

## Gentamisin ile Oluşturulan Kohlear Hasar üzerine N-Asetilsisteinin Nörofilament ve Sinir Büyüme Faktörü Salınımına Etkisi

### The Effect of N-Acetylcysteine on the Neurofilament and Nerve Growth Factor Expression after Gentamicin Induced Cochlear Damage

Hayrunnisa Yeşil Sarsmaz<sup>1</sup>, Seren Gülşen Gürgeç<sup>2</sup>, Mehmet Akif Somdaş<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar, Manisa, Türkiye

<sup>3</sup>Acıbadem Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Bölümü Kayseri, Türkiye

#### ÖZET

**Amaç:** N-asetilsistein'in (NAC) gentamisin neden olduğu kohlear hasarı önlemedeki etkinliğinin, nöronal faktörlerin ekspresyonu aracılığıyla araştırılması.

**Yöntemler:** Çalışmamızda 36 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Serum fizyolojik, Gentamisin + Serum fizyolojik ve Gentamisin + NAC verilmek üzere 3 gruba ayrıldı. 15 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kohleaları çıkartıldı. Yapılan histopatolojik incelemelerden nörofilament ve sinir büyüme faktörü primer antikorlarının immünoaktivitesi değerlendirildi.

**Bulgular:** Nörofilament immünoaktivitesi, serum fizyolojik grubu ve Gentamisin + NAC gruplarında afferent ve efferent sinir demetlerinde oldukça şiddetli iken, Gentamisin + serum fizyolojik grubunda zayıf olduğu gözlemlendi. Nöronal growth faktör immünoaktivitesi ise, serum fizyolojik grubu ve Gentamisin + NAC gruplarında afferent ve efferent sinir demetlerinde orta şiddette iken, Gentamisin + serum fizyolojik grubunda, vestibular ganglionlarda negatif, afferent ve efferent sinir lifi demetlerinde ise oldukça zayıf şiddette olduğu görüldü.

**Sonuç:** Gentamisinin sebep olduğu ototoksitenin NAC kombinasyonu uygulandığında önemli derecede azaldığı immünohistokimyasal olarak gösterildi.

**Anahtar Sözcükler:** Gentamisin, Ototoksiten, N-asetilsistein, Kohlea, Sinir büyüme faktörü, Nörofilament protein

**Geliş Tarihi:** 27.08.2020

**Kabul Tarihi:** 18.06.2021

#### ABSTRACT

**Objective:** To investigate of the effectiveness of N-acetylcysteine (NAC) in preventing cochlear damage due to gentamicin by the means of expression of neuronal factors

**Methods:** In our study, 36 female Sprague Dawley rats were used. They were divided into 3 groups such as (saline), Gentamicin + Serum physiological (saline) and Gentamicin + NAC. After 15 days, the rats were sacrificed. Cochleae were removed and examined histopathologically. The immunoreactivity of neurofilament and neuronal growth factor primary antibodies was examined in the tissues taken.

**Results:** Neurofilament immunoreactivity was quite significant in afferent and efferent nerve bundles in the saline group and Gentamicin + NAC group, whereas it was weak in the Gentamicin + serum physiological group. Also neuronal growth factor immunoreactivity was moderate in afferent and efferent nerve bundles in the saline group and Gentamicin + NAC group, it was negative at vestibular ganglia, and weak in afferent and efferent nerve fiber bundles in the Gentamicin + serum physiological group.

**Conclusion:** It was shown immunohistochemically that ototoxicity caused by gentamicin was significantly reduced when the NAC combination was applied.

