirküler kanal vestibüle girmeden önce birleşir. Kanal kompozisyonunun insandan tek farkı budur. Ulaşım güçlüğü oluşturmayan kanal yerleşimi vestibüler çalışmalar için de bir avantajdır(76).



Şekil 1: Guinea pig bulla, koklea ve timpanik membranı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alındıktan sonra Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri PAÜBAP-1446 no'lu proje ile desteklenmiştir.

3.1 Kullanılan Deney Hayvanları:

Bu çalışmada, Hartley soyu,400-600gr. ağırlığında 14 adet albino guinea pig(kobay) kullanıldı. Kobaylar, Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları biriminden temin edildi.

Kobaylar %50 nem, 16–21 C° ısı koşullarında pelet yem ve C vitamini (mevsimsel taze sebze ve meyve şeklinde) ile beslenerek barındırılmıştır.12 saat aydınlık,12 saat karanlık olacak şekilde ortamın aydınlatılmasına dikkat edildi. Çalışmamızda uluslararası Helsinki deklarasyonunda bildirilen hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili kurallara uyulmuştur.

3.2 Deney Protokolü:

Çalışmamızda 14 adet guinea pig, 2 farklı gruba ayrıldı. Yapılacak tüm işlemler genel anestezi altında yapıldı. Araştırma boyunca genel anestezi, intraperitoneal olarak uygulanan, birbiri ile karıştırılmış 10 mg/kg xylazine HCl (Alfazyne %2 Enjektabl, Alfasan, Woerden, Hollanda) ve 75 mg/kg ketamin HCl (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ile sağlandı. Bu şekilde enjeksiyon sonrası yaklaşık 60–90 dakikalık genel anestezi sağlandı. Tekrarlayan anestezi dozu gerektiğinde aynı karışım 1/3 oranında yapıldı. Tüm deneklerin otoskopik muayeneleri yapılarak, dış kulak yolları ve timpanik membranlarının doğal olduğu kontrol edildi.

3.3 Deney Grupları:

K(kontrol) grubu: Her kobayın herhangi bir işlem yapılmayan sağ kulağı kontrol grubu olarak belirlendi(14 adet)

D(deksametazon) grubu: İT olarak sol kulağa deksametazon uygulanan grup(10 adet)

G(gentamisin) grubu: İT olarak sol kulağa gentamisin uygulanan grup(4 adet)

- 1.denek İT D yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 2.denek İT D yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 3.denek İT D yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 4.denek İT D yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 5.denek İT D yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 6.denek İT D yapıldı ve 2 saat beklendi.
- 7.denek İT D yapıldı ve 2 saat beklendi.
- 8.denek İT D yapıldı ve 2 saat beklendi.
- 9.denek İT D yapıldı ve 2 saat beklendi.
- 10.denek İT D yapıldı ve 2 saat beklendi.
11. denek İT G yapıldı ve ½ saat beklendi
- 12.denek İT G yapıldı ve ½ saat beklendi.
- 13.denek İT G yapıldı ve 2 saat beklendi.
- 14.denek İT G yapıldı ve 2 saat beklendi.

Dexoject enjeksiyonluk çözelti içeren ampul 8 mg/2 ml: Etkin madde: Bir ampulde (2 ml çözeltide) 8 mg deksametazon fosfata (6,6 mg deksametazona) eşdeğerde deksametazon sodyum fosfat içerir. Yardımcı maddeler: Sodyum sitrat 20 mg, Kreatinin 16 mg, Sodyum metabisülfid 2 mg, Metil paraben 3 mg, Propil paraben 0.40 mg, Enjeksiyonluk su 2 ml.

Genta 40 mg/ml ampul: Etkin madde:1 ml'lik ampul 40 mg gentamisine eşdeğer gentamisin sülfat içerir. Yardımcı maddeler: Metil paraben 1,8 mg, Propil paraben 0,2 mg, Sodyum metabisülfid 3,2 mg, EDTA disodyum 0,1 mg, Enjeksiyonluk su 0,1 ml.

İT uygulamalar genel anestezi altında yapıldı. Bulla mikrotur yardımı ile delinerek enjeksiyonlar yapıldı. Kafatası derisine orta hatta sagittal planda, orbitaları birleştiren hayali hattın başlayıp vertebralara kadar uzanan cilt ve ciltaltını geçen insizyon yapıldı. Periost eleve edilerek temporal kaslar, frontal ve parietal kemikler ortaya kondu. Temporal kaslar eleve edildikten sonra aurikula laterale ekarte edilerek kırkırdak dış kulak yolu keskin disseksiyonla timpanik halkadan ayrıldı. Kas dokuları eleve edildikten sonra temporal kemiğin mastoid çıkıntısı ve timpanik parça(bulla) ortaya kondu. Bulla mikrotur ile delinerek enjeksiyonlar 28-gauge iğne ile bulla dolana kadar (yaklaşık 0.20–0.30 ml) yapıldı. Enjeksiyon sonrası kobayın işlem yapılan sol kulağı üstte kalacak şekilde 0,5 saat yan yatması sağlandı.

3.4 Disseksiyon ve Dondurma:

Enjeksiyondan sonra 2 zaman diliminde (0,5 saat,2 saat),sol koklealar işlem grubu, sağ koklealar kontrol grubu olacak şekilde hazırlandı. Kobaylar bu sürelerde hiç uyandırılmadı ve gerektiğinde tekrarlayan dozlarda anestezi yapıldı. Kobaylar intrakardiak potasyum kullanılarak sakrifiye edildi. Sürelerin bitiminde bulla serum fizyolojik ile yıkandı. Bu aşamadan sonra mastoid kemik oksipital kemikten, sfenoid kemiklerden, petröz parça sfenoid kemikten disseke edildi. 7.ve 8. kranial sinirlerin ekstratemporal kısımlar da kesildikten sonra temporal kemik kafatasından ayrıldı.

Çıkarılan temporal kemikler kabaca disseke edilerek koklea görünür hale getirildi. Alüminyum folyo kağıdına sarılan numuneler sıvı nitrojen tankına yerleştirildi ve

—196°C’de 5 dakika donması beklendi. Donmuş haldeki koklea ve vestibul ortaya kondu. Koklea, apeks,2.kısım ve bazal kıvrım olmak üzere kıvrımlarından mikroskop altında bistüri yardımı ile kesilerek 3 parçaya ayrıldı. Vestibul ayrı olarak çıkarıldı. Her parça kesilirken bulaşı engellemek amacı ile bistüri değiştirildi. Böylece her temporal kemikten 4 örnek alınmış oldu. Çıkarılan örnekler ependorf tüplerine yerleştirilerek -5°C ‘de saklandı. Alınan örnekler Pamukkale Üniversitesi Kimya Bölümü’ne analiz için ısı geçirmez kaplarda götürüldü.



Şekil 2:Enjeksiyon, disseksiyon ve dondurma işlemi yapılmış temporal kemik

3.5 Kimyasal ölçümler:

Numuneler -5°C 'de analizin yapılacağı güne kadar saklandı. Analizler yapılmadan önce tüm numuneler kuşe kâğıt üzerine alınarak analitik terazide tartıldı (virgülden sonra 4 haneli analitik terazi). Örnekler hızlı bir şekilde ağzı kapalı deney tüpleri içine aktarıldı ve her bir tüpe 10 ml. distile su ilave edildi ve deney yapılacağı güne dek buzdolabında saklandı. Deneyler sırasında suda çözünerek geçen kısımlardaki ilaç miktarları tayin edileceğinden çözünmeyen kemik ve doku parçaları tüpün dibinde kaldı. Tüm analizler üst kısımdaki çözelti ile gerçekleştirildi.

3.5.1 Deksametazon için kalibrasyon numunelerinin hazırlanması:

Kalibrasyon çözeltisi için ticari olarak satılan ve 4mg/ml. Deksametazon ve diğer yardımcı maddeler içeren çözeltiden 1ml alınarak distile su ile 500ml'ye seyreltilerek stok çözelti elde edildi. Bu çözeltiden sırasıyla 1 ml,3 ml,5 ml,8 ml,12 ml,16 ml,20 ml alınarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı. Çözeltilerin derişimleri ppm değerleri sırasıyla 8 ppm, 24 ppm, 40 ppm, 64 ppm, 96 ppm, 128 ppm ve 160 ppm olarak hesaplandı (ppm: 1 litre çözeltide bulunan maddenin mg miktarı). Hazırlanan numunelerin Perkin Elmer Lambda 25 UV-VIS marka spektrofotometrede quartz tüpler içinde maksimum absorbans gösterdikleri 214 nm,236 nm ve 240 nm'lerdeki absorbans değerleri ölçüldü. Bu üç noktada elde edilen absorbans değerlerinden ayrı ayrı hesaplama yapılarak bilinmeyen numunelerin derişimleri ppm olarak hesaplandı.

Kalibrasyon grafiğı için absorbans değerine karşılık gelen deksametazon değerleri grafiğı geçirildi. Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden lineer regresyon metodu kullanılarak absorbans derişime bağlayan denklemler her bir dalga boyu için ayrı ayrı bulundu.

Regresyon sabiti (r^2) değerleri: 214 nm için 0,982
236 nm için 0,985
240 nm için 0,987 olarak bulundu.

Denklemler: 214 nm için: $A=(0,004353xC)-0,00376$
236 nm için: $A=(0,004924xC)-0,0223$
240 nm için: $A=(0,010xC)+0,016$

Bu denklemlerden en iyi sonuçlar veren 240 nm için elde edilen bulgularla hesaplanan formül kullanıldı.

Regresyon sabiti 1 olunca bütün noktalar kalibrasyon doğrusu üzerinde olur ve deneysel hata yoktur. $r^2<1$ olursa eğrinin nokta olarak uyumu azalır. Genellikle 0,98–0,99 iyi bir uyum olarak düşünülür. Ancak numunelerin standardize edilemediği durumlarda 0,95–0,96 hatta 0,75–0,76 değerleri bile yorum yapmakta kullanılabilir.

Yapılan ölçümler sırasında aynı denekte sağ veya sol kulak örnekleri standart olarak aynı kütlede alınmadığı, örnek kütleleri arasında bazen çok büyük farklılıklar olması karşılaştırmaların yapılmasında bazı sıkıntılara yol açmıştır. Dolayısıyla belli bölgelerdeki ilaç derişimleri değerlendirilirken o bölgeden alınan örnek kütlelerinin de dikkate alınması gerekir. En sıhhatli değerlendirme aynı bölgeden alınan sağ ve sol kulak numunelerinde hesaplanan ilaç derişimlerinin kütleleri de dikkate alınarak değerlendirilmesi olacaktır.

3.5.2 Gentamisin için kalibrasyon numunelerinin hazırlanması:

Gentamisin örneklerinde yukarıda belirtilen dexametazon için uygulanan prosedür tekrarlandı. Kalibrasyon çözeltisi 1 ml ticari olarak satılan ve 40 mg/ml

gentamisin ve diğ er yardımcı maddeler iç eren ampulden alınarak 250 ml'ye distile su ile seyreltildi ve stok ç özelti elde edildi. Daha sonra bu stok ç özeltiden sırasıyla 1 ml,3 ml,5 ml,8 ml,12 ml,16 ml,25 ml alınarak tüm ç özelteler distile su ile 25 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan örneklerin ppm cinsinden derişim değerleri 6,4 ppm,19,2 ppm,32,0 ppm,51,2 ppm,76,8 ppm,102,4 ppm ve 160 ppm olarak hesaplandı.

Deksametazon örneklerinde olduğu gibi UV spektrumunda maksimum absorpsiyonun olduğu 210 nm ve 255 nm'deki absorbans değerleri okunarak 2 ayrı kalibrasyon grafiği hazırlandı.(absorbans değerine karşılık gelen ppm cinsinden gentamisin derişimleri.) Kalibrasyon grafiği için absorbans değerine karşılık gelen gentamisin değerleri grafiğe geçirildi. Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden lineer regresyon metodu kullanılarak absorbansı derişime bağlayan denklemler her bir dalga boyu için ayrı ayrı hazırlandı.

Regresyon sabiti (r^2) değerleri: 210 nm için 0,9912

255 nm için 0,9975 olarak hesaplandı.

Denklemler: **210 nm için $A=(0,003680 \times C)-0,00830$**

255 nm için $A=(0,003969 \times C)-0,00305$

Bu denklemler kullanılarak gentamisin grubundaki her bir numunenin ppm cinsinden derişim miktarları hesaplandı. Ayrıca deksametazon örneklerinde olduğu gibi tüm dalga boylarını iç eren UV eğrileri, aynı denek grubunda karşılaştırmalı olarak elde edildi

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Hartley soyu,400-600gr. ağırlığında 14 adet albino guinea pig (kobay) kullanıldı.

Kontrol grubu: Her kobayın herhangi bir işlem yapılmayan sağ kulağı kontrol grubu olarak belirlendi(10 adet).

D(deksametazon) grubu: İntratifimpanik olarak sol kulağa deksametazon uygulanan grup(6 adet).

G(gentamisin) grubu: İntratifimpanik olarak sol kulağa gentamisin uygulanan grup(4 adet).

Denek adı:1.2.3.4.5.6.7.8.9.10 (deksametazon grubu)11.12.13.14 (gentamisin grubu)

Sol kulak:1 (işlem grubu),sağ kulak:2 (kontrol grubu)

Bölge:1(koklea bazal kısmı),2(koklea 2.kısım),3(koklea apex),4(vestibül)

İlaç:1(deksametazon),2(gentamisin)

Zaman:1(0,5 saat),2(2 saat) olarak kodlandı.

Deksametazon için 240 nm'deki absorbans değerine karşılık gelen derişim değeri ppm cinsinden hesaplandı. Gentamisin için ise 210 nm,255 nm'lerdeki absorbans değerine karşılık gelen derişim değeri ppm cinsinden hesaplandı

Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, medyan (minimum - maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı.

