

Possible Ototoxic Effects of Topical Rifamycin Application: An Electrophysiological and Ultrastructural Study

Topikal Rifamisin Uygulamasının Olası Ototoksik Etkileri: Elektrofizyolojik ve Ultrastrüktürel Çalışma

Cihan Abaylı¹, Yusuf Kul¹, Muhsin Koten¹, Ahmet Rıfat Karasalihoğlu¹, Abdullah Taş¹, Recep Yağız¹, Erdoğan Bulut²

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Odyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Original Investigation

Orjinal Araştırma

Abstract

Objective: This study aimed to investigate possible ototoxicity associated with topical rifamycin application via electrophysiological tests and ultrastructural examinations.

Methods: Electrophysiological assessment was performed with tympanometry, auditory brainstem response (ABR), and distortion product otoacoustic emission (DPOAE) measurements. This study was conducted on 40 ears of 20 guinea pigs that were detected to have normal hearing thresholds. The animals were randomly assigned to three groups: Group 1 (n=12) received 0.1 mL rifamycin, Group 2 (n=8) received 0.1 ml gentamycin, and Group 3 (n=20) received 0.1 mL physiological saline. The antibiotics and saline solutions were administered via intratympanic injections. After five injections every other day, electrophysiological tests were performed again on the 15th day. After electrophysiological measurements, the temporal bones of all guinea pigs were prepared for ultrastructural examinations and the cochlear sur-

face morphology was examined by scanning electron microscopy (SEM).

Results: The animals in group 3 did not show a statistically significant change in their DPOAE signal/noise ratio (SNR) or ABR thresholds (p>0.05). In groups 1 and 2, the reduction in the DPOAE SNR and the increase in the ABR threshold were statistically significant (p<0.05). Regarding SEM examination results, the animals in groups 1 and 2 showed statistically significant outer hair cell damage and cochlear degeneration due to the ototoxic effect of the drugs (p<0.05), whereas the animals in group 3 showed no significant damage (p>0.05).

Conclusion: The results indicate that rifamycin application to the middle ears of guinea pigs has mild ototoxic effects on their inner ears.

Keywords: Rifamycin, ototoxicity, otoacoustic emission, auditory brainstem response, scanning electron microscopy, guinea pig



Cite this article as: Abaylı C, Kul Y, Koten M, Karasalihoğlu AR, Taş A, Yağız R, Bulut E. Possible Ototoxic Effects of Topical Rifamycin Application: An Electrophysiological and Ultrastructural Study. Turk Arch Otorhinolaryngol 2017; 10.5152/tao.2017.2391

Öz

This study was presented at the 38th Turkish National Congress of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 26-30 October 2016, Antalya, Turkey.

Bu çalışma, 38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi'nde sunulmuştur, 26-30 Ekim 2016, Antalya, Türkiye.

Address for Correspondence/Yazışma Adresi:
Yusuf Kul
E-mail: dr.yusufkul@gmail.com

Received Date/Geliş Tarihi: 16.02.2017

Accepted Date/Kabul Tarihi: 06.06.2017

Available Online Date/

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 16.08.2017

© Copyright 2017 by Official Journal of the Turkish Society of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Available online at www.turkarchotorhinolaryngol.org

© Telif Hakkı 2017 Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Derneği Makale metnine www.turkarchotorhinolaryngol.org web sayfasından ulaşılabilir.

DOI: 10.5152/tao.2017.2391

Amaç: Bu çalışmada topikal rifamisin uygulamasının olası ototoksitesitesi elektrofizyolojik testler ve ultrastrüktürel incelemeler ile araştırıldı.

Yöntemler: Elektrofizyolojik değerlendirme timpanometri, işitsel beyinsapı yanıtları (ABR) ve distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) ölçümleri ile gerçekleştirildi. Normal işitme eşiği tespit edilen 20 adet kobayın 40 kulağı çalışmaya dahil edildi ve rastgele olarak 3 gruba ayrıldı. Birinci gruba (n=12) 0.1mL rifamisin, 2. Gruba (n=8) 0.1 mL gentamisin, 3. Gruba (n=20) 0.1 mL serum fizyolojik uygulandı. Antibiyotikler ve serum fizyolojik intratympanik (İT) enjeksiyon ile uygulandı. Gün aşırı beş uygulama ardından, 15. gün elektrofizyolojik testler tekrarlandı. Elektrofizyolojik ölçümler sonrası ultrastrüktürel incelemeler için tüm kobayların temporal kemikleri hazırlandı ve koklea yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopisinde (TEM) incelendi.

Bulgular: Grup 3'te yer alan kobayların DPOAE sinyal/gürültü-oranlarında (SNR) ve ABR eşiklerinde istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (p>0.05). Grup 1 ve Grup 2'deki kobayların DPOAE SNR'lerinde düşme ve ABR eşiklerindeki yükselme istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05). TEM ile yapılan incelemede Grup 1 ve Grup 2'de ototoksik etkiye bağlı gözlenen istatistiksel olarak anlamlı dış tüylü hücre hasarı ve koklea dejenerasyonu saptandı (p<0.05), Grup 3'te anlamlı hasar gözlenmedi (p>0.05).