**Keywords:** Gentamicin, Drug Induced Ototoxicity, N-acetylcysteine, Cochlea, Nerve growth factor, Neurofilament protein

**Received:** 08.27.2020

**Accepted:** 06.18.2021

**ORCID ID:** H.Y.S. 0000-0002-9790-1723, S.G.G. 0000-0002-5514-1404, M.A.S. 0000-0003-2978-0971

**Yazışma Adresi/ Address for Correspondence:** Hayrunnisa Yeşil Sarsmaz, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü, Uncubozköy, Yunusemre, Manisa, Türkiye E-posta: nialisayy@hotmail.com

©Telif Hakkı 2022 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2022 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2022.54>

## GİRİŞ

Gentamisin, ciddi yan etkileri olabilen aminoglikozid türevi bir antimikrobiyaldir (1). Bakteriyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan gentamisinin iç kulakta ototoksisteye neden olduğu ve kalıcı işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir (2). Ancak Gram (-) negatif aerobik bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü etkisinden dolayı Türkiye'nin de içerisinde olduğu gelişmiş birçok ülkede de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ototoksiste, bir ilaç veya kimyasal maddenin iç kulağa yapısal veya işlevsel olarak zarar vermesi, bunun sonucunda işitme kaybı ve denge sorunu gelişmesi ile karakterize bir durumdur (3). Aminoglikozid antibiyotikler, ilaca bağlı işitme ve vestibüler kayıp probleminin tespit edildiği ilk ajanlardır (4).

Gentamisin neden olduğu ototoksiste literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir. Keene ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, kobaylara enjekte edilen gentamisin, yüksek frekanslarda bilateral işitme kaybına, kohleanın bazal kıvrım dış tüylü hücrelerinin azalmasına ve spiral ganglion hücrelerinde bir miktar kayba neden olduğunu rapor etmişlerdir (5). Smith ve ark. gentamisin verilen 47 hastanın beşinde (%10) ve tobramisin verilen yine 47 hastanın beşinde (%11) işitme kaybı geliştiğini göstermişlerdir (2). Ancak aminoglikozidlerin toksik etkilerinin moleküler mekanizması halen daha net olarak ortaya konulamamıştır. Muhtemel teori; aminoglikozidleri tüylü hücrelere tutunması ve inositol-fosfat kaskadını inhibe etmesi bunun sonucunda da intrasellüler kalsiyum mobilizasyonunda azalma olması şeklinde tanımlanmaktadır (6).

Gentamisin, eczane raflarında mevcut olan ve reçete ile satılan bir antibiyotik olup karakteristik olarak bilateral işitme kaybına neden olabilen, ototoksik etkili bir ilaçtır. İşitme kaybının başlamasından sonra iyileşmesinin mümkün olmadığı bilinmektedir. İşitme kaybının geri dönüşümsüz olmasının nedeni ise kohleada bulunan tüy ya da kıl hücrelerinin rejenerasyonu yeteneğinin bulunmaması olduğu düşünülmektedir (7). Önce yüksek perde seslerin işitilmesinin azalmasına sonrasında da düşük perde seslerin azalmasına neden olmaktadır (8). Ancak, yüksek frekanstaki işitme kaybının başlangıcının belirlenmesi zordur. Yüksek frekanstaki ses kayıplarının araştırılması için yüksek frekans odyometri adı verilen bir test kullanılmaktadır. Ancak yüksek frekans odyometri rutinde kullanılan bir test olmamakla birlikte ileri düzey araştırmalar için kullanılmaktadır. Bu yüzden mevcut kaybın yüzdesinin farkedilenden daha fazla olması muhtemeldir. Aminoglikozid grubu ilaçlar yan etki olarak hem kohlea hem de vestibüler sistem olmak üzere iç kulağı etkilemektedirler. Ancak farklı aminoglikozidlerin kohlear ve vestibüler sistem üzerine etkileri de farklı oranlarda olmaktadır. Streptomisin ve gentamisin primer olarak vestibülotoksik etki gösterirken, amikasin, neomisin ve kanamisin primer olarak kohleotoksik etkilidirler (4). Ancak literatürde bu konu üzerinde farklı bilgiler bulunmaktadır (9-11). Kohlear hasarlanma kalıcı işitme kaybı ile sonuçlanırken vestibüler hasar ise baş dönmesi, ataksi ve nistagmusa neden olmaktadır (7). Gentamisin kısmen bazal kısımdaki dış tüy hücrelerine harap eder ve eğer ilacın dozu arttırılacak olursa iç tüy hücrelerinde de histopatolojik etkiler gözlenir (12, 13). Zira yapılmış olan çalışmalar dış tüy hücrelerinin ototoksik hasarlanmaya karşı iç tüy hücrelerinden daha duyarlı olduğunu göstermiştir (14). Aminoglikozidlerin; mitokondriyal protein sentezinde bozulma, glutamaterjik reseptörlerde aşırı aktivasyon ve serbest radikaller oluşumu aracılığıyla ototoksik etki gösterdiği düşünülmektedir (15, 16). Nitelik salisilat gibi serbest radikal antagonistlerinin veya demir şelatörlerinin tedaviye eklenmesinin ototoksik etkiyi azalttığına gösterilmesi bu teoriyi güçlendirmektedir (14, 17, 18).