Tablo 1: Deksametazon 0,5 saatteki ilaç derişimleri

DENEK	KULAK	BÖLGE	İLAÇ	ZAMAN	DALGA BOYU	ABSORBANS DEĞERİ	DERİŞİM
1	1	1	1	1	240	0,1079	9,19
1	1	2	1	1	240	0,0277	1,17
1	1	3	1	1	240	-0,008	0
1	1	4	1	1	240	0,1083	9,23
1	2	1	1	1	240	0,0011	0
1	2	2	1	1	240	0,0063	0
1	2	3	1	1	240	0,0059	0
1	2	4	1	1	240	0,0161	0
2	1	1	1	1	240	0,0168	0,08
2	1	2	1	1	240	0,0241	0,81
2	1	3	1	1	240	0,0396	2,36
2	1	4	1	1	240	0,3397	32,37
2	2	1	1	1	240	0,0211	0,51
2	2	2	1	1	240	0,0189	0,29
2	2	3	1	1	240	0,0101	0
2	2	4	1	1	240	0,1396	11,56
3	1	1	1	1	240	0,0441	2,81
3	1	2	1	1	240	0,0612	4,52
3	1	3	1	1	240	0,0141	0
3	1	4	1	1	240	0,0445	2,85
3	2	1	1	1	240	-0,003	0
3	2	2	1	1	240	0,0482	3,22
3	2	3	1	1	240	-0,002	0
3	2	4	1	1	240	0,0295	1,35
4	1	1	1	1	240	0,0629-0,0376-0,0419	11,05
4	1	2	1	1	240	0,0196-0,0285	1,61
4	1	3	1	1	240	0,0229	0,69
4	1	4	1	1	240	0,0436-0,0350	4,36
4	2	1	1	1	240	0,0337-0,0504-0,0399	5,7
4	2	2	1	1	240	0,0222-0,0299	1,9
4	2	3	1	1	240	0,0322	1,62
4	2	4	1	1	240		0
5	1	1	1	1	240	0,1847	16,87
5	1	2	1	1	240	0,1133	9,73
5	1	3	1	1	240	0,1113	9,53
5	1	4	1	1	240	0,0785	6,25
5	2	1	1	1	240	0,0192-0,0389	2,51
5	2	2	1	1	240	0,0455	2,95
5	2	3	1	1	240	0,0183	0,23
5	2	4	1	1	240		0

Sol kulak: 1, Sağ kulak: 2, Bölge: 1(koklea bazal kısım), 2(koklea 2. kısım), 3(koklea apex), 4(vestibül)
İlaç: 1(deksametazon) , Zaman: 1(0,5 saat)

Tablo 2:Deksametazon 2 saatteki ilaç derişimleri

DENEK	KULAK	BÖLGE	İLAÇ	ZAMAN	DALGA BOYU	ABSORBANS DEĞERİ	DERİŞİM
6	1	1	1	2	240	0,5016	48,5
6	1	2	1	2	240	0,0968	8,09
6	1	3	1	2	240	0,1152	9,92
6	1	4	1	2	240	0,1092	9,32
6	2	1	1	2	240	0,0174	0,14
6	2	2	1	2	240	0,0578	4,18
6	2	3	1	2	240	0,0447	2,87
6	2	4	1	2	240	0,2097	19,3
7	1	1	1	2	240	0,0631	4,71
7	1	2	1	2	240	0,0082	0
7	1	3	1	2	240	0,1269	11,09
7	1	4	1	2	240	0,0936	7,76
7	2	1	1	2	240	0,017	0,1
7	2	2	1	2	240	0,1893	17,3
7	2	3	1	2	240	0,0513	3,53
7	2	4	1	2	240	0,0638	4,78
8	1	1	1	2	240	0,0277	1,17
8	1	2	1	2	240	0,0177	0,17
8	1	3	1	2	240	0,0421	2,61
8	1	4	1	2	240	0,0337	1,77
8	2	1	1	2	240	0,1005	8,45
8	2	2	1	2	240	-0,011	0
8	2	3	1	2	240	0,0223	0,63
8	2	4	1	2	240	0,0559	3,9
9	1	1	1	2	240	0,0434-0,0207	3,21
9	1	2	1	2	240	0,0367	2,07
9	1	3	1	2	240	0,0284	1,24
9	1	4	1	2	240	0,017	0,1
9	2	1	1	2	240		0
9	2	2	1	2	240		0
9	2	3	1	2	240		0
9	2	4	1	2	240		0
10	1	1	1	2	240	0,0174-0,0173	0,27
10	1	2	1	2	240	0,0211	0,51
10	1	3	1	2	240	0,063	4,7
10	1	4	1	2	240	0,0243-0,0509	4,32
10	2	1	1	2	240		0
10	2	2	1	2	240		0
10	2	3	1	2	240		0
10	2	4	1	2	240		0

Sol kulak :1,Sağ kulak:2 Bölge:1(koklea bazal kısım),2(koklea 2. kısım),3(koklea apex),4(vestibül)
İlaç:1(deksametazon) Zaman:1(2 saat)

Tablo 3:Gentamisin 0,5 saatteki ilaç derişimleri

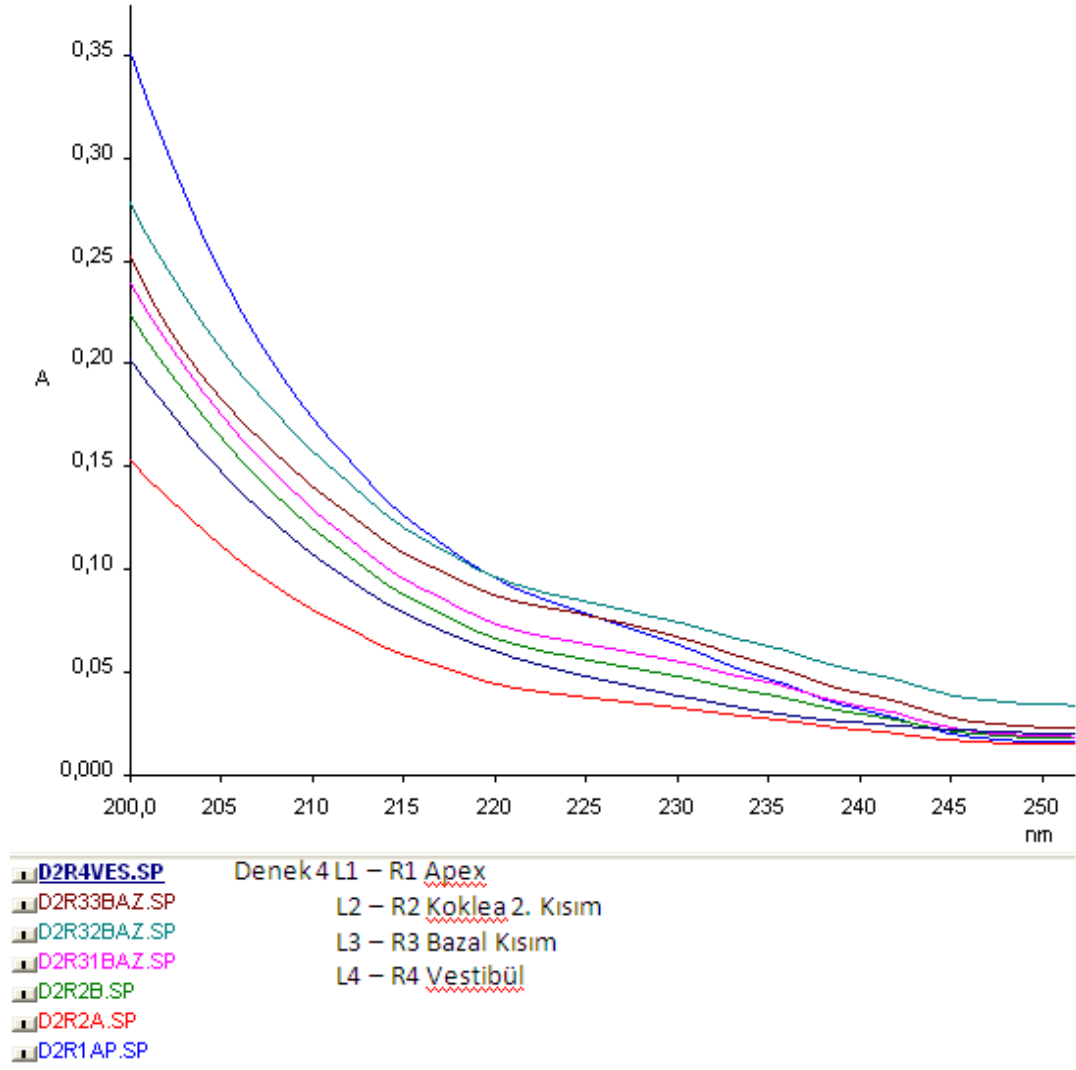
DENEK	KULAK	BÖLGE	İLAÇ	ZAMAN	DALGA BOYU	ABSORBANS DEĞERİ	DERİŞİM
11	1	1	2	1	210	0,1031	30
11	1	2	2	1	210	0,1751	50
11	1	3	2	1	210	0,2747	77
11	1	4	2	1	210	0,3749	104
11	2	1	2	1	210	0,3953	109
11	2	2	2	1	210	0,1892	54
11	2	3	2	1	210	0,3393	94
11	2	4	2	1	210	0,3096	86
11	1	1	2	1	255	0,0065	1
11	1	2	2	1	255	0,0154	3
11	1	3	2	1	255	0,0425	10
11	1	4	2	1	255	0,0321	7
11	2	1	2	1	255	0,1126	27
11	2	2	2	1	255	0,0294	7
11	2	3	2	1	255	0,0599	14
11	2	4	2	1	255	0,0626	15
12	1	1	2	1	210	0,2176	61
12	1	2	2	1	210	0,5438	150
12	1	3	2	1	210	0,3647	101
12	1	4	2	1	210	0,4465	124
12	2	1	2	1	210	0,7749	212
12	2	2	2	1	210	0,287	80
12	2	3	2	1	210	0,3562	99
12	2	4	2	1	210	0,4	111
12	1	1	2	1	255	0,04244	5
12	1	2	2	1	255	0,0842	20
12	1	3	2	1	255	0,0904	22
12	1	4	2	1	255	0,0972	24
12	2	1	2	1	255	0,2404	60
12	2	2	2	1	255	0,064	15
12	2	3	2	1	255	0,1001	24
12	2	4	2	1	255	0,1087	27

**Sol kulak: 1,Sağ kulak:2 Bölge:1(koklea bazal kısım),2(koklea 2. kısım),3(koklea apex),4(vestibül)
İlaç:2(gentamisin) Zaman:1(0,5 saat)**

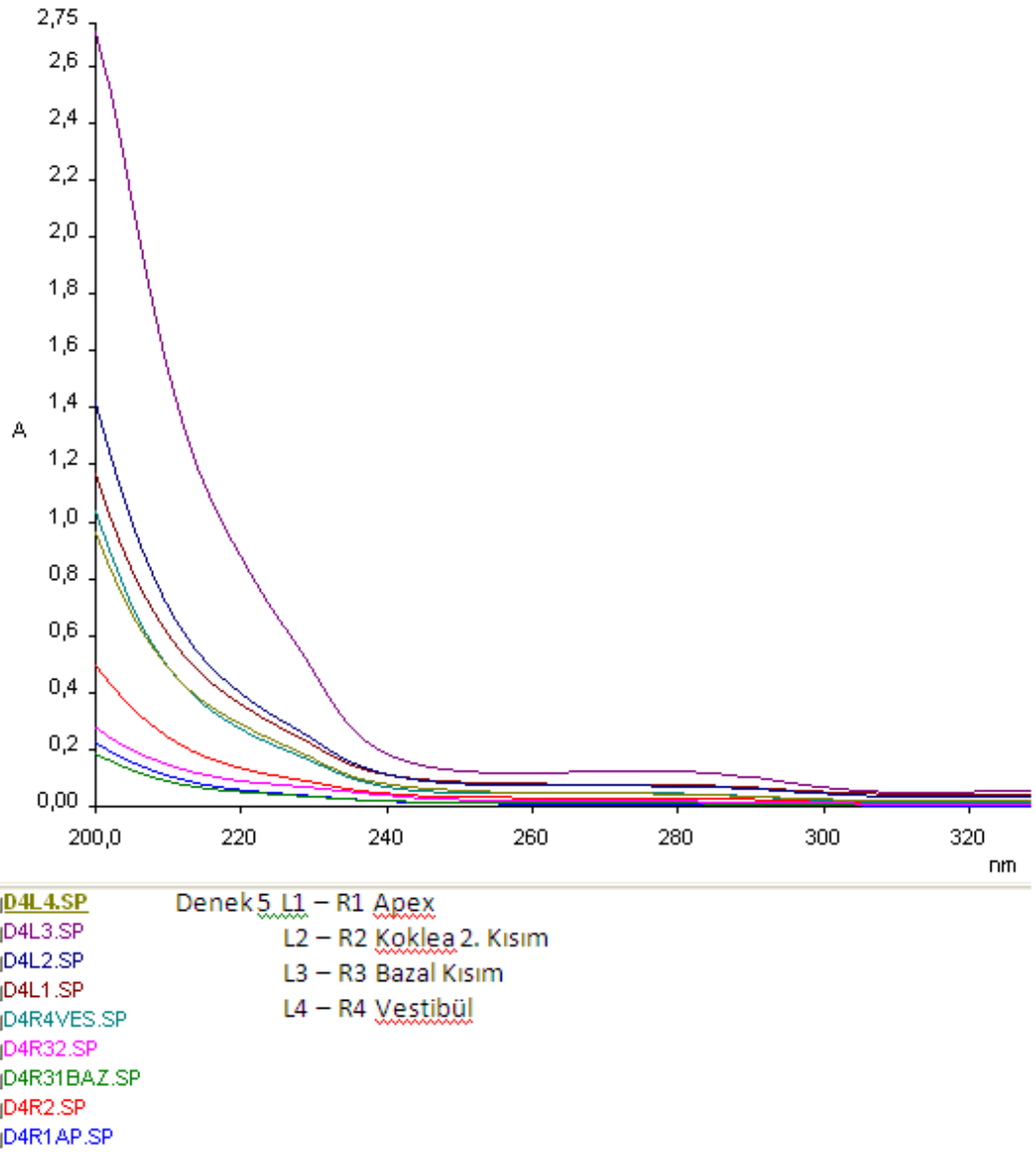
Tablo 4: Gentamisin 2 saat ilaç derişimleri