Sonuç: Bu çalışma, orta kulağa lokal olarak uygulanan rifamisin kobay iç kulağı üzerine hafif derecede ototoksik etkileri olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Rifamisin, ototoksitesite, otoakustik emisyon, işitsel besinsapı yanıtları, taramalı elektron mikroskopisi, kobay

Giriş

Rifamisinler *Streptomyces mediterranei*'den elde edilmişlerdir ve bunlardan da Rifamisin A, B, C, D ve E olarak adlandırılan beş antibiyotik üretilmiştir. Rifamisin B'den üç yarı-sentetik antibiyotik türetilmiştir (1). Rifamid, rifamisin sodyum ve rifampisin olarak adlandırılan bu antibiyotikler duyarlı bakterilerde DNA kontrolüyle yapılan mRNA sentezini RNA polimeraz enzimini inhibe ederek engellerler ve bakterisid etki gösterirler (2). Rifamid günümüzde kullanımı terk edilmiş bir antibiyotiktir; rifamisin sodyum da parenteral ya da topikal olarak nadiren kullanılan bir ilaçtır. Rifampisin ise günümüzde antistafilokokal ilaç olarak, özellikle tüberküloz tedavisinde ve diğer bazı endikasyonlarda yaygın olarak kullanılan önemli bir ilaçtır (3, 4). Rifamisinler, gram-pozitif koklara (pnömokoklar, streptokoklar ve özellikle *Staphylococcus aureus*), gram-negatif koklara (özellikle *Neisseria meningitidis*), gram-negatif basillere, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium leprae* gibi aside-dayanıklı bakterilere karşı etki göstermektedirler (1). Rifamisin 1963'den beri sık olarak açık ve kapalı yaraların irrigasyonunda, enfekte olmuş cerrahi ya da kutanöz yaraların tedavisinde kullanılmıştır. Literatürde rifamisin ilk lokal kullanımının tüberkülozu olan hastalarda akciğer kavitelerinin temizlenmesi olduğu bildirilmektedir (5). Rifamisinlerdeki yara iyileşmesi diğer lokal antibiyotiklere göre daha iyi olmakta, bu nedenle rifamisin enfekte cilt yaralarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (6). Rifamisin topikal olarak kolesteatomsuz kronik otitis media ve eksternal otit tedavisinde kulak burun boğaz hastalıkları hekimleri tarafından da kullanılmaktadır. Bir çok topikal ajanın potansiyel ototoksik etkileri araştırılmış olmasına rağmen literatürde topikal rifamisin uygulamasının olası ototoksik etkisi araştırılmamıştır. Kronik otit ve eksternal otit toplumda çok sık görülen hastalıklardan olup bu hastalıklarda topikal rifamisin kullanılan tedavi seçeneklerinden biridir. Çalışmamızda topikal rifamisin uygulamasının olası ototoksik etkisini kobaylarda elektrofizyolojik ve ultrastrüktürel düzeyde incelemeyi amaçladık.

Yöntemler

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2014/10 protokol, 28.03.2014 gün, 2014.04.01 numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra, çalışmamızda ağırlıkları 400-800 gram arasında değişen 4-8 aylık 30 adet auropalpebral refleksleri mevcut, pigmente Hartley suşu erişkin kobay kullanıldı. Hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili uluslararası Helsinki deklarasyonunda ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair 13.12.2011 tarih ve 28141 sayılı yönetmeliğinde bildirilen kurallar uygulandı. Kobaylarda intratimpanik (İT) enjeksiyonlar ve elektrofizyolojik ölçümler genel anestezi ile gerçekleştirildi. Genel anestezi, ketamin hidroklorür (Ketalar ampul; Pfizer, İstanbul, Türkiye) 40 mg/kg intramusküler (i.m) ve xylazine-hidroklorür (Rhompun ampul; Bayer, İstanbul, Türkiye) 5 mg/kg/i.m ile sağlandı. İlk dozun 1/3'ü kadar ketamin hidroklorür, tekrarlayan anestezi dozu gerektiğinde intraperitoneal olarak uygulandı. Elektrofizyolojik değerlendirme öncesi tüm kobaylara otomikroskopik bakı yapılarak dış kulak yolları değerlendirildi. Orta kulak işlevlerinin değerlendirilmesi için immitansmetrik inceleme yapıldı. Normal dış tüylü hücre fonksiyonunu göstermek için distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) ka-