Gentamisin ototoksistesini engellediği iddia edilen birçok ajan vardır. Bu ajanlardan başlıcaları; 2.3-dihidroksibenzoat, steroidler, a-tokoferol,  $\alpha$ -lipik asit, salisilatlar, trimetazadin, timokinon, mannitol,  $\beta$ -karoten, C ve E vitaminleri, magnezyum ve deferoksamindir (17, 19-27). Yapılan çalışmalarda N-asetilsisteinin (NAC) de, kültür mediumunda kohleanın duyu hücrelerini gentamisinin ototoksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (28-30). Yine benzer şekilde Tokgoz ve arkadaşlarının 2011 de yaptıkları bir çalışmada, NAC'ın ototoksisteye karşı koruyucu ve yüksek frekansta işitme kaybı üzerinde iyileştirici etkisi olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (31). Üstelik NAC'ın ototoksisteden koruyucu etkisini, aminoglikozidlerin antimikrobiyal etkinliğini azaltmadan sağladığı da gösterilmiştir (28, 31).

N-asetilsistein (NAC), L-sisteinin N-asetil türevidir ve güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Aminoglikozidlerin neden olduğu ototoksistenin temel nedeninin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle NAC'ın antioksidan özelliği sayesinde ototoksik etkiden koruyucu olarak kullanılmaktadır (32, 33). NAC'ın glutatyonun de-nova sentezini provoke ettiği gösterilmiştir.

Ayrıca NAC'ın hücre korumasında uzun süreli etkili olduğunda gösterilmiştir (34). NAC direk olarak platinum molekülünü bağlayabildiği gibi koruma mekanizmasına yardımcı bir kompleks form da oluşturabildiği belirtilmektedir (35).

Bizim çalışmamızda, gentamisin ototoksistesine karşı NAC'ın koruyucu etkisini histopatolojik açıdan inceleyebilmek için bir rat modeli oluşturuldu. Bu amaçla nörofilament (NF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) ekspresyonları incelendi. Böylece bu koruyucu etkinin sadece tüy hücrelerinde değil aynı zamanda nöronal hücrelerde ve sinir liflerinde de gösterilmesi planlandı.

## METOD

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel hayvanları etik kurul tarafından 77.637 .435 numarası ile onaylanmıştır. Metodolojik yönden, prospektif, kontrollü bir hayvan çalışması olarak tasarlanan bu çalışma NAC'ın gentamisin neden olduğu ototoksisteye önlemedeki etkinliğini araştırmaktadır.

Literatürü incelediğimizde benzer bir çalışmada Somdaş ve arkadaşlarının gentamisin için doz tayini ve ABR/BERA işitme testi kullandıkları görülmektedir (36). Biz de çalışmamızda ototoksisteye sağlayabilmek için doz ayarlaması amacıyla bu çalışmanın sonuçlarından faydalandık. Bu amaçla gentamisin intraperitoneal olarak 120 mg/kg dozunda (80 mg/kg;ampul, Genta, I.E Ulagay, Turkey) uygulayarak ototoksisteye sağladık (36).