DENEK	KULAK	BÖLGE	İLAÇ	ZAMAN	DALGA BOYU	ABSORBANS DEĞERİ	DERİŞİM
13	1	1	2	2	210	0,4899	135
13	1	2	2	2	210	0,4933	136
13	1	3	2	2	210	0,2445	69
13	1	4	2	2	210	0,3924	104
13	2	1	2	2	210	0,1945	55
13	2	2	2	2	210	0,1986	56
13	2	3	2	2	210	0,4579	127
13	2	4	2	2	210	0,2941	82
13	1	1	2	2	255	0,1287	32
13	1	2	2	2	255	0,1194	29
13	1	3	2	2	255	0,061	15
13	1	4	2	2	255	0,1173	29
13	2	1	2	2	255	0,0387	8
13	2	2	2	2	255	0,051	12
13	2	3	2	2	255	0,162	40
13	2	4	2	2	255	0,096	23
14	1	1	2	2	210	0,3542	96
14	1	2	2	2	210	0,3339	93
14	1	3	2	2	210	0,2667	75
14	1	4	2	2	210	0,9987	273
14	2	1	2	2	210	0,9399	258
14	2	2	2	2	210	0,6971	192
14	2	3	2	2	210	0,7143	196
14	2	4	2	2	210	0,3851	106
14	1	1	2	2	255	0,1318	32
14	1	2	2	2	255	0,1049	26
14	1	3	2	2	255	0,0918	22
14	1	4	2	2	255	0,187	46
14	2	1	2	2	255	0,4721	118
14	2	2	2	2	255	0,4757	119
14	2	3	2	2	255	0,4089	102
14	2	4	2	2	255	0,1246	30

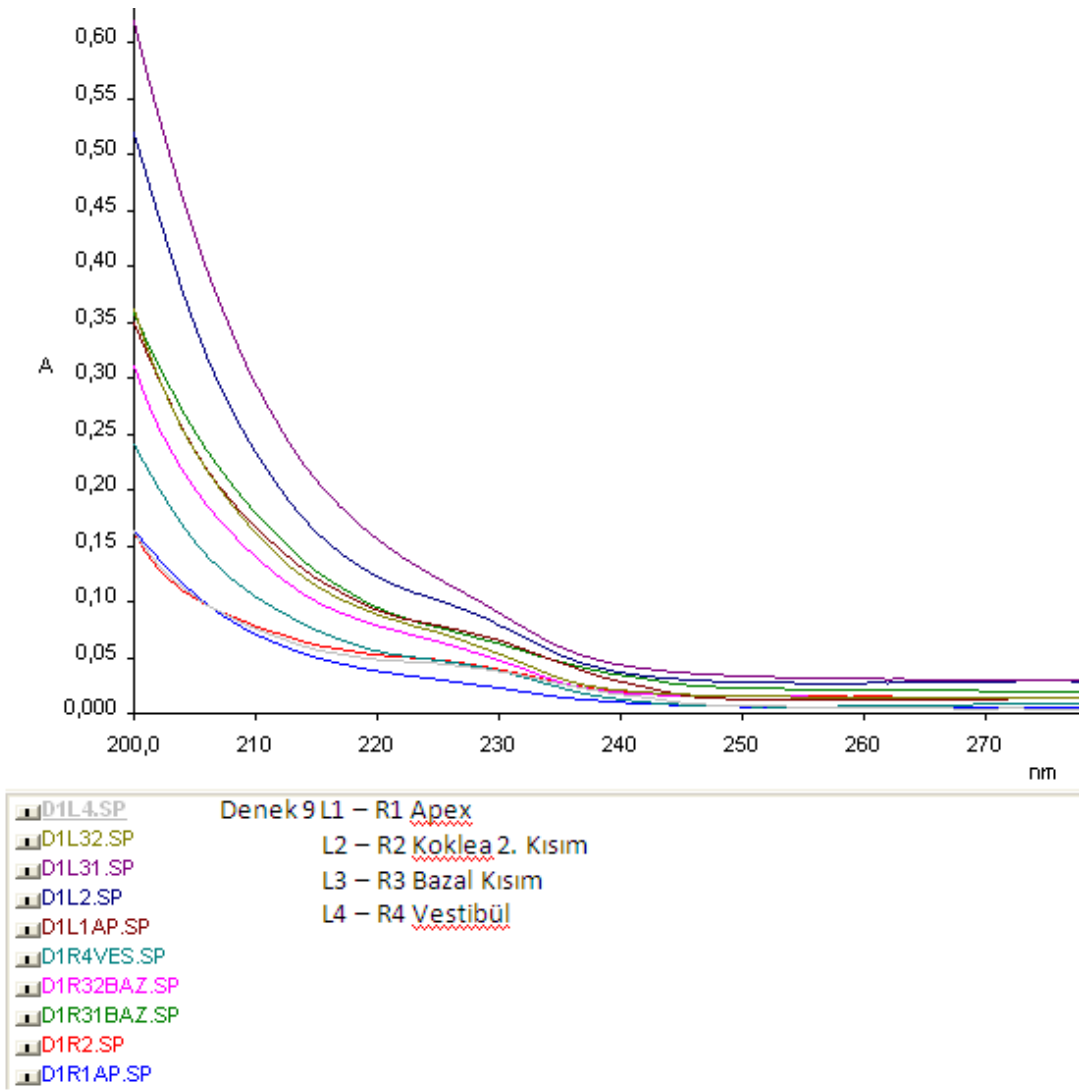
Sol kulak: 1,Sağ kulak:2 Bölge:1(koklea bazal kısım),2(koklea 2. kısım),3(koklea apex),4(vestibül)
İlaç:2(gentamisin) Zaman:1(2 saat)



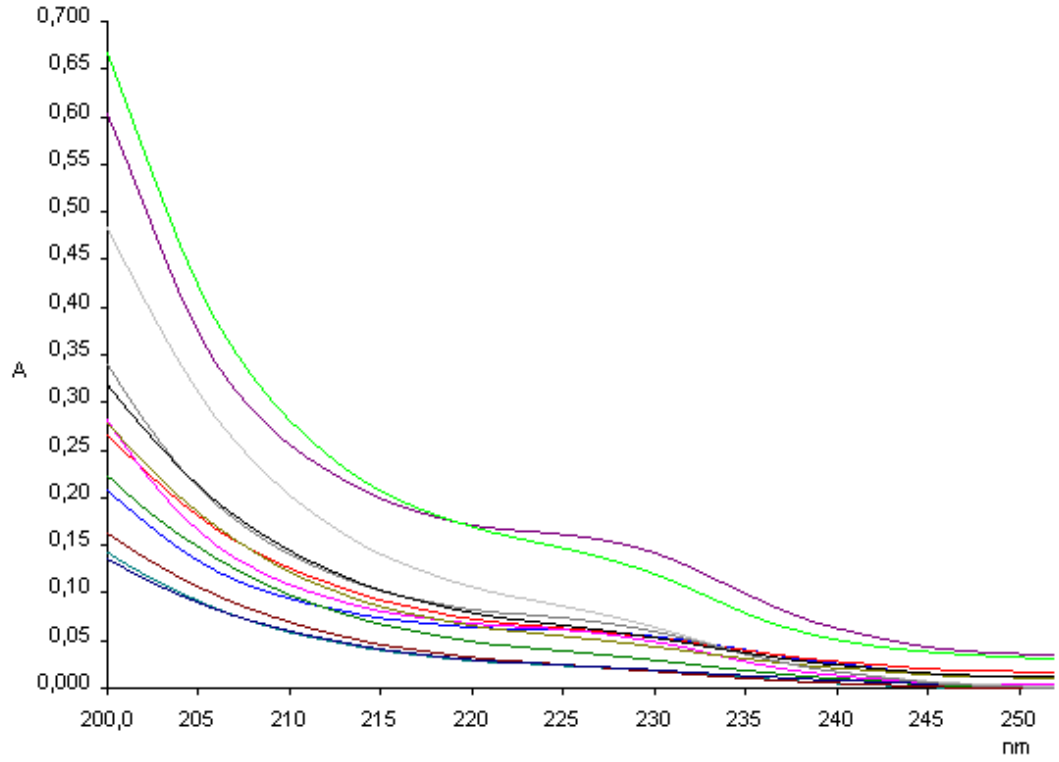
Şekil 3:Denek 4 deksametazon için 0,5 saat UV grafiği



Şekil 4: Denek 5 deksametazon 0,5 saat UV grafiği



Şekil 5: Denek 9 deksametazon 2 saat UV grafiği

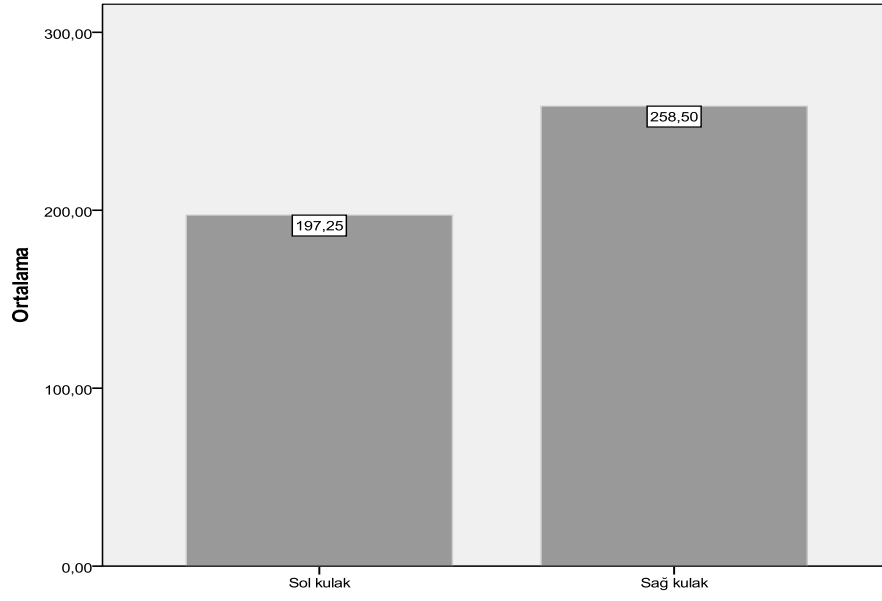
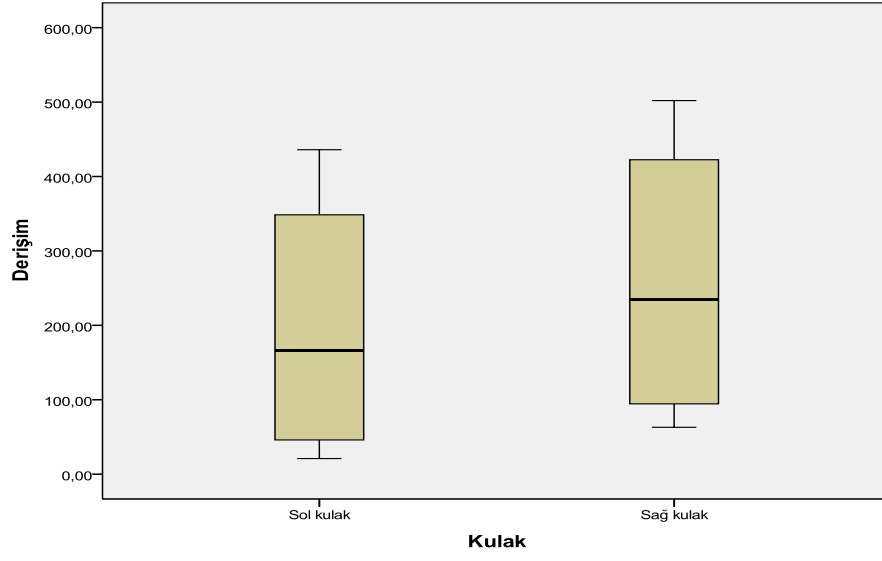


- | | |
|--|--------------------------------|
| ■ D3L42VES.SP | Denek 10 L1 – R1 Apex |
| ■ D3L41VES.SP | L2 – R2 <u>Koklea 2. Kısım</u> |
| ■ D3L32BAZ.SP | L3 – R3 Bazal Kısım |
| ■ D3L31BAZ.SP | L4 – R4 <u>Vestibül</u> |
| ■ D3L2.SP | |
| ■ D3L1AP.SP | |
| ■ D3R42VES.SP | |
| ■ D3R41VES.SP | |
| ■ D3R33BAZ.SP | |
| ■ D3R32BAZ.SP | |
| ■ D3R31BAZ.SP | |
| ■ D3R2.SP | |
| ■ D3R1AP.SP | |

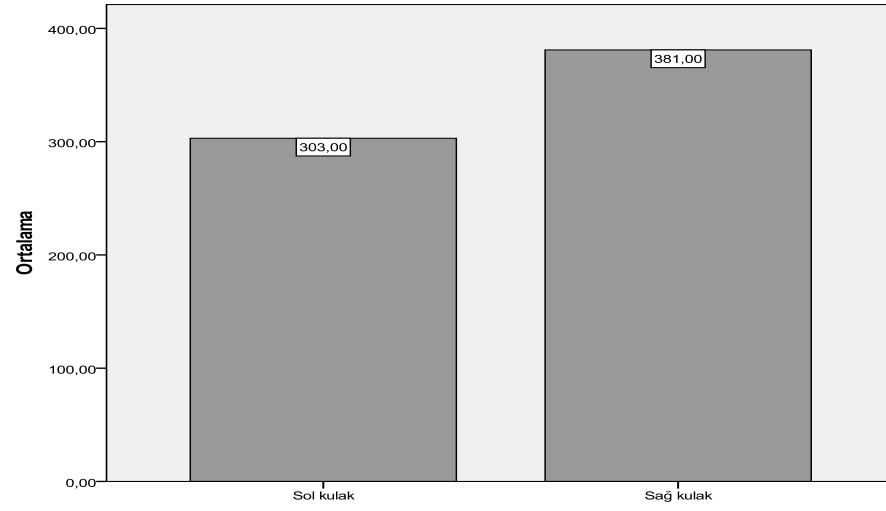
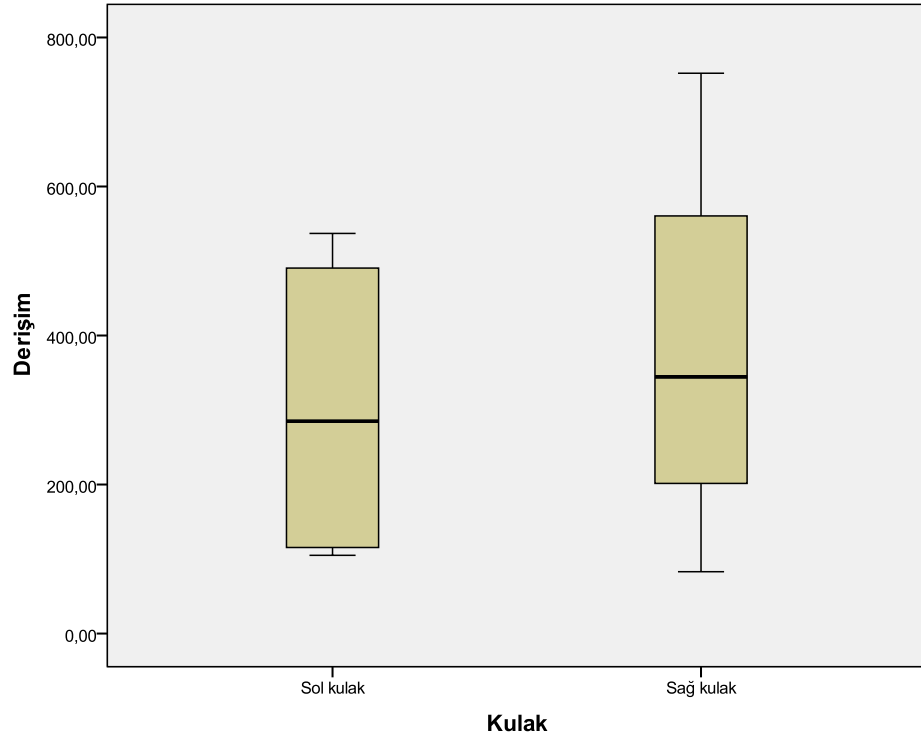
Şekil 2:Denek 10 deksametazon 2 için saat UV grafiği