yıtları alındı, merkezi işitme yolları ve normal işitme varlığını değerlendirebilmek için işitsel beyinsapı yanıtları (ABR) kaydedildi. Normal dış tüylü hücre fonksiyonu ve normal işitme eşliği saptanan 20 kobay çalışmaya dahil edilirken, emisyon yanıtı alınamayan ve normal işitme eşliği saptanmayan 10 kobay çalışma dışı bırakıldı. Normal dış tüylü hücre fonksiyonu ve normal işitme eşliği saptanan 20 kobayın 40 kulağı randomize olarak üç gruba ayrıldı. Grup 1 rifamisin grubu olarak belirlendi ve bu grupta rifamisin 0,1mL [rifamisin SV (Rifocin 100mg 10 mL kulak damlası; Sanofi Aventis, İstanbul, Türkiye)] kobayların sağ kulaklarına (n=12) İT olarak uygulandı. Grup 2 gentamisin grubu olarak belirlendi ve bu grupta gentamisin (Genta göz kulak damlası; İ.E.Ulagay, İstanbul, Türkiye) 0.1mL (0.3 mg gentamisin içerir) İT olarak kobayların sağ kulaklarına (n=8) uygulandı. Grup 3 serum fizyolojik grubu olarak belirlendi ve tüm kobayların sol kulaklarına (n=20) 0.1mL %0.9NaCl İT olarak uygulandı. Tüm gruplarda İT enjeksiyonlar bir gün ara ile beş kez uygulandı ve enjeksiyonlar her gün aynı saatlerde tekrarlandı. Bütün enjeksiyonlar ve ölçümler süresince anestezi altındaki kobaylar ısıtılmış pedlerle örtülerek vücut sıcaklıkları korunmaya çalışıldı. İşlemler, nem oranı %50 ve sıcaklığı 16-21°C arasında değişen bir ortamda yapılarak kobayların sıvı kaybı azaltılmaya çalışıldı. Son ilaç uygulamasından 5 gün sonra DPOAE ve ABR test ölçümleri tekrarlandı. Ölçümlerden sonra yüksek doz ketamin hidroklorür ve xylazine hidroklorür enjeksiyonu sonrası kobaylara dekapitasyon yapıldı. Bütün gruplardaki kobayların temporal kemikleri ultrastrüktürel incelemeler için diseke edildi.

Elektrofizyolojik değerlendirmeler

İmmitansmetrik inceleme

İmmitansmetrik inceleme timpanometri modunda Capella-MA-DSEN (GN Otometrics A/S, Taastrup, Danimarka) otoakustik emisyon cihazında yapıldı. Kobayların dış kulak yollarına göre plastik tüp adaptörlerinin 1 cm'lik ucuna yenidoğan için kullanılan 1-2 numaralı timpanometri plastik prob uçlarına OAE prob ucu (Capella-Madsen) yerleştirildi. Proben tonu 75 dB SPL'de 1 kHz olarak ayarlandı. Pompanın hızı 100 daPa/sn olarak belirlendi. Ölçümler esnasında pompa yönü pozitiften negatife olmak koşulu ile basınç aralığı +200 ve -300 daPa aralığına ayarlandı. Proben pozisyonu uygun olduğunda ölçüm işlemine başlandı. Ölçümlerde +100 ile -100 daPa arasında kompiyans zirve eğrisi elde edilenler "A" tipi (normal tip) timpanogram olarak değerlendirildi.

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon ölçümü

Otoakustik emisyonlar (2f1-f2 kübik distorsiyon ürünü bileşenleri) Capella-MADSEN (GN Otometrics A/S, Taastrup, Danimarka) cihazı ile DPOAE modunda ölçüldü. Kobayların dış kulak yollarına göre plastik tüp adaptörlerinin 1 cm'lik ucuna yenidoğan için kullanılan 1-2 numaralı timpanometri plastik prob uçlarına OAE prob ucu (Capella-Madsen) yerleştirildi. f2 ve f1 frekansları arasındaki oran (f2/f1) 1.22 olacak şekilde ayarlanarak, uyaran şiddeti f1 frekansı için L1 (L1=65dB SPL), f2 frekansı için L2 (L2=55dB SPL) olarak alındı ve distorsiyon ürünü emisyonlar 2f1-f2 modunda ölçüldü. Otoakustik emisyonlar f1 ve f2'nin 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 ve 8 kHz frekanslarında, geometrik ortalamalarında kaydedildi. Alınan her bir kayıt sü-

resi yaklaşık 60 saniye idi. Kayıtlar gürültü şiddetinin 50 dB'in altında olduğu bir ortamda alındı. DPOAE sonuçları değerlendirilirken; her bir frekansta yani 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 ve 8 kHz frekans bantlarında oluşan SNR esas alınarak, 6 dB ve üzeri sonuçlar anlamlı kabul edildi (7). DPOAE cevapları değerlendirilirken, SNR DPOAE amplitüdüne kıyasla daha güvenilir bulunmuştur (8, 9). Çalışmamızda frekansa spesifik olarak SNR cevaplarının, yüzde değişimleri (ilk ve son ölçümler arasındaki fark değişimleri alınarak) her bir kobay için değerlendirilerek, SNR frekans bandlarında yüzde değişim grafikleri oluşturuldu.

İşitsel beyinsapı yanıtları

Ölçüm için Medelec Synergy ABR (Oxford Instruments, Oxford, İngiltere) marka beyinsapı analizatör kullanıldı. E-A-R Tone 3A insert kulaklıkların ses tüpüne, kobayların dış kulak kanalına göre 1 cm boyutunda plastik tüp adaptörler bağlandı. Test edilen kulak mastoidine negatif gümüş iğne elektrodu, alına pozitif iğne elektrodu, toprak olanı da kontralateral ayak tarafına yerleştirildi. Cihaz üzerindeki elektrot testi elektrotların uygun bağlanıp bağlanmadıklarını kontrol etmek amacı ile kullanıldı. Elektrod impedanslarının 5 kOhm'un altında olmasına dikkat edildi. Uyarılar klik uyararı şeklinde verildi. Saniyede 11 klik uyararı verilerek, 300 cevabın ortalaması belirlendi. Uyararı vermeye 80 dB Normalized Hearing Level (nHL)'den başlanarak 10'ar dB azaltıldı ve en az üç dalga formunun gözlemlendiği işitme seviyesi eşik olarak belirlendi. ABR dalga konfigürasyonu 20 dB HL'de saptandığında işitme normal olarak değerlendirildi.