## Çalışma Dizayını

Ototoksiste için gentamisin modeli kurulduktan sonra, çalışma grubumuz için 3 aylık 36 sağlıklı Sprague- Dawley cinsi,  $250 \pm 20$  g ağırlığında dişi sıçan deney hayvanları laboratuvarında seçilerek 3 gruba ayrıldı. Günlük periton içi gentamisin enjeksiyonları 15 gün boyunca uygulandı. 1. gruba 1 ml serum fizyolojik (intrapertoneal (İP) verildi. 2. gruba 120 mg/kg gentamisin+1 ml serum fizyolojik (SF) (İP) verildi. 3. gruba 120 mg/kg gentamisin +500 mg /kg N-asetilsistein (İP) verildi. 15 gün sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve kohleaları çıkarıldı. Elde edilen kesitlere immünohistokimyasal olarak nörofilament (NF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) primer antikorları uygulandı.

## Histopatolojik Değerlendirme

Nötral formalin solüsyonunda tespit edilen dokular kemik dokusunun kalsifikasyonu için EDTA (cat no: 17892, Thermo Fisher Scientific) solüsyonuna konuldu. 1 gece boyunca akan suda yıkandı. Dehidratasyon için artan dereceli alkol serilerinden geçirildi ve şeffaflaştırma için ksilene konuldu. 5  $\mu$ m lik seri kesitler prolinin kaplı lamplara alındı.

## İmmünohistokimyasal Metod

İmmünohistokimyasal boyama için alınan kohlea kesitleri bir gece  $60^\circ C$  lik etüvde tutulduktan sonra, iki defa  $30'$  ar dakika ksilen solüsyonu ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. İmmünohistokimya kalemi (PEN-01, PatoLab, Japan) ile etrafı çizilen kesitler % 0,5' lik tripsin (ATR31414, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidadını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika blokama solüsyonu (AUB161208A1, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) ile muamele edildi. Blokama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar NF (Mouse monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, USA), NGF (Mouse monoclonal antibody, Abcam, Cambridge, USA) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor ve ardından streptavidin hidrojen peroksidad ile (PHL170627, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) ile  $30'$  ar dakika boyandı. Bu iki boyama arasında ve son inkübasyondan sonra kesitler 3 defa 5 dk PBS ile yıkandı. Son olarak 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC, ASS-060, Spring, CA, USA) 3-5 dk uygulandı ve PBS ile yıkandı, nükleuslar artalan boyamaları için Mayer's hematoksilen ile boyandı distile su ile yıkanıp Mounting medium (DMM-060, Spring, CA, USA) ile kapatıldı. İmmün işaret skorları birbirinden bağımsız 2 araştırmacı tarafından değerlendirildi ve fotoğraflar CX31 ışık mikroskopunda çekildi (Olympus, Tokyo, Japan). Boyamalarda her bir preparatta X400 büyültmede rasgele beş alan seçilerek tutulumların yoğunluğuna ve tutulum miktar yüzdesine göre H skoru hesaplandı. Tutulum yoğunluğu semi kantitatif olarak 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (+ +, orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+ + +, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandırıldı.

Tutulum miktar yüzdesi immünreaktivitenin bulunduğu hücre/yapıların toplam hücre/yapılara oranlanması ile; 1 (%0 – 10 arası, fokal), 2 (%11 – 50 arası, bölgesel) ve 3 (%51-100 arası, diffüz) olarak skorlandı. Her bir alan için bulunan yoğunluk ve miktar skorları  $\Sigma Pi.(i+1)$  ( $Pi$ = tutulum miktar yüzdesi,  $i$ = tutulum yoğunluğu) formülü ile hesaplandı. Sonuçlar toplanarak o lam için tek bir değere ulaşıldı (37, 38).

#### İstatistik Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 16.0(SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Verilerin analizinde ortalama  $\pm$ SS değerlerine odaklanıldı. Sayısal veriler normal dağılıma uygun olduğu için ANOVA testi kullanıldı. P değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Farklılığın hangi gruptan olduğunu anlayabilmek için post hoc çoklu karşılaştırma testi (Tukey) uygulandı.