Tablo 5:Gentamisin-Deksametazon 0,5–2 Saat Ortalama Değerleri

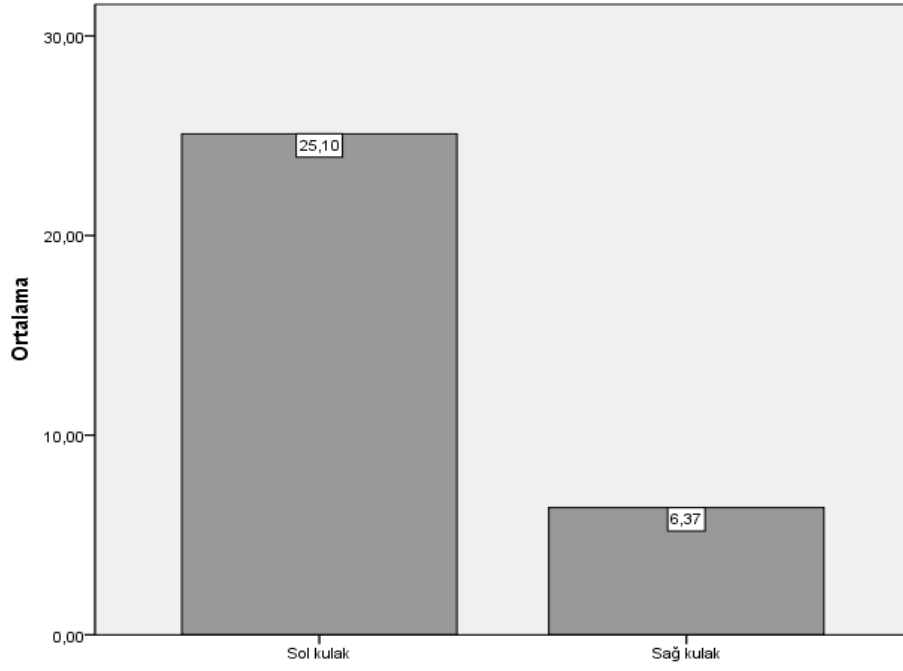
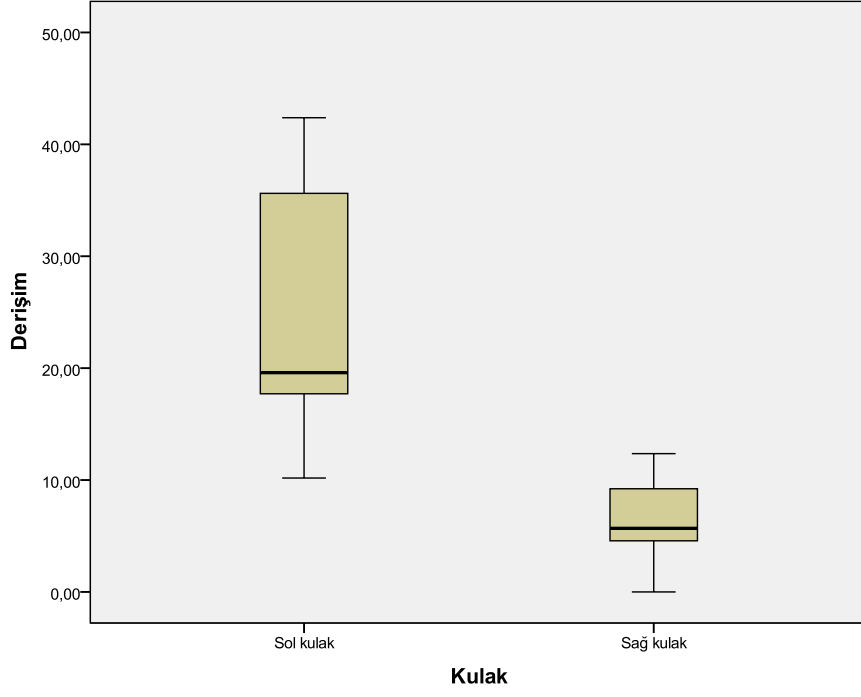
GENTAMİSİN 0,5 SAAT SAĞ SOL KARŞILAŞTIRMASI	Ortalama ± Standart Sapma	Medyan (Min - Maks)	p
SOL_KULAK	197,25 ± 189,8	166 (21 – 436)	0,068
SAĞ_KULAK	258,5 ± 201,83	234,5 (63 – 502)	
GENTAMİSİN 2 SAAT SAĞ SOL KARŞILAŞTIRMASI	Ortalama ± Standart Sapma	Medyan (Min - Maks)	
SOL_KULAK	303 ± 219,98	285 (105 – 537)	0,465
SAĞ_KULAK	381 ± 277,07	344,5 (83 – 752)	
DEKSAMETAZON - 0,5 SAAT SAĞ SOL KARŞILAŞTIRMASI	Ortalama ± Standart Sapma	Medyan (Min - Maks)	
SOL_KULAK	25,1 ± 13,39	19,59 (10,18 – 42,38)	0,043
SAĞ_KULAK	6,37 ± 4,7	5,69 (0 – 12,36)	
DEKSAMETAZON 2 SAAT SAĞ SOL KARŞILAŞTIRMASI	Ortalama ± Standart Sapma	Medyan (Min - Maks)	
SOL_KULAK	24,31 ± 29,68	9,8 (5,72 – 75,83)	0,345
SAĞ_KULAK	13,04 ± 13,05	12,98 (0 – 26,49)	



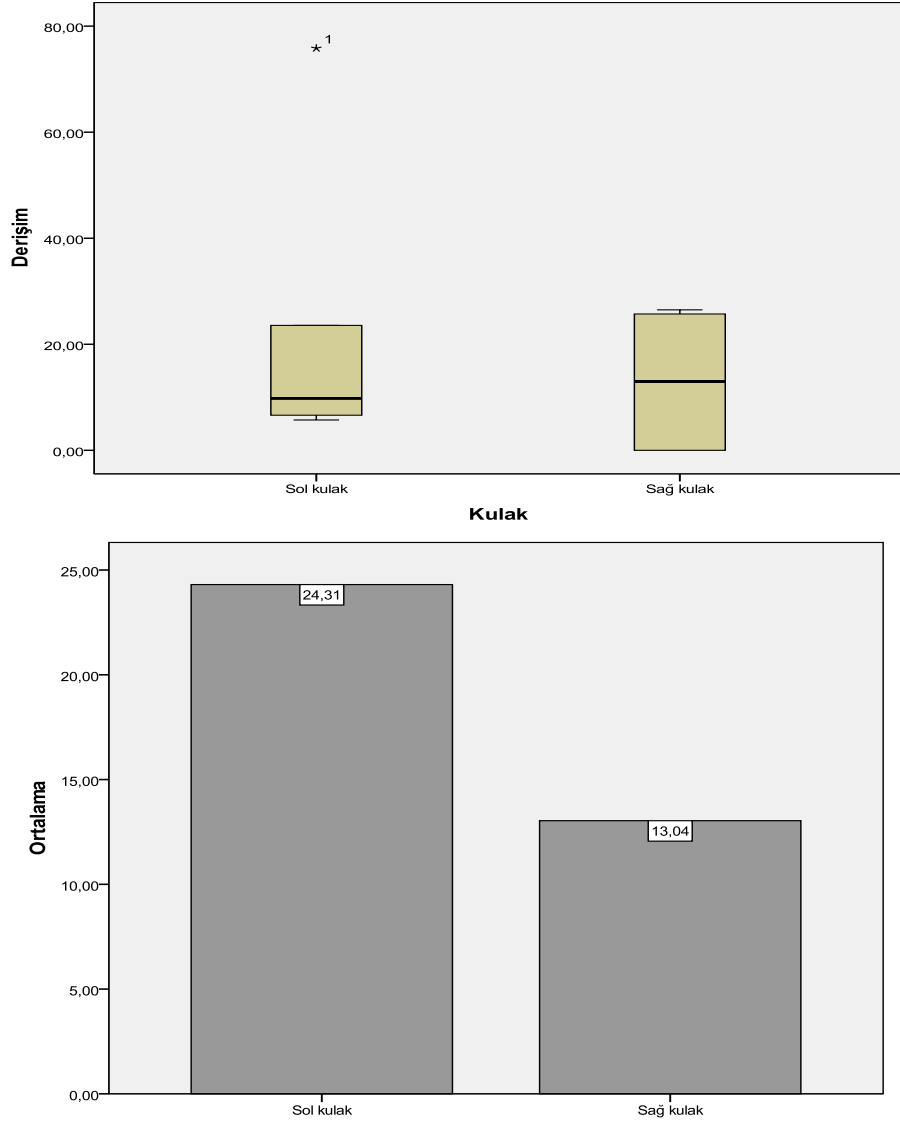
Şekil 7: Gentamisin 0,5 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması



Şekil 3: Gentamisin 2 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması

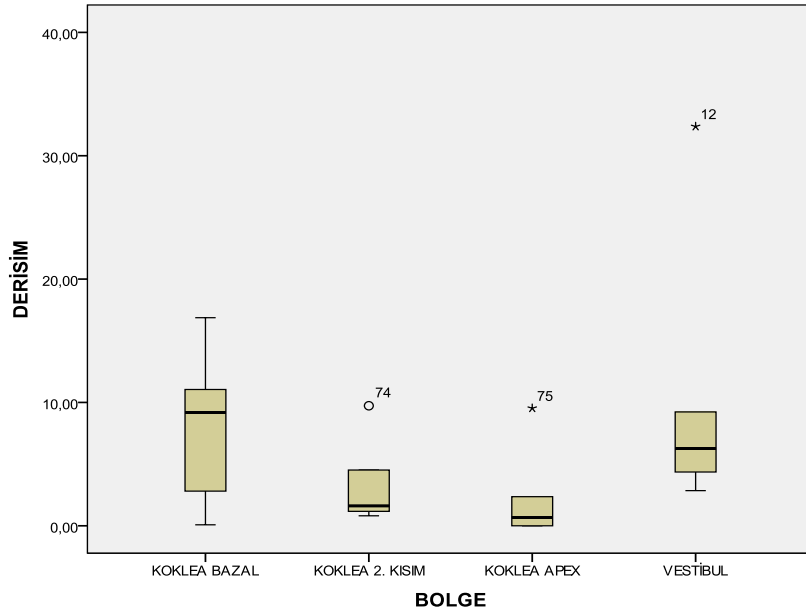
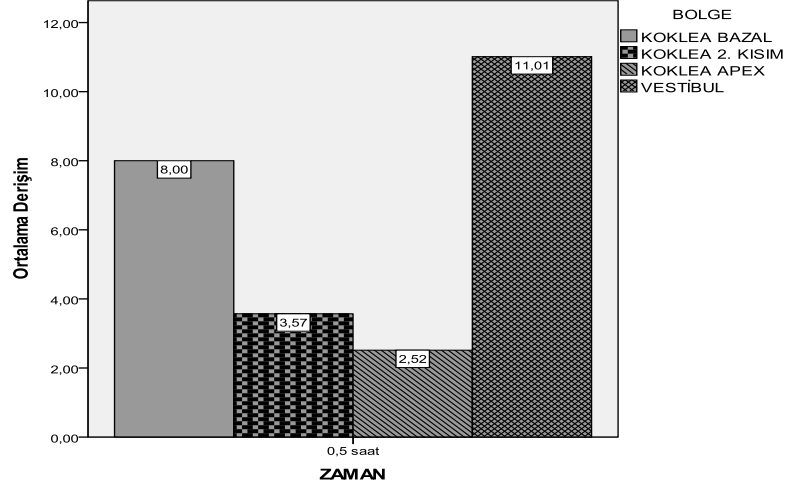


Şekil 4: Dekametazon 0,5 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması



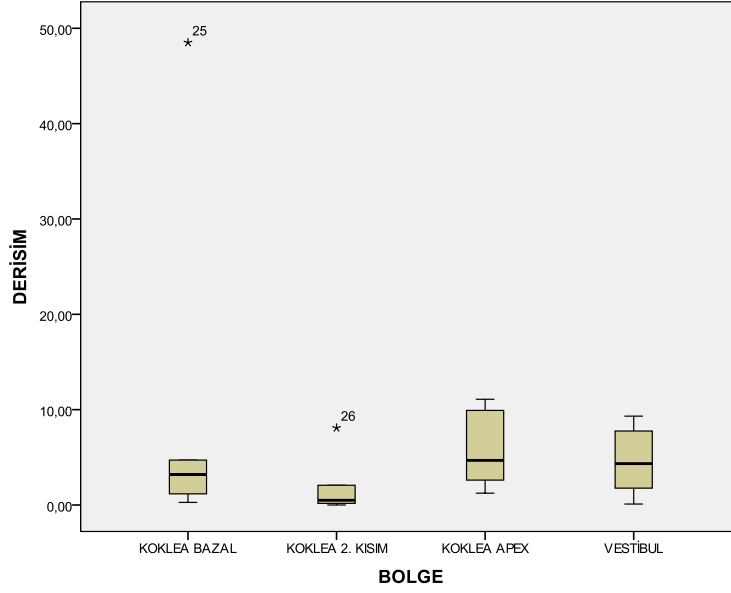
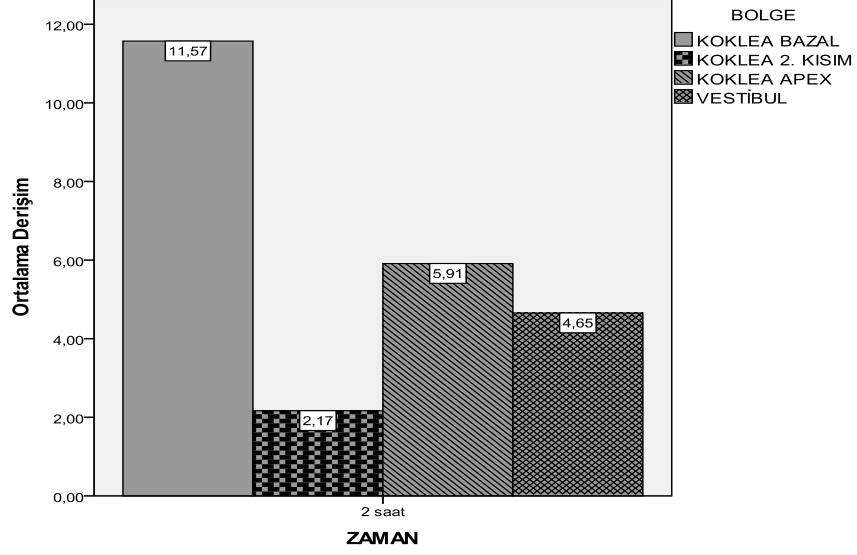
Şekil 10: Deksametazon 2 saat sağ-sol kulak derişim karşılaştırması

DEXA - SOL KULAK - 0,5 SAAT	Ortalama \pm Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	8 \pm 6,69	9,19 (0,08 - 16,87)	0,172
KOKLEA 2. KISIM	3,57 \pm 3,74	1,61 (0,81 - 9,73)	
KOKLEA APEX	2,52 \pm 4,04	0,69 (0 - 9,53)	
VESTİBUL	11,01 \pm 12,17	6,25 (2,85 - 32,37)	



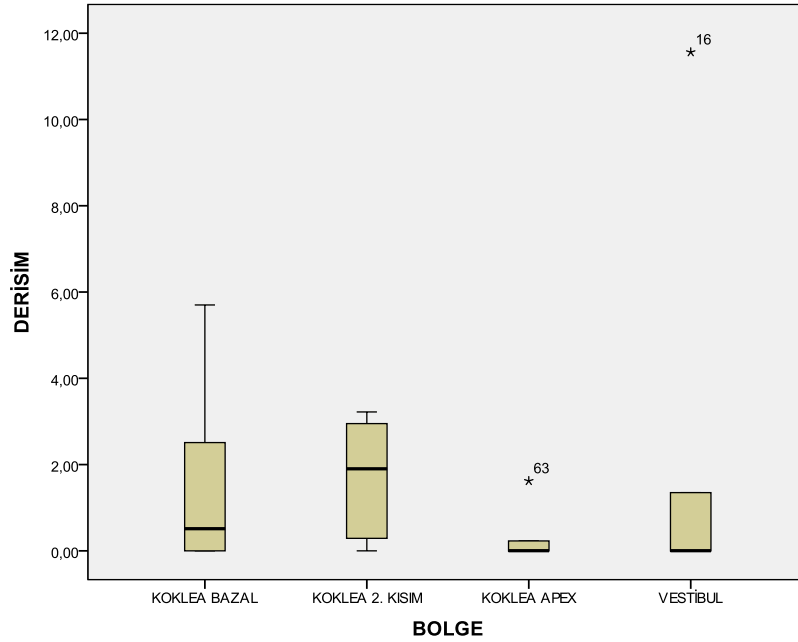
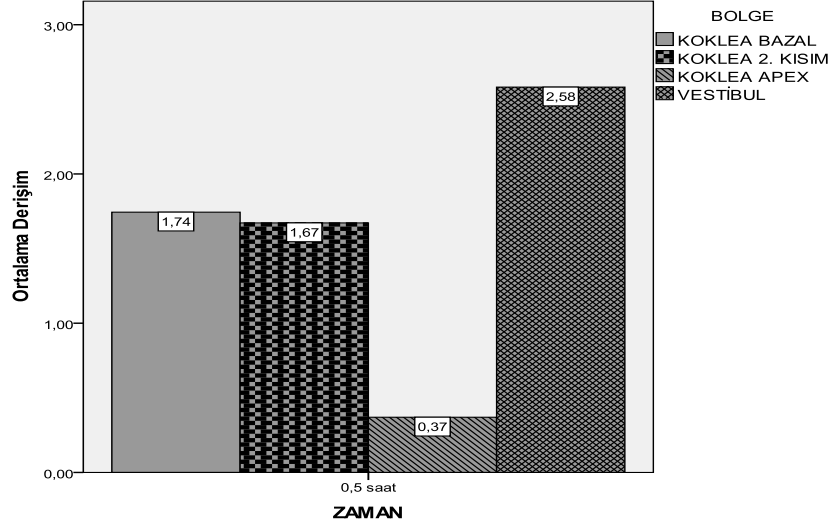
Şekil 11: Deksametazon yapılan sol kulakların 0,5 saatteki koklea bölge-derişim grafiğı

DEXA - SOL KULAK - 2 SAAT	Ortalama \pm Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	11,57 \pm 20,72	3,21 (0,27 - 48,5)	0,361
KOKLEA 2. KISIM	2,17 \pm 3,41	0,51 (0 - 8,09)	
KOKLEA APEX	5,91 \pm 4,39	4,7 (1,24 - 11,09)	
VESTİBUL	4,65 \pm 3,89	4,32 (0,1 - 9,32)	



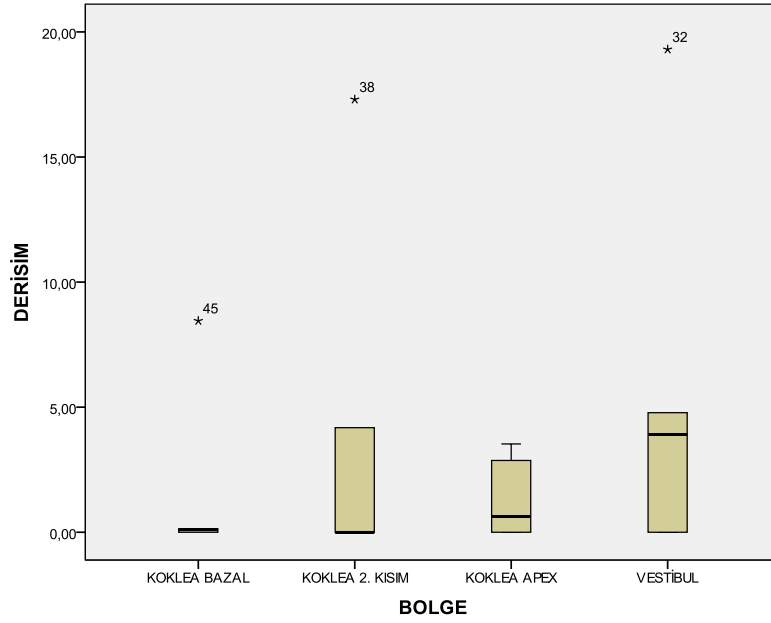
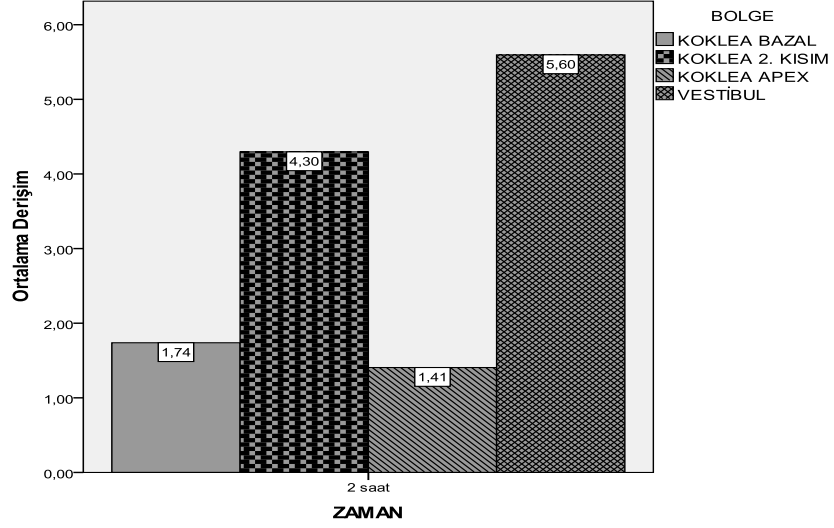
Şekil 12: Deksametazon yapılan sol kulakların 2. saatteki koklea bölge- derişim grafiği

DEXA - SAĞ KULAK - 0,5 SAAT	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	1,74 ± 2,44	0,51 (0 - 5,7)	0,467
KOKLEA 2. KISIM	1,67 ± 1,48	1,9 (0 - 3,22)	
KOKLEA APEX	0,37 ± 0,71	0 (0 - 1,62)	
VESTİBUL	2,58 ± 5,05	0 (0 - 11,56)	



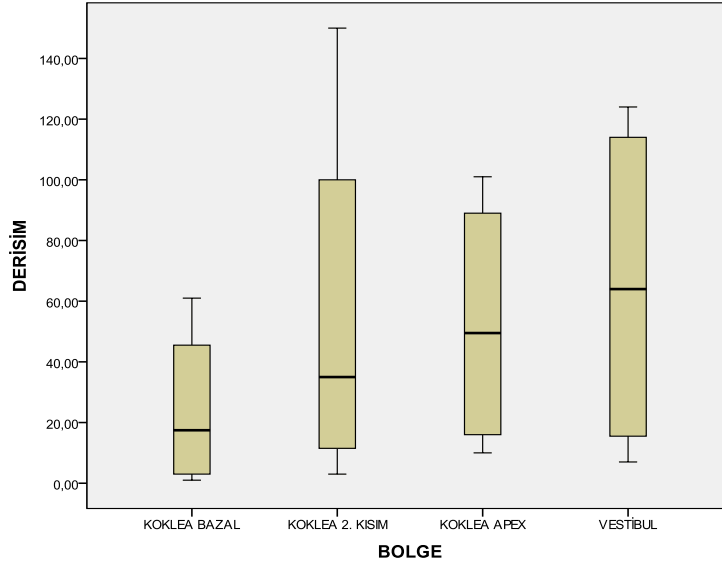
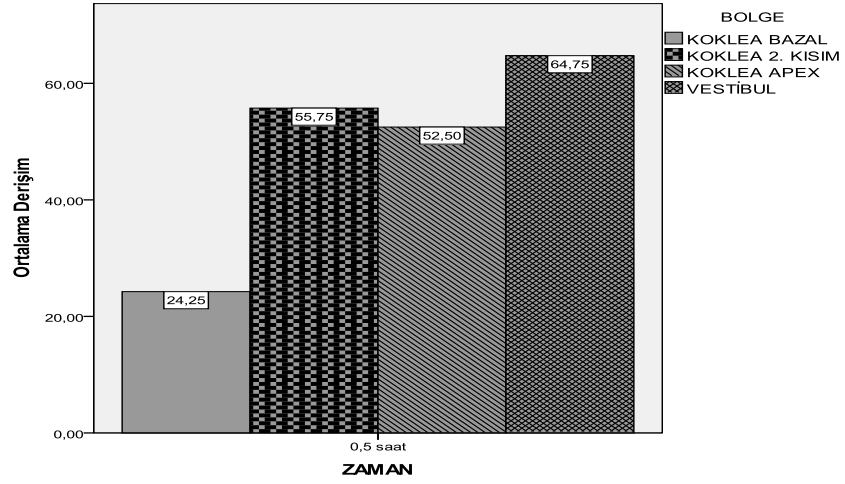
Şekil 13: Deksametazon yapılan sağ kulakların 0,5. saatteki koklea bölge-derişim grafiğı

DEXA - SAĞ KULAK - 2 SAAT	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	1,74 ± 3,75	0,1 (0 - 8,45)	0,859
KOKLEA 2. KISIM	4,3 ± 7,49	0 (0 - 17,3)	
KOKLEA APEX	1,41 ± 1,67	0,63 (0 - 3,53)	
VESTİBUL	5,6 ± 7,97	3,9 (0 - 19,3)	



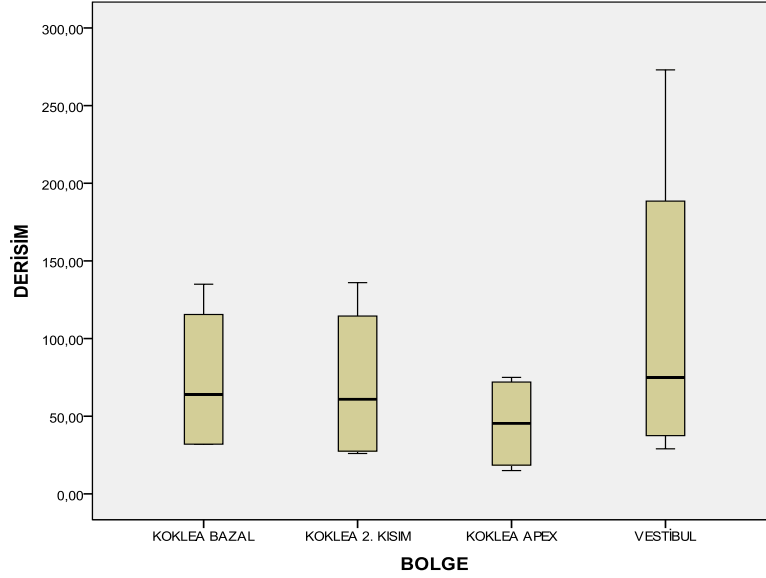
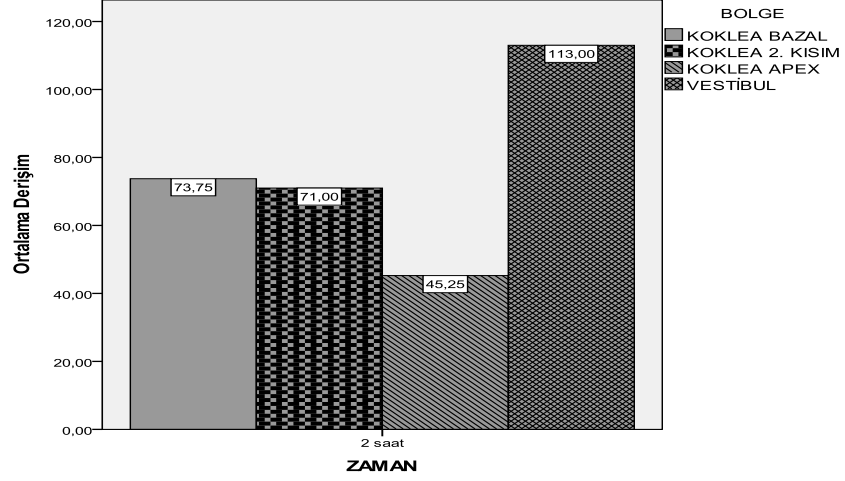
Şekil 14: Dekametazon yapılan sağ kulakların 2. saatteki koklea bölge-derişim grafiği