Ultrastrüktürel değerlendirmeler

Temporal kemikler diseke edilmeden önce orta kulak boşluğuna veya timpanik kaviteye %2.5 glutaraldehit enjekte edildi. Temporal kemik diseksiyonu sonrası ise timpanik bullaları açılarak koklear yapıya ulaşıldı ve 12 saat bekletilmek üzere pH'sı 7.3 olan ve %2.5 glutaraldehitli fosfat tamponuna alındı. Bu pre-fiksasyon işlemleri sonrası, fosfat tamponunda (PBS) 24 saat bekletilerek kemik doku yıkandı. Sonrasında dokular 2 hafta süreyle 7.3pH'da 0,1M Na-EDTA (Sigma, Darmstadt, Almanya) ile hazırlanan solüsyonda oda sıcaklığında dekalsifiye edildiler. Temporal kemikler bu şekilde dekalsifiye edildikten sonra, kokleayı çeviren otik kapsül stereo mikroskop (Olympus 1x71 S8-F3, Tokyo, Japonya) kullanılarak bazalden apekse doğru asimetrik olarak diseke edildi. Diseke edilen koklealar +4°C'de PBS'de üç gün süre ile bekletilerek rutin taramalı elektron mikroskop (TEM) takibine alındılar. TEM değerlendirmesinde korti organı yüzeyi öncelikli olarak anatomik açıdan incelendi. Yüzeysel anatomide genel hücre morfolojisi ve dış tüylü hücrelerdeki stereosilya morfolojisi değerlendirildi (Tablo 1) (10). Değerlendirilen parametrelerde özellikle koklear frekans bandlarında dış tüylü hücre stereosilyalarının morfolojik dizilimi bazalden apekse doğru incelendi.

İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Gruplarda ABR, DPOAE yanıtlarının ilk ve son ölçümlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanıldı. ABR, DPOAE değerlerinin ilk ve son ölçümleri arasındaki fark değerleri hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırmada Kruskal Wallis testi

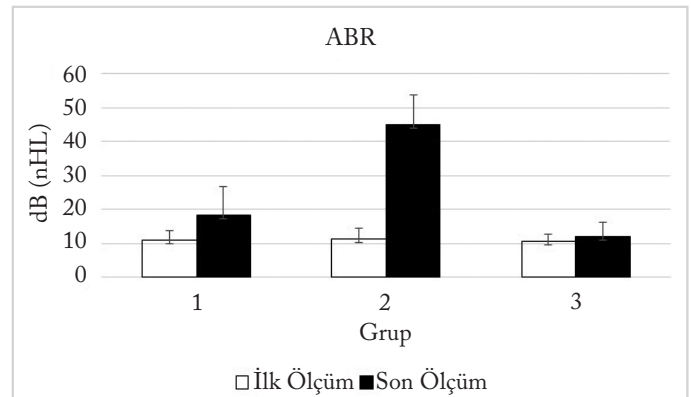
kullanıldı, fark saptandığında bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede Bonferroni post-hoc testi kullanıldı. İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences 20.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Analizlerde p<0.05 değeri istatistiksel anlamlılık sınırı değeri olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmamızda üç grupta toplam 20 kobayın 40 kulağının elektrofizyolojik test sonuçları değerlendirildi. Herhangi bir nedenle çalışmaya başlanılan 20 kobaydan çalışma dışı bırakılan olmadı. Elektrofizyolojik ölçümlerde klik uyararı varlığında ABR eşik değerleri ve DPOAE SNR'leri karşılaştırıldı. İlk ve son ölçüm sonrası intratimpanik uygulamalarda ABR eşik yanıtları öncelikle her grup için gruplar içinde ve gruplar arasında karşılaştırıldı (Şekil 1). Rifamisin grubunda (Grup 1) İT uygulama öncesi ilk ölçüm ABR eşik değerleri ortalama 10.8±2.8 dB elde

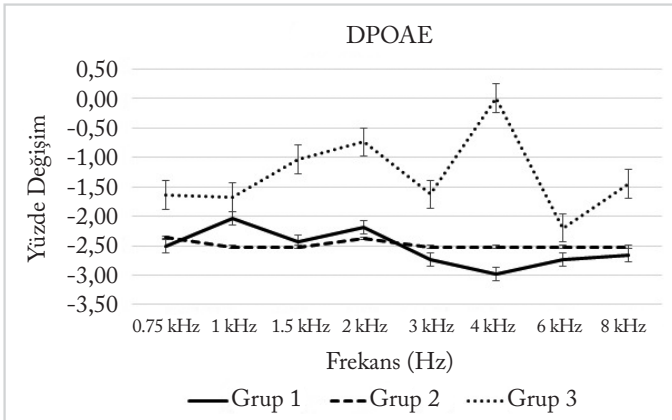
Tablo 1. Koklea yüzey morfolojisi değerlendirme parametreleri