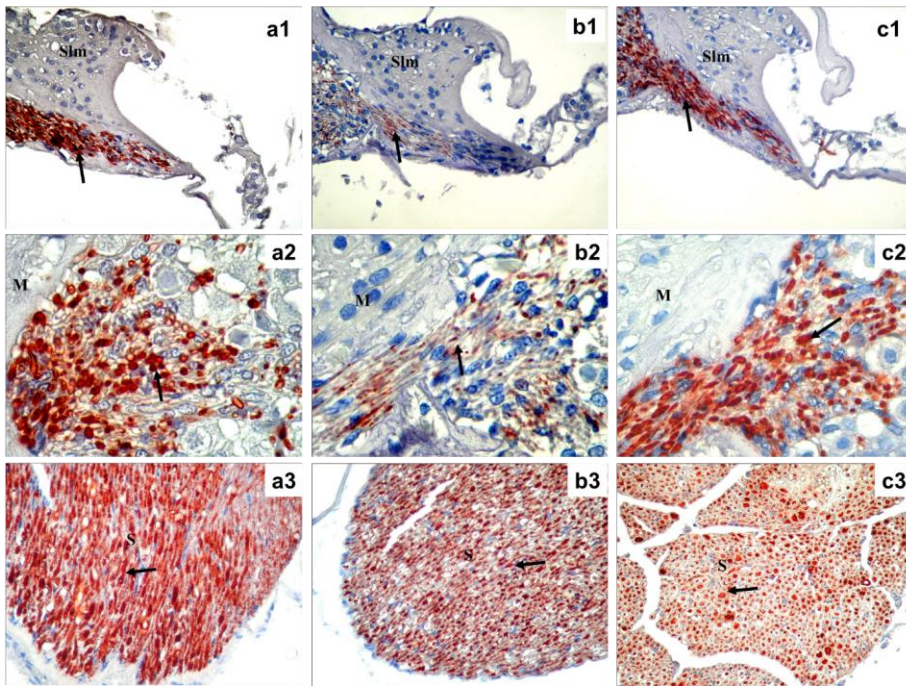
#### BULGULAR

Sadece SF verilen grubun korti organında iç ve dış tüy hücrelerinden gelen ve spiral limbusun tabanından uzanan sinir liflerinde, modiolustaki spiral ganglionun arasındaki sinir liflerinde ve afferent - efferent sinir demetinde oldukça kuvvetli nörofilament (NF) ekspresyonu gözlemlendi (Resim 1- a1, a2, a3).

Gentamisin +SF uygulanan grupta ise korti organındaki sinir liflerinde, afferent ve efferent sinir demetinde zayıf NF reaksiyonu belirlendi (Resim 1- b1, b2, b3). Gentamisin+N-asetilsistein grubunda nörofilament reaksiyonunun SF grubuna şiddet ve lokalizasyon bakımından oldukça benzer olması dikkat çekiciydi (Resim 1- c1, c2, c3).

NGF salınımı ise SF ve Gentamisin+ NAC grubunda kohlea genelinde özellikle spiral limbusta orta derecede gözlemlendi (Resim 2- a1, c1). Modiolustaki spiral gangliondaki bazı nöronlarda ve afferent ve efferent sinir demetindeki bazı sinir liflerinde NGF immünoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 2- a2, a3, c2, c3). Gentamisin+SF grubunda ise NGF ekspresyonu vestibular ganglionlarda negatif, afferent ve efferent sinir lifi demetinde oldukça zayıf olarak gözlemlendi (Resim 2- b1, b2, b3).