GENTA - SOL KULAK - 0,5 SAAT	Ortalama \pm Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	24,25 \pm 27,66	17,5 (1 - 61)	0,627
KOKLEA 2. KISIM	55,75 \pm 65,77	35 (3 - 150)	
KOKLEA APEX	52,5 \pm 43,55	49,5 (10 - 101)	
VESTİBUL	64,75 \pm 57,87	64 (7 - 124)	



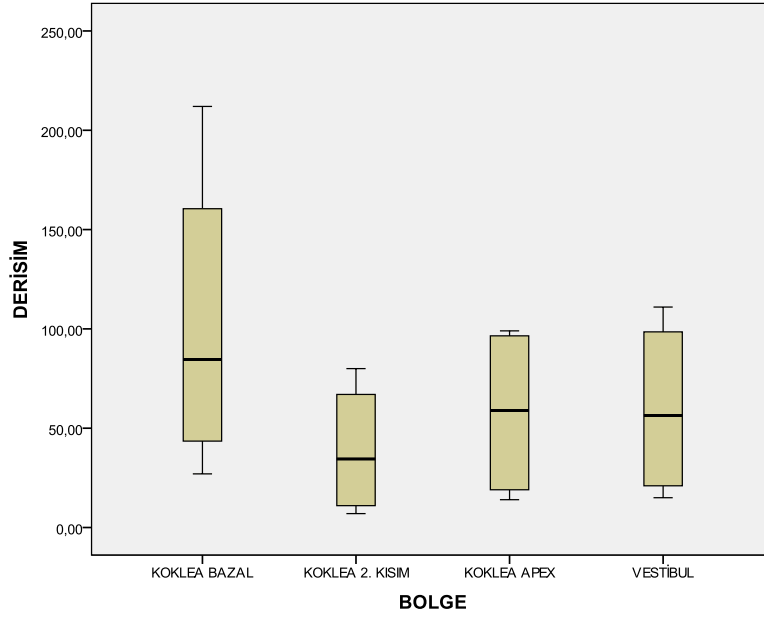
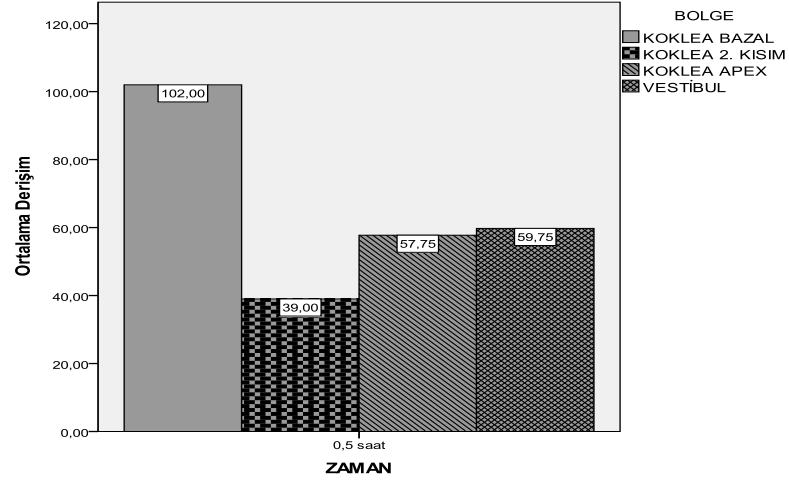
Şekil 15:Gentamisin yapılan sol kulakların 0,5. saatteki koklea bölge- derişim grafiği

GENTA - SOL KULAK - 2 SAAT	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	73,75 ± 50,77	64 (32 - 135)	0,476
KOKLEA 2. KISIM	71 ± 53,22	61 (26 - 136)	
KOKLEA APEX	45,25 ± 31,12	45,5 (15 - 75)	
VESTİBUL	113 ± 111,39	75 (29 - 273)	



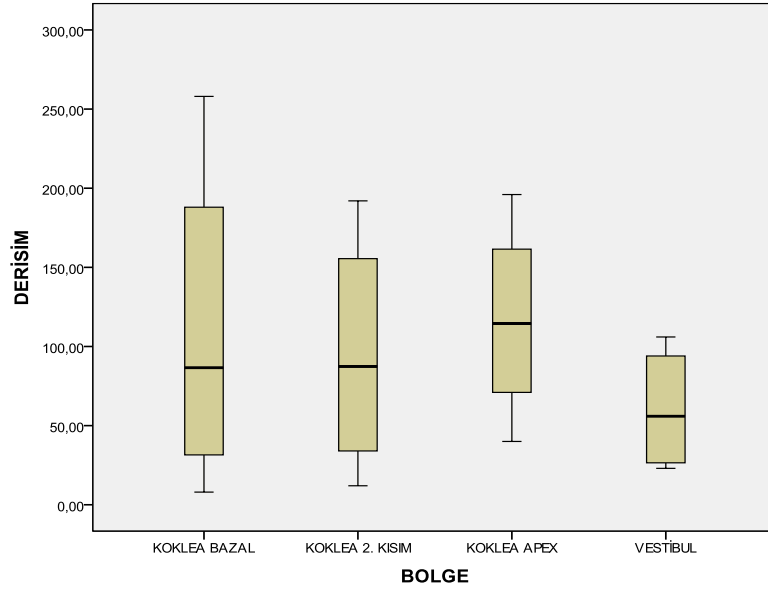
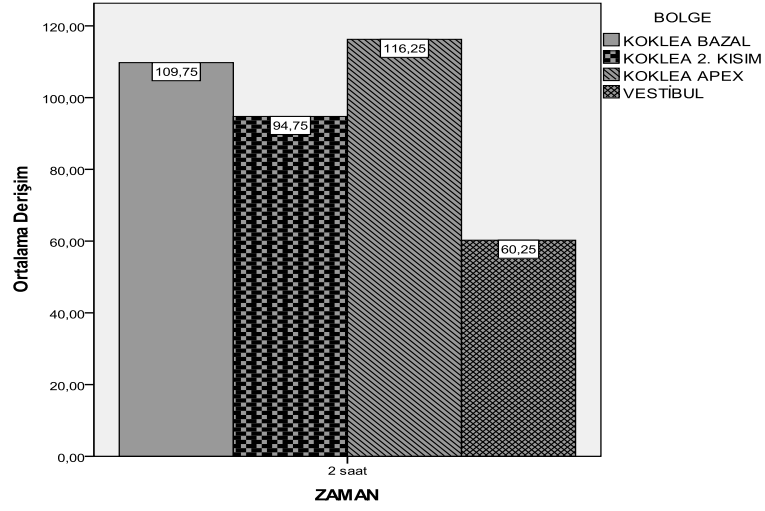
Şekil 16: Gentamisin yapılan sol kulakların 2. saatteki koklea bölge- derişim grafiği

GENTA - SAĞ KULAK - 0,5 SAAT	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	102 ± 80,7	84,5 (27 - 212)	0,389
KOKLEA 2. KISIM	39 ± 34,19	34,5 (7 - 80)	
KOKLEA APEX	57,75 ± 44,98	59 (14 - 99)	
VESTİBUL	59,75 ± 46,15	56,5 (15 - 111)	



Şekil 17: Gentamisin yapılan sağ kulakların 0,5. saatteki koklea bölge- derişim grafiğı

GENTA - SAĞ KULAK - 2 SAAT	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (min - maks)	p
KOKLEA BAZAL	109,75 ± 108,62	86,5 (8 - 258)	0,657
KOKLEA 2. KISIM	94,75 ± 78,3	87,5 (12 - 192)	
KOKLEA APEX	116,25 ± 64,53	114,5 (40 - 196)	
VESTİBUL	60,25 ± 40,29	56 (23 - 106)	



Şekil 18: Gentamisin yapılan sağ kulakların 2. saatteki koklea bölge- derişim grafiği

5.TARTIŞMA

İnatrimpanik ilaç uygulamaları başta MH ve ani işitme kaybı olmak üzere otoimmün iç kulak hastalıkları, tinnitus, progresif sensörinöral işitme kaybı ve koklear implant travması gibi iç kulak hastalıklarının tedavisinde son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir. En sık kullanılan ilaçlar aminoglikozidler ve glukokortikoidlerdir. Orta kulağa ilaç enjeksiyonu ile amaç sistemik tedavi ile oluşabilecek ilaç yan etkilerinden kaçınmak ve daha yüksek perilenf ilaç düzeyi sağlayabilmektir. Chandrasekhar ve ark. Yaptıkları çalışmada inatrimpanik olarak verilen deksametazonun intravenöz yola oranla çok daha yüksek perilenf konsantrasyonuna ulaştığını bulmuşlardır(9). İnatrimpanik ilaç tedavilerinde ana sorunlar ilacın kokleaya geçip geçmediği, geçiyorsa ne kadar kaldığı ve kokleada nereye kadar gidebildiğidir. Bu konuda birçok deneysel çalışma yapılmıştır.

Literatürde yapılan birçok immunohistokimyasal ve fonksiyonel çalışmada deksametazon ve gentamisin iç kulaktaki varlıkları ve etkileri gösterilmiştir. YPM'na uygulanan ilaçların koklea bazalinde apekse göre daha fazla hücresel hasar yaptığı bilinmektedir.

Hedef hücrelerde hücre membranını geçen kortikosteroidler, sitoplazma ve çekirdek içindeki kendilerine özgü reseptör proteini ile birleşirler(64). Bu reseptörlerin insan iç kulağında koklear ve vestibuler dokularda varlığı gösterilmiştir. En yoğun spiral ligamanda olmak üzere, corti organı ve stria vaskulariste glukokortikoid hormon reseptör varlığı gösterilmiştir(65).

Harguani ve ark. Tarafından yapılan çalışmada farelere 4mg/ml dozunda İT yolla deksametazon uygulanmış ve ilacın iç kulaktaki glukokortikoid reseptörlerine bağlı olarak spiral ligament, Corti organı, spiral ganglion ve duysal vestibüler epitel ve spiral ganglionda yoğun olarak dağıldığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir(77).

Biz çalışmamızda; 2 farklı zaman diliminde (0,5 saat ve 2 saat) 8 mg/2 ml deksametazonu İT olarak uyguladığımız 10 adet guinea pig koklea ve vestibülündeki ilaç konsantrasyonunu araştırdık. Her 2 zaman diliminde de işlem grubunda kokleanın bütün bölümlerinde ve vestibülde deksametazon varlığını tespit ettik. Bazı deneklerde deksametazon uygulanmayan kontrol grubunda da işlem grubuna göre daha az miktarlarda olmak üzere ilaç varlığı tespit ettik. Kontrol kulağında ilaç varlığı; deneklerin 0,5 saat ve 2 saatlik zaman dilimleri boyunca işlem kulağı yukarıda kontrol kulağı aşağıda olacak şekilde yatmalarına ve bu süreler içinde üstaki tüpü boyunca karşı orta kulağa ilaç geçişlerine bağlanabilir. Temporal kemik diseksiyonu öncesi işlem yapılan bulla serum fizyolojik ile hemen yıkanmıştır. Ancak işlem yapılmayan karşı kulak bullası serum fizyolojik ile yıkanmamıştır. Guinea pig kokleası bulla içinde açıkta durmaktadır ve etrafında ayrıca bir kemik

doku yoktur. Karşı bullaya östaki tüpünden geçen deksametazon ile direk kemik bulaşı ve YPM yoluyla iç kulağa geçiş olabilir.

Plontke ve ark. Yaptıkları bilgisayar simulasyon modelinde; iç kulak sıvılarında gentamisin farmakokinetik özelliklerini, iç kulak boyutlarını, ilaç dağılım süreçlerini, klerensini ve interskalar ilaç değişimlerini tanımlamışlar ve in vivo verilere yakın sonuçlar bulmuşlardır. YPM'ına uygulanan ilacın vestibüle helikotremadaki difüzyondan çok, skalalar arası iletimle geçtiğini göstermişlerdir(10).

İmamura ve Adams guinea piglerde yaptıkları çalışmada 50 µl dozunda gentamisini yuvarlak pencere membranı yoluyla uygulamışlar ve sonuçları immunohistokimyasal boyama ile değerlendirmişler. Lokal uygulama ile dejenerasyonun sıklıkla korti organı, spiral ligament, spiral limbus ve spiral ganglion hücrelerinde olduğu, korti organındaki hücre dejenerasyonunun daha çok bazal kıvrımda meydana geldiği belirtilmiştir(78). Bu çalışmada dış tüylü hücrelerin gentamisin toksisitesine daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Aminoglikozid ototoksitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada gentamisin tedavisi alan 29 hastanın 52 temporal kemiği postmortem mikrodisseksiyon yöntemi ile seri kesitler alınarak, histopatolojik olarak incelenmiş. Dış tüylü hücrelerin en erken, iç tüylü hücreleri ise daha sonra etkilendiği, dejenerasyonun koklea bazalinden başlayıp apekse doğru ilerlediği ve stria vaskülerinin kokleanın bütün tabakalarında etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca ototoksik lezyonların asimetrik olabileceği de bildirilmiştir(79).