Parametreler	Bulgular	Dejenerasyon dereceleri	Puan
Genel hücre morfolojisi (yüzey, yan bağlantılar)	Normal hücre görünümü	Normal	0
	Kollaps, yan bağlarda düzenli ayrılma	Hafif derecede dejenerasyon	1
	Kollaps, yan bağlarda düzensiz ayrılma	Orta derecede dejenerasyon	2
	Nekroz	İleri derecede dejenerasyon	3
Dış tüylü hücreler (DTH)	Normal stereosilya görünümü	Normal	0
	Stereosilyalarda düzensizlik	Hafif derecede dejenerasyon	1
	Stereosilyalarda yapışıklık, kısmi kayıp	Orta derecede dejenerasyon	2
	Total stereosilya kaybı	İleri derecede dejenerasyon	3
Dejenerasyon yeri	Dejenerasyon yok	Normal	0
	Kokleanın 1/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	Hafif derecede dejenerasyon	1
	Kokleanın 2/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	Orta derecede dejenerasyon	2
	Kokleanın 3/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	İleri derecede dejenerasyon	3



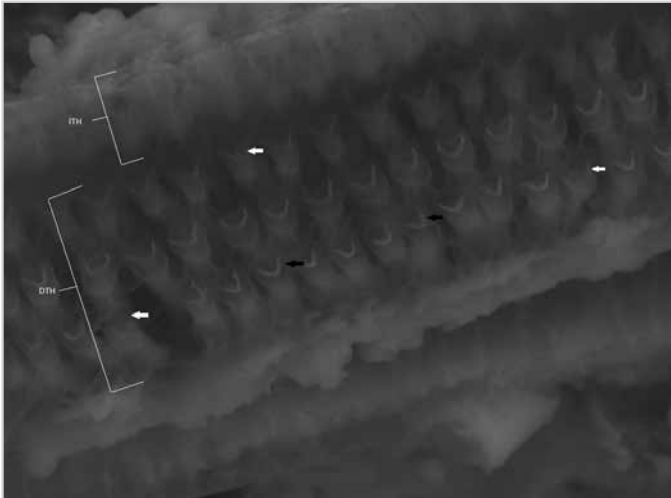
Şekil 1. Grup içi ve gruplar arası ilaç uygulaması öncesi ve sonrası işitsel beyinsapı yanıtları eşik değerleri (dB nHL)

Grup 1: rifamisin grubu (n=12), Grup 2: gentamisin grubu (n=8), Grup 3: serum fizyolojik grubu (n=20)

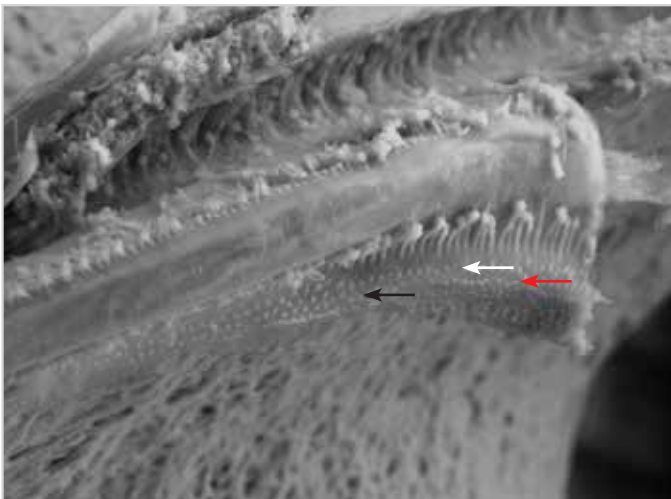


Şekil 2. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası frekanslara göre SNR'lerin yüzde değişimlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Grup 1: rifamisin grubu (n=12), Grup 2: gentamisin grubu (n=8), Grup 3: serum fizyolojik grubu (n=20)



Resim 1. Rifamisin grubu örnek bir kobaya ait Corti organı yüzeyindeki dış tüylü hücre stereosilyalarında düzensizlikler gözlenmektedir X3000
DTH: dış tüylü hücre; İTH: iç tüylü hücre; siyah ok: normal dış tüylü hücre; beyaz ok: kısmi hasar görmüş dış tüylü hücre



Resim 2. Gentamisin grubu örnek bir kobaya ait Corti organı yüzeyindeki dış tüylü hücre stereosilyalarının yer yer tamamen kaybolduğu gözlenmektedir X1000

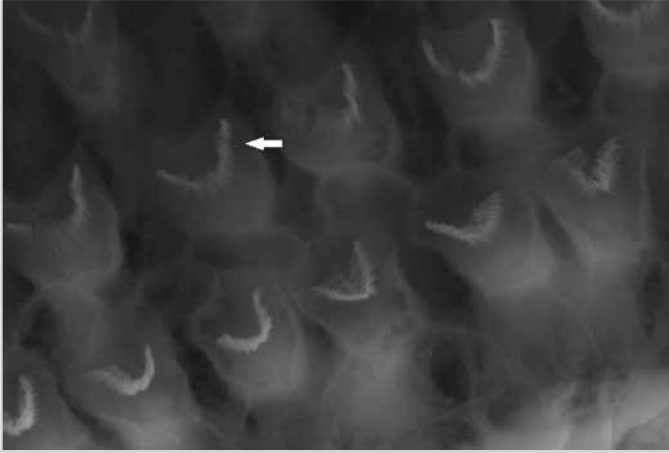
Siyah ok: normal dış tüylü hücre; beyaz ok: total kayıp; kırmızı ok: kısmi hasar görmüş dış tüylü hücre