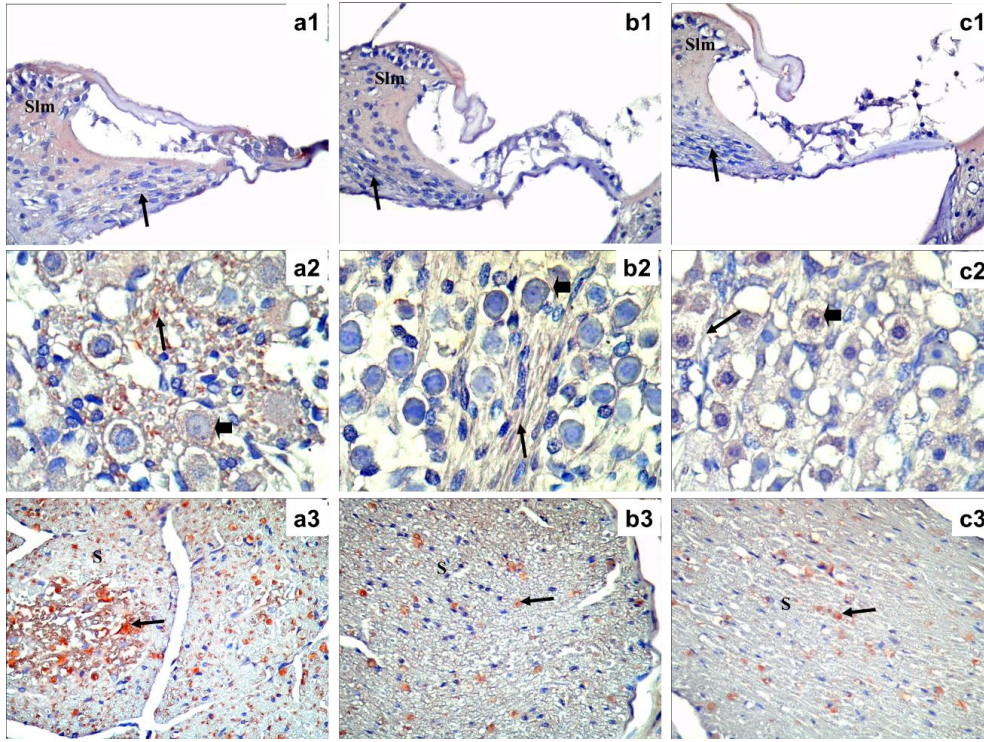
Her üç grupta da kohlea dokusu immünoreaktivitesi karşılaştırıldığında, NF boyaması yoğunluğu Gentamisin + NAC grubunda SF ve Gentamisin + SF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0,05$ ). NGF boyamasına bakıldığında ise yine benzer şekilde Gentamisin + NAC grubunda, SF ve Gentamisin + SF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). Her 3 grupta varyans homojen ve Anova testi sonucu  $p<0,05$  bulundu. Hem NGF hem de NF immünohistokimya şiddeti ortalamaları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (Tablo1, Grafik 1).



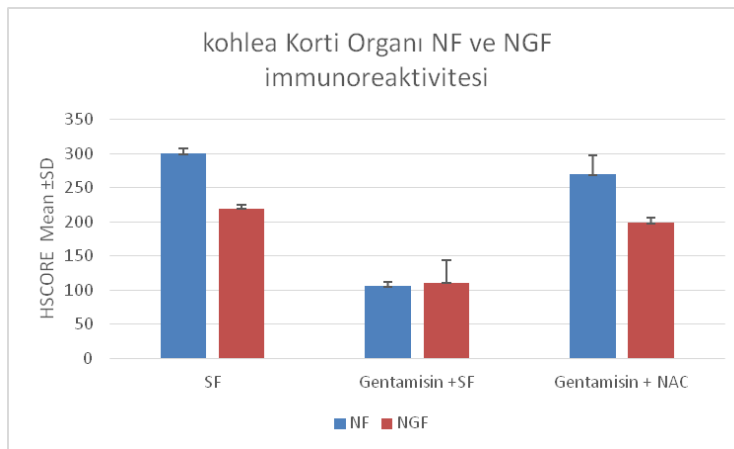
**Resim 1:** Kohlea korti organı NF immunohistokimya boyaması. SF grubunda iç ve dış tüy hücrelerinden gelen ve spiral limbusun tabanından uzanan sinir liflerinde, modiolustaki spiral ganglionun arasındaki sinir liflerinde ve afferent - efferent sinir demetinde oldukça kuvvetli NF ekspresyonu gözlemlendi (Resim 1- a1, a2, a3). Gentamisin +SF grubunda korti organındaki sinir liflerinde, afferent ve efferent sinir demetinde zayıf NF reaksiyonu belirlendi (Resim 1- b1, b2, b3). Gentamisin+NAC grubunda NF reaksiyonu SF grubuna şiddet ve lokalizasyon bakımından oldukça benzerdi. (Resim 1- c1, c2, c3). **Slm:** Spiral limbus, **→:** Vestibulokohlear sinir lifi, **⇨:** spiral ganglion nöronları, **S:** Afferent ve Efferent sinir demeti. SF (A), Genta (B), Genta + Nasetilsistein (C), Korti organı (1) X400, spiral ganglion (2) X1000, afferent ve efferent sinir demeti (3) X400.