Zhai ve ark tarafından yapılan çalışmada İT gentamisin enjeksiyonu yapılan guinea piglerde saçlı hücreler, transizyonel hücreler ve vestibuler dark hücreler ayrı ayrı incelenmiştir ve yarım daire kanallarındaki dark hücrelerinde gentamisin tutulumunun çok zayıf olduğu görülmüştür. Elektron mikroskopisi ile yapılan ultrasütrüktürel çalışmada ise dark hücrelerde minimal apoptoz ve nekroz görülmüştür(80).

Çalışmamızda, deksametazon grubu ile benzer şekilde 2 farklı zaman diliminde (0,5 saat ve 2 saat) 40mg/ml gentamisini IT olarak uyguladık ve iç kulaktaki ilaç konsantrasyonunu araştırdık. Tüm deneklerde koklea bütün bölümlerinde ve vestibülde ilaç varlığı gözlemlendi. Kontrol grubunda da işlem grubundaki konsantrasyonlara benzer miktarlarda gentamisin varlığı tespit edildi. Deksametazon grubunda olduğu gibi kontrol grubundaki ilaç varlığı östaki tüpünden ilaç geçişine bağlandı. Denekler işlem sonrası hiç uyandırılmadılar ve belirlenen zaman dilimleri boyunca aynı pozisyonda yattıktan sonra sakrifiye edildiler. Bu zaman diliminde östaki tüpünden işlem yapılmayan karşı bullaya ilaç geçişi olabilir ve karşı kokleada ilaç bulaşı olabilir.

Diğer önemli bir sorun da IT olarak uygulanan ilaçların, kokleada ne kadar süre ile kaldığı ve nereye kadar gidebildiğidir. Biz çalışmamızda 2 zaman diliminde (0,5 saat ve 2 saat) ölçümler yaptık ve her 2 zaman diliminde koklea ve vestibülde ilaç varlığını gösterdik.

Deksametazonun İT uygulama sonrası iç kulağa 15 dakikada geçtiği, iç kulakta en yüksek seviyelerine 1. saatte ulaştığı ve 24 saatte tamamen kaybolduğu da gösterilmiştir(77).

Çok az zaman periyodu içinde (1–2 dk) koklear apeksten ardışık alınan multipl örneklerde ST boyunca ilacın gradienti ve konsantrasyonu kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu teknik göstermiştir ki YPM'na 2–3 saatlik ilaç ya da marker iyon uygulamaları sonucunda ST boyunca önemli gradientler vardır. Birçok hayvanda TMPA(iyonik marker),gentamisin ve deksametazon için 1000 kattan daha fazla bazal apikal konsantrasyon farkları bulunmuştur(5).

2008 yılında Plontke ve ark tarafından 9 adet guinea pig kullanılarak yapılan çalışmada kobayların YPM'na 2–3 saat boyunca deksametazon–21-dihidrojen-fosfat (10mg/ml) uygulaması sonrası koklear apeksten kılcal tüpler yardımı ile her biri yaklaşık 1µl olan perilenf numuneleri alınmış. Numunelerin deksametazon konsantrasyonları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiş. Apikal bölgelerden alınan ilk perilenf numunelerindeki deksametazon konsantrasyonları bazal dönüşleri gösteren 3. ve 4. numunelerdeki deksametazon konsantrasyonlarından önemli ölçüde düşük olarak ölçülmüş. Bilgisayar simülasyon modeli kullanılarak ölçülen numune konsantrasyonlarının detaylı analizinden sonra bazal-apikal konsantrasyon gradienti 17000 olarak tahmin edilmiştir. ST'deki deksametazon mutlak konsantrasyonlarında ve bazal apikal gradientlerde önemli ölçüde farklılıklar bulunmuştur (81).

Yapılan benzer bir çalışmada ise YPM'na gentamisin uygulamasından 3 saat sonra alınan numunelerde ST boyunca önemli gradient farkları oluşmuş ve apeksten alınan sıralı perilenf örneklerinde tabanda apekse oranla 4000 misli daha büyük konsantrasyonlar ölçülmüştür(82).

Hiel ve ark. tarafından guinea pigler üzerinde yapılmış bir çalışmada deneklere 60 mg/kg/gün gentamisin 6 gün boyunca subkutan enjekte edilmiş.1.,9. ve 41.günlerde koklear fonksiyonları ölçülmüş ve dış tüylü hücrelerin immunohistokimyasal incelemeleri yapılmış. 41.gün grubunda koklear fonksiyonlarda minimal değişiklik meydana gelirken immunohistokimyasal incelemede kokleanın tüm kesitlerinde dış tüylü hücrelerde gentamisin varlığı gösterilmiş. Bu çalışma ile gentamisinin ototoksik etkisi başlamadan dış tüylü hücrelerde biriktiği, bu birikimin uzun süre devam ettiği ve iç kulaktan klerensinin çok yavaş olduğu gösterilmiştir(83)

Kedilerin orta kulağına gentamisin infüzyonu sonrası yapılan histopatolojik çalışma ile koklea ve vestibuler sistemdeki değişiklikler araştırılmıştır. Kedilerin orta kulaklarına 3 mg/ml gentamisin 19 gün boyunca ve 30 mg/ml gentamisin 5 gün boyunca infüzyon şeklinde uygulanmış. Kokleanın bazal kıvrımında özellikle dış tüylü hücrelerde kayıp olduğu ve bu kaybın koklea apeksine doğru gittikçe azaldığı görülmüştür. Yüksek gentamisin konsantrasyonu ile Korti organı yapısının tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (84).

Guinea piglerde yapılan bir çalışmada 100 mg/kg gentamisini intraperitoneal (ip) olarak uygulamışlar ve sonuçları immunohistokimyasal boyama ile değerlendirmişler. Sistemik uygulama ile dış tüylü hücreler ve Deiter's hücrelerinde boyanmanın yaklaşık 2. saatte başladığını, 6. saate maksimuma ulaştığını ve 6 aya kadar devam ettiğini görülmüştür. Vestibuler sistemde ise 30 dakika sonra vestibuler sinir liflerinde boyanmanın başladığı, vestibuler saçlı hücrelerde 12 saat sonra boyanmanın olduğu ve yine 6 aya kadar boyanmanın devam ettiği gösterilmiştir.(78)

Çalışmamızda deksametazon grubunda 0,5 saatte vestibülde en yüksek ilaç konsantrasyonları elde edilirken, 2 saat grubunda en yüksek konsantrasyon koklea bazal kısımda gözlenmiştir. Denek 9 örnek olarak alınırsa; 2 saatlik ilaç uygulaması sonrası koklea bazal kısımda 3,21 ppm, 2. kısımda 2,07 ppm, apekte 1,24 ppm, vestibülde ise 0,1 ppm deksametazon konsantrasyonu olduğu görülmüştür. İki zaman dilimindeki bu farklılık bize ilacın YPM'na olan temas süresinin ilaç konsantrasyonlarında etkili olduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda ise ilaç tespit edilmemiştir. Deksametazon grubundaki bu sonuçlar literatürle uyumludur. Yapılan çalışmalarda da 2-3 saatlik uygulamalarda en yüksek ilaç konsantrasyonları koklea bazal kısımda görülmüştür.(81,82) Gentamisin grubunda ise her 2 zaman diliminde de en yüksek ilaç konsantrasyonu vestibülde saptanmıştır. 0,5 saat grubunda koklea apekte yüksek gentamisin konsantrasyonu saptanırken, 2 saat grubunda koklea bazal kısımda yüksek konsantrasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumludur.

Literatürdeki farmakokinetik çalışmaların önemli bir kısmı örnekleme metodlarındaki perilenf örnekleri BOS ile kontamine olduğu için kantitatif olarak yorumlanamamıştır. Bu çalışmalarda guinea pig kokleasının bazal kısmından alınan sıvı miktarları(10µl) skala timpani hacmine(4,6µl) göre relatif olarak çok fazla miktarlardadır. Koklear aquadukt bazal dönüş lokalizasyonunda ST'ye girmektedir ve bu yakın komşuluktan dolayı alınan örnekler BOS ile şiddetli kontamine hale gelir. Marker iyonlarla yapılan ölçümlerde guinea pig bazal dönüşten alınan 10µl'lik örneklerde %15 perilenf %85 BOS olduğu gösterilmiştir. Kohlear aquaduktan daha uzaktaki lokalizasyonlardan alınan örneklerde sonuçlar daha iyi yorumlanabilmektedir(5).

Mynatt ve ark yaptıkları çalışmada 10µl'lik büyük perilenf örneklemelerinin sayısal değerlendirmelere %50'den fazla belirsizlik kattığını ve tek örnek metodunun

sadece daha az sensitiv tahlil metodlarında geçerli olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca ardışık olarak apeksten alınan ufak örneklemelerle BOS kontaminasyonu sorununun tamamen çözüleceğini söylemişlerdir(4).

Su ve ark tarafından yapılan hayvan çalışmasında lokal ve sistemik uygulamadan sonra perilenf prednizolon farmakokinetiği araştırılmış. Uygulama sonrası değişik sürelerde alınan perilenf örnekleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçülmüş. İT yolla elde edilen perilenf ilaç seviyeleri sistemik yola göre yaklaşık 50 kat yüksek bulunmuş(85).

Biz çalışmamızda İT uygulanan ilaçların, belli zaman dilimlerinde iç kulağın hangi bölümlerine ulaşabildiğini ve bu bölümlerdeki konsantrasyonlarını ölçmeye çalıştık. Bu amaçla yeni bir hayvan modeli oluşturduk. İT ilaç uygulamasını takiben belli zaman dilimlerinde disseke edilerek kokleası ortaya çıkarılan kobay temporal kemiğini dondurarak o andaki iç kulak ilaç konsantrasyonunu ölçtük. Literatürde yapılan çalışmalarda deksametazon ve gentamisin uygulaması sonrası iç kulak ilaç konsantrasyonları net olarak belirlenememiştir. İlaç konsantrasyonları bilgisayar simülasyon modeli kullanılarak tahmin edilmiştir. Çalışmamızda koklea bölümleri ve vestibüldeki ilaç konsantrasyonları ayrı ayrı UV spektrofotometre ile ölçülerek belirlenmiştir. Koklea bölümlerindeki ve vestibüldeki net ilaç konsantrasyonlarını ölçen bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Bizim yöntemimizde perilenf ve uygulanan ilaç anlık dondurulup donmuş halde iken numuneler alındığı için BOS kontaminasyonu minimal olduğu tahmin edilmektedir. Literatürde yapılan diğer farmakokinetik çalışmalarda ise perilenf bazal kısma yakın bölgelerden aspire edilerek numuneler alındığından kontaminasyon söz konusudur(5). Sıralı apikal örnekleme yönteminde BOS kontaminasyonu olmadığı belirtilmektedir. Ancak perilenf durağan bir sıvı değildir ve koklear aquaduktan bazal kısım bölgesinde devamlı BOS ile karışmaktadır. Bu nedenle apeks bölgesinden sıralı örnekleme yapılsa bile perilenf aspire edildiğinden dolayı BOS ile kontamine olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda sadece kokleadaki ilaç konsantrasyonları ölçülmüş, vestibüldeki ilaç konsantrasyonu ölçen çalışma çok azdır. Vestibüler sistemdeki ilaç varlığı immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak ilaç konsantrasyonunu ölçen bir çalışmaya biz rastlamadık.

Çalışmamızda UV spektroskopisi yöntemini kullandık. Bu teknik kimyasal ölçümlerde sıklıkla kullanılan bir teknik olup hata payı çok düşüktür. Yapılan ölçümlerde bazı deneklerde istenilen sonuçların net olarak elde edilememesi birtakım nedenlere bağlı olabilir.

1. Numunelerin standardize edilememesi (aynı ağırlık ve büyüklükte alınamamış olması)

2. Eklenen ilaçların absorpsiyon yaptığı bölgede alınan numunelerden suya geçen başka benzer maddelerin aynı bölgede absorpsiyon yapması(kreatinin vb):Teknik olarak IT olarak uyguladığımız ilaçtaki tüm maddelerin toplam absorbansını ölçüyoruz. Yani tüm maddelerin aynı oranda iç kulak içine diffüze olduğunu kabul ediyoruz. Örnek olarak bu maddelerden biri veya birkaçı farklı oranlarda dokuya geçtiği durumda ölçümlerimizde sapma olabilir. Dolayısıyla ölçülen ppm değerleri bu anlamda net ilaç miktarlarını göstermiyor olabilir.ppm değerlerinden çok karşılaştırmalı UV grafikleri daha anlamlı sonuçlar verir ve karşılaştırmalarda güvenle kullanılabilir.

3. Kimyasal ölçümler sırasında numunelerin absorbanslarının bekledikçe değiştiği gözlenmiştir. Bu sonuç, numunelerdeki bazı maddelerin zamanla bozunduğunu(hava oksijeni ile oksidasyona uğradığı) veya ortamdaki başka maddelerle etkileşerek absorbans değerlerinde hatalara yol açabileceği söylenebilir.(Deneklerin sakrifiye edilip temporal kemikleri çıkarılarak dondurulması arasında geçen süre yaklaşık 3-5 dk arasındadır.)

4.Bir başka hata kaynağı da kemik üzerine adsorbe olmuş ve suya geçmemiş ilaç miktarının ölçülememesi olarak söylenebilir.

5.Numunelerin tartımları sırasında kuşe kağıda bulaşan ve kağıt üzerinde kalan numunelerden kaynaklanan hatalar olabilir.(Ancak bu bulaşın çok az olduğu düşünülmektedir.)

6.Uygulanan ilaçların iç kulakta etkileşim sırasında reseptörlere (özellikle deksametazon) bağlanmış olabileceği ve bu reseptörlerin suda çözünmemesi veya çözünüyorsa bile absorbans değerini değiştireceği dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ

Bu çalışma ile iç kulakta ilaç dağılımını ve miktarlarını gösteren yeni bir model oluşturulmuştur. Bu yeni model ile daha önceki ortaya konmuş modellerdeki simülasyonların doğruluğu denetlenmiştir. Bugüne kadar ortaya konan modellerden elde edilen veriler sınırlıdır. Üzerinde çalıştığımız modelle daha kesin sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bütün uygun ilaçların iç kulak etkilerinin denenebilmesinin yolu açılmıştır.

Yapılan çalışma ile guine pig temporal kemiği topografik anatomisi hakkında da yararlı bilgiler edinilmiştir.

Ülkemizde uygulamaya yönelik çalışmalar çok azdır. Bu proje bu alandaki boşluğun doldurulmasına katkı sağlamıştır.