edilirken, son uygulama sonrası ABR eşik değerleri ortalama 18.8 ± 8.3 dB olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.007$, $p<0.05$). Gentamisin grubunda (Grup 2) ise İT uygulama öncesi ABR eşik değerleri ortalama 11.2 ± 3.5 saptandı iken, son uygulama sonrası 45 ± 9.2 dB olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.01$, $p<0.05$). Serum fizyolojik grubumuzda (Grup 3) İT uygulama öncesi ortalama ABR eşik değerleri 10.5 ± 2.2 dB, ilaç uygulaması sonrası ortalama ABR eşik değerleri 12 ± 4.1 dB olarak saptandı ve bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.083$, $p>0.05$). ABR eşik değerler açısından gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında her üç grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.0001$, $p<0.05$). Grup 1 ve 2 de intratimpanik uygulama öncesi ve sonrası DPOAE SNR'leri grup içinde karşılaştırıldığında tüm frekanslarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı ($p=0.012$, $p<0.05$), Grup 3'te ise uygulama öncesi ve sonrası SNR'lerinde anlamlı bir düşüş saptanmadı ($p=0.67$, $p>0.05$). Her üç grupta intratimpanik uygulama öncesi ve sonrası SNR'lerindeki yüzde değişimler gösterilmiştir (Şekil 2). Genel hücre morfolojisi, korti organı yüzey anatomisi ve dış tüylü hücre stereosilya yapısı TEM ile değerlendirildi. Grup 1 de korti organı yüzeyi incelenmesinde; altı kokleada dış tüylü hücrelerin stereosilyalarında düzensizlik ve parsiyel kayıplar mevcuttu (Resim 1). İki kobay kokleasında ise kokleanın 1/3'ünde dış tüylü hücrelerin stereosilyalarında düzensizlik mevcuttu. Dört kobay kokleasında ise düzensizlik tespit edilmedi. Böylece dört koklea 3 puan, dört koklea 2 puan ile (ortalama 1.66) değerlendirildi. Bu sonuçları serum fizyolojik grubu ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlılık mevcuttu ($p=0.01$, $p<0.05$). Rifamisin grubu gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında da hafif derece dejenerasyonlara rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$, $p<0.05$). Grup 2'de korti organı yüzeyi incelemesinde; dört kokleada kokleanın 2/3'ünde dış tüylü hücrelerinin stereosilyalarında düzensizlik, yan yüzey bağlantılarında düzenli ayrılma tespit edildi. Dört kokleada ise stereosilyalarda parsiyel veya tam kayıplar mevcut idi (Resim 2). Böylece dört koklea 5, iki koklea 6, iki koklea ise 8 puan olarak (ortalama 6) değerlendirildi. Serum fizyolojik grubu ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p=0.0001$, $p<0.05$). Grup 3'te korti organı yüzey anatomisi incelemesinde; yirmi kokleada tüm koklea boyunca hücreler normal olarak değerlendirildi. Dört koklea dış tüylü hücre stereosilyalarında düzensizlik mevcuttu. Histolojik skorlama sonucu; 16 koklea 0 puan, dört koklea 1 puan (ortalama 0.2) olarak skorlandı. Grup 3'te dış tüylü hücre stereosilya morfolojisi ve dizilimini değerlendirdiğimizde dejenerasyon tespit edilmedi (Resim 3).

Tartışma

Ototoksisite, işitme ve dengeyi bozan önemli nedenlerden biri olmaya devam etmektedir. Ototoksik maddelere bağlı olarak meydana gelen başlıca yakınmalar: işitme kaybı, tinnitus, denge-sizlik ve vertigodur (11). Çalışmamızda ototoksisitenin değerlendirilmesi açısından işitme kaybını deneysel olarak araştırdık.

Topikal kulak damlalarının sistemik tedavilere kıyasla birçok avantajı vardır (12). Topikal kullanım diare, bulantı, kusma, dö-



Resim 3. Serum fizyolojik grubuna ait bir kobayın Corti organı yüzeyinin normal dış tüylü hücre stereosilya görüntüsü X10000
Beyaz ok: normal dış tüylü hücre

küntü gibi yan etkiler ortaya çıkarmamasının yanında ilgili bölgeye yüksek konsantrasyonlarda uygulanabilir. Bununla beraber yuvarlak pencereden iç kulağa yüksek konsantrasyonlarda geçiş topikal uygulamaların ototoksisite potansiyelini ortaya çıkarmaktadır. Perforasyon varlığında topikal kulak damlalarının olası ototoksik etkilerini araştırmak için çok çeşitli hayvan modeli çalışmaları kullanılmıştır (13). Kemirgen modellerinde birçok topikal antibiyotiklerin etkileri araştırılmış, özellikle gentamisin sürekli ve anlamlı olarak ototoksik bulunmuştur (12-14). Bu yüzden çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak gentamisin kullandık.

Ototoksisite monitörizasyonu için elektrofizyolojik cevaplarda en önemli tartışma konusu belirgin değişiklik kriterinin seçimi noktasındadır. Brown ve ark. (15) kobaylar üzerinde uzun süreli gentamisin uygulaması sonrası DPOAE SNR yanıtlarında değişiklikler saptadılar. Daha da önemlisi DPOAE yanıtlarındaki değişimleri korti organı dış tüylü hücre yüzey morfolojisindeki değişiklikler görülmeden önce saptadılar. Bu nedenle otoakustik emisyon ölçümünün ototoksisite monitörizasyonunda oldukça değerli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda ototoksik etkiyi değerlendirmek için DPOAE SNR'leri esas alınmıştır. Rifamisin, gentamisin ve serum fizyolojik uygulanıp sonrasında yapılan DPOAE ölçümlerinde SNR'de en fazla düşüş gentamisin kullanılan grupta saptandı. Rifamisin uygulanan grupta ise SNR'de düşüş, gentamisin uygulanan gruba kıyasla daha az olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.007$, $p<0.05$).

De Lauretis ve ark. (16) yaptıkları bir çalışmada sisplatin ototoksisitesinin erken tespiti için ABR'nin tespit değerinin anlamlı ölçüde başarılı olduğunu klinik odyolojik verilerle göstermişlerdir. Campbell ve Durrant (17) literatürde ototoksisite üzerine yapılan ilk çalışmalarda, bir veya daha fazla frekansta 15 dB'yi aşan ya da tek frekansta 20 dB'yi aşan eşik farklarının belirgin değişiklik göstergesi kabul edildiğini, ancak daha sonraki çalışmalarda bu kriterlerin ototoksik ilaç almayan kişilerde bile aşılabildiğini ileri sürmüşlerdir. Meyerhoff ve ark. (18) tobramisin sülfat veya vankomisin kullanılan 44 olguluk çalışmalarında, ototoksisite için bir frekansta en az 15 dB'lik eşik değişikliğini

esas aldıklarında, ototoksisite açısından tek frekansta 15 dB'lik değişiklik kriterinin güvenilir olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca test edilen frekanslarda ortalama 5 dB'lik eşik değişikliklerini hem artış hem de azalma yönünde tespit etmişlerdir. Biz çalışmamızda bir değişiklik değeri baz almadık, ilaç uygulama öncesi ve sonrası değerleri anlamlılık açısından karşılaştırdık. Çalışmamızda intratimpanik uygulama öncesi ve sonrası yaptığımız ABR ölçümlerinde işitme eşik değeri yükselmesi en fazla gentamisin kullandığımız grupta ortaya çıktı. Rifamisin kullandığımız grupta da benzer biçimde ABR eşik değeri yükselmesi gözlemledik.

Daha önce yapılan çalışmalarda ototoksisitenin histopatolojik olarak ortaya konmasında ışık mikroskopisi, floresan mikroskopisi veya elektron mikroskopisi gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Oshima ve ark. (19) kobaylarda daptomisin ototoksisitesini inceledikleri çalışmalarında Corti organı yüzeyindeki morfolojik değişiklikleri floresan mikroskopisi ile değerlendirmişlerdir. Olgun ve ark. (20) kırmızı Ginseng'in sisplatin ototoksisitesi üzerine koruyucu etkilerini saptadıkları çalışmalarında spiral ganglion ve korti organı yüzey morfolojisini elektron mikroskopisi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda ototoksisiteye bağlı dış tüylü hücre hasarını gösterebilmek amacı ile TEM kullandık. Bu amaçla koklea yüzeyini bazaldan apekse doğru hücre morfolojisi açısından değerlendirip skorladık. Kokleadaki tüylü hücre hasarını ve koklea dejenerasyonu en fazla gentamisin uygulanan grupta gözlemledik. Bu hasar ve dejenerasyon gentamisin grubuna oranla az olmakla beraber rifamisin grubunda da saptadık.

Aminoglikozidlere bağlı oluşan ototoksisitenin iç kulakta oluşturduğu hasarın yeri ve buna bağlı oluşan klinik ve patolojik değişiklikler hakkında yeterli bilgimiz olsa da henüz ototoksisitenin moleküler mekanizması üzerine ortak kabul gören bir görüş bulunmamaktadır. Aminoglikozidlere bağlı ototoksisitenin nedenlerinden birinin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir. Aminoglikozidlerin hücre içinde serbest oksijen radikallerini oluşturması demir iyonu ve elektron vericisi olarak poliansatüre yağ molekülü gerektirir. Gentamisin ve demir birlikte bir membran lipidi olan fosfatidilinozitle bağlanarak serbest oksijen radikali oluşumuna yol açarlar (21). Literatürde rifamisin ototoksisitesini araştıran başka özgün bir yayına rastlayamadık. Çalışmamızda dış tüylü hücre hasarını TEM ile göstermiş olsak da ototoksisite nedenlerini yeni çalışmalarla moleküler düzeyde açıklamaya gereksinim vardır.

Sonuç

Literatürde topikal rifamisin ototoksisitesini araştıran, bilgileri-mize göre benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, elektrofizyolojik ve ultrastrüktürel değerlendirmeler ışığında kobaylarda rifamisin orta kulağa direkt uygulanmasının, iç kulakta koklear yapılarda hafif derecede dejenerasyon ve işitme eşik yanıtlarında artışlara neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak rifamisin ototoksik etkisinin benzer deneysel ve klinik çalışmalarla değerlendirilmesi gerekir. Bunun yanında kronik otitis media ve timpanik membran perforasyonuya da ventilasyon tüpü olan hastaların eksternal otitlerinin tedavisinde rifamisin tercih edilmemesi daha uygun olacaktır.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Trakya University Animal Experiments Local Ethics Committee (TÜHDYEK-2014.04.01).