Bu çalışma daha da geliştirilerek İT ilaç tedavisi alanında yeni ilaçların denenmesinde kullanılabilir.

37.KAYNAKLAR

- 1.Salt AN, Ma Y.Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear. Res.*2001;154:88–97.
- 2.Stover T,Yagi M,Raphael Y.Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hear. Res.*1999;136:124–130.
- 3.Yang j,Wu H,Zhang P,Hou DM, Chen J.The pharmacokinetic profiles of dexamethazone and methylprednisolone concentration in perilymph and plasma following systemic and local administration. *Acta Otolaryngol* 2008;128:496-504
4. Mynatt R,Hale A,Gill M. Demonstration of a Longitudinal Concentration Gradient Along Scala Tympani by Sequential Sampling of Perilymph from the Cochlear Apex. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 7: 182–193 (2006)
- 5.Salt AN, Plontke SK. Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear. *Audiol Neurootol*. 2009;14(6):350-60,
- 6.Sennaroğlu L, Sennaroğlu G, Gursel B, et al. Intratympanic dexamethasone, intratympanic gentamicin, and endolymphatic sac surgery for intractable vertigo in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125:537–43.
- 7.Goycoolea MV. Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol*. 2001;121:437–447
- 8.Goycoolea MV, Ludman L. Round window membrane. Structure function and permeability: a review. *Microsc Res Tech*. 1997 Feb 1;36(3):201–11.
- 9.Chandrasekhar SS, Rubinstein RY, Kwartler JA, Gatz M, Connelly PE, Huang E, Baredes S: Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:521–528.

- 10.Plontke SK, Wood AW, Salt AN. Analysis of gentamicin kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol Neurotol* 2002;23(6):967–74.
- 11.Sahni RS, Paparella MM, Schachern PA, et al. Thickness of the human round window membrane in different forms of otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;113(6):630–4.
- 12.Hellstrom S, Johansson U, Anniko M. Structure of the round window membrane. *Acta Otolaryngol Suppl* 1989;457:33–42.
- 13.Nordang L, Anniko M. Hearing loss in relation to round window membrane morphology in experimental chronic otitis media. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001 Nov-Dec;63(6):333–40.
- 14.Engel F, Blatz R, Kellner J and others. Breakdown of the round window membrane permeability barrier evoked by streptolysin O: possible etiologic role in development of sensorineural hearing loss in acute otitis media. *Infect Immun.* 1995 Apr;63(4):1305–10.
- 15.Alzamil KS, Linthicum FH Jr. Extraneous round window membranes and plugs: possible effect on intratympanic therapy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109(1):302.
- 16.Silverstein H,Rowan PT, Olds MJ and others: Inner ear perfusion and the role of round widow patency. *Am J Otol* 18:586,1997
- 17.John Carey, MD. Intratympanic gentamicin for the treatment of Meniere’s Disease and other forms of peripheral vertigo. *Otolaryngol Clin N Am* 37 (2004) 1075–1090 G
- 18.Plontke SKR, Plinkert PK, Plinkert B and others. Transtympanic endoscopy for drug delivery to the iner ear using a new microendoscope. *Adv Otorhinolaryngol* 59:149,2002.
- 19.Jackson LE, Silverstein H. Chemical perfusion of the inner ear. *Otolaryngol Clin North Am.* 2002 Jun;35(3):639–53.

20. Silverstein H, Jackson LE, Rosenberg SI. Silverstein Microwick for treatment of inner ear disease. *Oper Tech Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 12:144–147.
21. Suryanarayanan R, Srinivasan VR, O'Sullivan G. Transtympanic gentamicin treatment using Silverstein MicroWick in Meniere's disease patients: long term outcome. *J Laryngol Otol* 2009; 123:45–49.
22. Weisskopf P, Hoffer ME, Kopke RD, *et al.* Microdose gentamicin delivered via the round window microcatheter: a therapeutic option in Meniere's disease. *Oper Tech Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 12:154–156.
23. Plontke SK, Lowenheim H, Mertens J, *et al.* Randomized, double blind, placebo controlled trial on the safety and efficacy of continuous intratympanic dexamethasone delivered via a round window catheter for severe to profound sudden idiopathic sensorineural hearing loss after failure of system therapy. *Laryngoscope* 2009; 119:359–369.
24. Endo T, Nakagawa T, Kita T, *et al.* Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005; 115:2016–2020.
25. Lee KY, Nakagawa T, Okano T, *et al.* Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 2007; 28:976–981.
26. Borden RC, Saunders JE, Berryhill WE, *et al.* Hyaluronic acid hydrogel sustains the delivery of dexamethasone across the round window membrane. *Audiol Neurootol* 2010; 16:1–11.
27. Tamura T, Kita T, Nakagawa T, *et al.* Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005; 115:2000–2005.
28. Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, *et al.* Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using poly lactic/glycolic microparticles. *Laryngoscope* 2010; 120:377–383.

29. Zou J, Saulnier P, Perrier T, *et al.* Distribution of lipid nanocapsules in different cochlear cell populations after round window membrane permeation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008.
30. Plontke SK, Glien A, Rahne T, Mader K, Salt AN. Controlled Release Dexamethasone Implants in the Round Window Niche for Salvage Treatment of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Otol Neurotol.* 2014 May 16.
31. Park SH, Moon IS. Round window membrane vibration may increase the effect of intratympanic dexamethasone injection. *Laryngoscope.* 2014 Jun;124(6):1444–51.
32. Fowler E: Streptomycin treatment of vertigo. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 52:239,194
33. Schuknecht HF. Ablation therapy for the relief of Meniere's disease. *Laryngoscope* 1956;66:859–70.
34. Erol Selimoğlu. Aminoglycoside-induced Ototoxicity. *Current Pharmaceutical Design* 2007; 13: 119–126
35. Kitasato I, Yokota M, Inouye S, Igarashi M. Comparative ototoxicity of ribostamycin, dactimicin, dibekacin, kanamycin, amikacin, tobramycin, gentamicin, sisomicin and netilmicin in the inner ear of guinea pigs. *Chemotherapy* 1990; 36: 155-68.
36. Park JC, Cohen GM. Vestibular ototoxicity in the chick: effects of streptomycin on equilibrium and on ampulla dark cells. *Am J Otolaryngol* 1982; 3: 117–127.
37. Kalkandelen S, Selimoğlu E, Erdoğan F, Ucuncu H, Atlas E, Comparative cochlear toxicities of streptomycin, gentamicin, amikacin and netilmicin in guinea pigs. *J Int Med Res* 2002; 30: 406–12.
38. Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential Vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res* 2001; 155: 1-8.

- 39.Choung YH, Taura A, Pak K, et all. Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin. *Neuroscience* 2009; 161(1): 214–16.
- 40.Priuska EM, Schacht J. Formation of free radical by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem. Pharmacol* 1995; 50: 1749-1752.
- 41.Akyürek F. Deneysel Hayvan Modelinde Gentamisine Bağlı Gelişen Kokleotoksik Etkiyi Önlemede Ginkgo BilobaVe Betahistin Dihidroklorür'ün Rolünün Otoakustik Emisyonla Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı 2009:7
- 42.Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*,1972; 26: 239–257
- 43.Sreedhar A.S., Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics*, 2004;101: 227–257.
- 44.Gültekin N., Karaoğlu K,Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 2008; 36:120-130
- 45.Forge A. Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res* 1985;19:171–82.
- 46.Li L, Nevill G, Forge A. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J. Comp. Neurol* 1995; 355: 405–417.
- 47.Raphael Y, Altschuler RA. Scar formation after drug-induced cochlear insult. *Hear Res* 1991;51:173–84.

- 48.Nakagawa T, Yamane H, Takayama M, et all. Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following chronic aminoglycoside treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255:127–31.
- 49.Rybak LP, Whitworth CA. Aminoglycoside ototoxicity: herapeutic opportunities. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1313–21.
- 50.Ylikoski J, Xing-Qun L, Virkkala J, Pirvola U. Blockade of c-Jun N-terminal kinase pathway attenuates gentamicin-induced cochlear and vestibular hair cell death. *Hear Res.*2002; 166(1–2): 33-43.
- 51.Cummings CW. Cummings Otolarinoloji Baş ve Boyun Cerrahisi.Koç C,Çev.Ed, 4. Baskı İstanbul:Güneş Tıp Kitapevleri,2007:2954
- 52.Nedzelski JM. Schessel DA. Bryce GE.and othhers: Chemical Labyrinthectomy:Local application of gentamicin fort he treatment of unilateral Meniere’s disease.*Am J Otol* 1992 Jan;13(1):18-22.
- 53.Kaplan DM, Nedzelski JM, Al-Abidi A and others: Hearing loss following intratympanic installation of gentamicin for the treatment of unilateral Meniere’s disease, *J Otolaryngol* 32(2):106,2002.
- 54.Toth AA,Parnes LS:Intratympanic gentamicin therapy for Meniere’s disease:preliminary comprison of two regimens,*J Otolaryngol* 24:340,1995
- 55.Magnusson M, Padoan S. Delayed onset of ototoxic effects of gentamicin in treatment of Meniere’s disease: rationale for extremely low dose therapy. *Acta Otolaryngol* 1991;111:671–6.
- 56.Martin E, Perez N. Hearing loss after intratympanic gentamicin therapy for unilateral Meniere’s disease. *Otol Neurotol* 2003;24:800–6.
- 57.Hoffner ME, Kopke RD, Weisskopf P and others: Microdose gentamicin administration via the round window microcatheter: results in patients with Meniere's disease. *Ann N Y Acad Sci.*942:46–51,2001

- 58.Hill SL,Digges EN,Silverstein H. Long-term follow-up after gentamicin application via the Silverstein MicroWick in the treatment of Ménière's disease.Ear Nose Throat J. 2006 Aug;85(8):494, 496, 498.
- 59.Daneshi A, Jahandideh H, Pousti SB, Mohammadi S. One-shot, low-dosage intratympanic gentamicin for Meniere's disease: Clinical, posturographic and vestibular findings. Iran J Neurol. 2014;13(1):33–9.
- 60.Salt AN, Gill RM, Plontke SK. Dependence of hearing changes on the dose of intratympanically applied gentamicin: a meta-analysis using mathematical simulation of clinical drug delivery protocols. Laryngoscope. 2008 Oct;118(10):1793–800.
- 61.Casani AP, Cerchiai N,Navari E,Dallan I,Piaggi P,Sellari-Franceschini S. Intratympanic gentamicin for Meniere's disease: short- and long-term follow-up of two regimens of treatment. Otolaryngol Head Neck Surg,2014 May;150(5):847-52
- 62.Blakley BW. Update on intratympanic gentamicin for Meniere's disease. Laryngoscope 2000;110:236–40.
63. Bernstein JM. The immunobiology of autoimmune disease of the inner ear. In: Bernstein JM, Ogra PL, eds. Immunology of the Ear. New York: Raven Press, 1987:419–426.
- 64.Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. 11. baskı. Ankara: Hacettepe Taş Yayınevi, 2005:1079–107.
- 65.Rarey KE, Curtis LM. Receptors for glucocorticoids in the human inner ear. Otolaryngol Head Neck Surg 1996;115:38–41.
- 66.Cummings CW. Cummings Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. Koç C,Çev. Ed, 4. Baskı İstanbul:Güneş Tıp Kitapevleri,2007:2950
- 67.Nagura M,Iwasaki S,Wu R.and others. Effect of corticosteroid, contrast medium and ATP on microcirculatory disorders of cochlea. European Journal of Pharmacology 1999;366:47-53

68. Pondugula SR., Satyanarayana R., Joel D. and others. Glucocorticoids stimulate cation absorption by semicircular canal duct epithelium via epithelial sodium channel. *Am J Physiol* 2004;286:F1127-F1135
69. Niedermeyer HP, Lupa P., Busch R., Arnold W. Cortisol levels in the human perilymph after intravenous administration of prednisolone. *Audiol Neurootol*. 2003;8(6):316-21.
70. Parnes LS, Sun A-H, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 1999;109:1-
71. Brouhton SS, Meyerhoff WE, Cohen SB. Immune-Mediated Inner Ear Disease: 10-Year Experience. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:544–548.
72. Tomoda K, Suzuka Y, Iwai H, Yamashita T, Kumazawa T. Meniere's disease and autoimmunity: clinical study and survey. *Acta Otolaryngol Suppl*(Stockh) 1993;1500:31-34.
73. Barrs DM. Intratympanic Injections of Dexamethazone for Long-Term Control of Vertigo. *Laryngoscope*, 2004;114:1910–1914
74. Shea JJ, Ge X. Dexamethasone perfusion of the labyrinth plus intravenous dexamethasone for Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 1996;29:353-8.
75. Itoh A, Sakata E. Treatment of vestibular disorders. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1991;481(suppl):617-23
76. Şanlı A, Aydın S. Guinea Pig Kulak Cerrahi Anatomi Atlası. 2010:41–42
77. Hargunani CA, Kempton JB, DeGagne JM, et al. Intratympanic injection of dexamethasone: time course of inner ear distribution and conversion to its active form. *Otol Neurotol* 2006;27:564–9.
78. Imamura S, Adams JC. Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4:176–95.
79. Huizing EH, de Groot JC. Human cochlear pathology in aminoglycoside ototoxicity - a review. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1987; 436: 117–25.

- 80.Zhai F,Zhang R,Zhang T. Preclinical and clinical studies of unrelieved aural fullness following intratympanic gentamicin injection in patients with intractable Ménière's disease. *Audiol Neurootol.* 2013;18(5):297–306
- 81.Plontke SK, Biegner T,Kammerer B. Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after application to the round window membrane. *Otol Neurotol.*2008 Apr;29(3):401–6.
- 82.Plontke SK, Mynatt R,Gill RM. Concentration gradient along the scala tympani after local application of gentamicin to the round window membrane.*Laryngoscope.* 2007 Jul;117(7):1191–8.
- 83.Hiel H, Bennani H, Erre JP, Arousseau C, Aran JM. Kinetics of gentamicin in cochlear hair cells after chronic treatment. *Acta Otolaryngol.* 1992; 112(2): 272–7
- 84.Pender DJ. Gentamicin tympanoclysis: effects on the labyrinthine sensory cells. *Laryngoscope* 2003;113:343–8.
- 85.Su J, Bachmann G, Tang A, Zumegen C, Michel O, Wittekindt C. The different levels of prednisolone in perilymph after local and systemic treatment. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2003 Oct;17(10):615–7.