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.A., Y.K., M.K.; Design - C.A., M.K., A.R.K.; Supervision - A.R.K., A.T., R.Y., M.K.; Resource - E.B., A.T., R.Y.; Materials - E.B., C.A., A.R.K.; Data Collection and/or Processing - C.A., Y.K., E.B.; Analysis and/or Interpretation - C.A., Y.K., M.K., R.Y.; Literature Search - C.A., Y.K., E.B.; Writing - C.A., Y.K., E.B.; Critical Reviews - A.R.K., A.T., R.Y., M.K.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by Trakya University.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (TÜHDYEK-2014.04.01).

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.A., Y.K., M.K.; Tasarım - C.A., M.K., A.R.K.; Denetleme - A.R.K., A.T., R.Y., M.K.; Kaynaklar - E.B., A.T., R.Y.; Gereçler - E.B., C.A., A.R.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.A., Y.K., E.B.; Analiz ve/veya Yorum - C.A., Y.K., M.K., R.Y.; Literatür Taraması - C.A., Y.K., E.B.; Yazıyı Yazan - C.A., Y.K., E.B.; Eleştirel İnceleme - A.R.K., A.T., R.Y., M.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma finansal olarak Trakya Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 1.Baskı, Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık 2009. p.225.
2. Sensi P. History of the development of rifampin. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 402-6. [CrossRef]
3. Boeree MJ, Heinrich N, Aarnoutse R, Diacon AH, Dawson R, Rehal S, et al. High-dose rifampicin, moxifloxacin, and SQ109 for treating tuberculosis: a multi-arm, multi-stage randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 39-49. [CrossRef]
4. Alfouzan W, Al-Sahali S, Sultan H, Dhar R. Classical presentation of acute pyelonephritis in a case of brucellosis. *Case Rep Nephrol Dial* 2016; 6: 83-8. [CrossRef]
5. Sisti F, Vaccaro L. Local application of rifamycin SV in caverns treated by endocavitary aspiration. *Arc Tisiol Mal Appar Respir* 1963; 18: 251-6.
6. Köşüş A, Köşüş N, Güler A, Çapar M. Rifamycin SV application to subcutaneous tissue for prevention of post-cesarean surgical site infection. *Eur J Gen Med* 2010; 7: 269-76.
7. Le Calvez S, Avan P, Gilain L, Romand R. CD1 hearing-impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hear Res* 1998; 120: 37-50. [CrossRef]
8. Hall JW, Baer JE, Chase PA, Schwaber MK. Clinical application of otoacoustic emissions: what do we know about factors influencing measurement and analysis? *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110: 22-38. [CrossRef]
9. Lonsbury-Martin BL, McCoy MJ, Whitehead ML, Martin GK. Clinical testing of distortion product otoacoustic emissions. *Ear Hear* 1993; 14: 11-22. [CrossRef]
10. Poyrazoğlu E, Güngör A, Uğur G, Okar İ, Candan H. Ototoxik siprofloksasinin koklear etkilerinin taramalı electron mikroskopisi ile gösterilmesi. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1997; 5: 116-21.
11. Walther LE, Hülse R, Lauer K, Wenzel A. Current aspects of ototoxicity. Ototoxic substances and their effects. *HNO* 2015; 63: 315-24. [CrossRef]
12. Gültekin E, Yener M, Ozdemir I. The effect of topical Castellani solution on outer hair cell function of rats. *Laryngoscope* 2010; 120: 808-12. [CrossRef]
13. Roland PS, Rybak L, Hannley M, Matz G, Stewart MG, Manolidis S, et al. Animal ototoxicity of topical antibiotics and the relevance to clinical treatment of human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 57-78. [CrossRef]
14. Öztürkcan S, Dündar R, Katılmış H, İlknur AE, Aktas S, Hacıomeroglu S. The ototoxic effect of boric acid solutions applied into the middle ear of guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266: 663-7. [CrossRef]
15. Brown AM. Acoustic distortion from rodent ears: a comparison of responses from rats, guinea pigs and gerbils. *Hear Res* 1987; 31: 25-37. [CrossRef]
16. De Lauretis A, De Capua B, Barbieri MT, Bellusi L, Passali D. ABR evaluation of ototoxicity in cancer patients receiving cisplatin or carboplatin. *Scand Audiol* 1999; 28: 139-43. [CrossRef]
17. Campbell KC, Durrant J. Audiologic monitoring for ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26: 903-14.
18. Meyerhoff WL, Yellin W, Maale GE, Roland PS. Audiologic threshold monitoring of patients receiving ototoxic drugs. Preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989; 33: 950-4. [CrossRef]
19. Oshima H, Nomura K, Yamazaki M, Suzuki J, Kawase T, Kobayashi T, et al. Ototoxic effect of daptomycin applied to the guinea pig middle ear. *Acta Otolaryngol* 2014; 134: 679-83. [CrossRef]
20. Olgun Y, Kırkım G, Altun Z, Aktaş S, Kolatan E, Kiray M, et al. Protective effect of Korean red ginseng on cisplatin ototoxicity: Is it effective enough? *J Int Adv Otol* 2016; 12: 177-83. [CrossRef]
21. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1749-52. [CrossRef]