**Tablo 1:** Kohlea korti organında gruplar arasında NF ve NGF immünohistokimya boyamasına göre HSCORE Ortalama  $\pm$  Standard Sapma değerleri.

HSCORE (Ortalama $\pm$ S S)	NF	NGF
SF	300.3 $\pm$ 8.07	219.8 $\pm$ 5.11
Gentamisin+SF	106 $\pm$ 5.4	110.7 $\pm$ 33.06
Gentamisin+ NAC	269.4 $\pm$ 28.04	198.5 $\pm$ 8.2



**Resim 2:** Kohlea korti organı NGF immunohistokimya boyaması. SF ve Gentamisin+ NAC grubunda kohlea genelinde özellikle spiral limbusta orta derecede reaksiyon gözlemlendi (Resim 2- a1, c1). Modiolustaki spiral gangliondaki bazı nöronlarda ve afferent ve efferent sinir demetindeki bazı sinir liflerinde NGF immünoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 2- a2, a3, c2, c3). Gentamisin+SF grubunda ise vestibular ganglionlarda negatif, afferent ve efferent sinir lifi demetinde oldukça zayıf olarak ekspresyon belirlendi (Resim 2- b1, b2, b3). **Slm:** Spiral limbus, →: Vestibulokohlear sinir lifi, ⇨: spiral ganglion nöronları, **S:** Afferent ve efferent sinir demeti. SF (A), Genta (B), Genta + Nasetilsistein C), Korti organı (1) X400, spiral ganglion (2) X1000, afferent ve efferent sinir demeti (3) X400.



**Grafik 1:** Kohlea korti organı NF ve NGF immünoreaktivitesi, Ortalama ± Standard Sapma değerleri.

## TARTIŞMA

Aminoglikozid ilaçların çoğu, hem kohlear hem de vestibuler sistem üzerine ototoksik etkiye sahiptir. Özellikle aminoglikozid sınıfı antimikrobiyaller üzerine literatürde epeyce çalışma olmasına rağmen, halen daha ototoksisiteden korunmanın nasıl olması gerektiği ve bu koruyuculuğun da en iyi şekilde nasıl gösterilebileceği hakkında birçok soru mevcuttur (39).

Aminoglikozidlere bağlı gelişen ototoksisite yaklaşık %8 oranında görülmekle birlikte bu oran veriliş süresi, uygulama yolu (topikal ya da sistemik) ve doz ile ilişkili olarak değişmektedir. Bu nedenle farklı yayınlarda farklı oranlar belirtilmektedir (28, 40).

Ototoksisitenin daha da kapsamlı tanımı; sistemik ya da topikal bazı maddelerin, özellikle kohlear kanal ve 8. kranial sinirde fonksiyonel yetersizlik ve/veya iç kulakta hücrel hasarlanmaya neden olması şeklinde yapılabilmektedir (39). Bu ifadeden anlaşılabilir şudur ki, terapötik ajanlar hem kohleotoksik hem de vestibulotoksik olabilir. Örneğin, sisplatin gibi bazı ajanlar işitme için daha çok toksik olabilirken, gentamisin gibi bazı ajanlar ise, vestibuler sistem için daha çok toksiktir (39).

Daha önceki yapılan çalışmaların bazılarında ototoksisite yapan aminoglikozidler ve koruyucu ajanlar ile ilgili farklı görüşler mevcuttur (1, 8, 21-25, 41, 42). Aynı şekilde ototoksisiteye neden olan gentamisin dozu hakkında da tartışılmalı sonuçlar vardır (36). Bu sebepten bizim çalışmamızda ototoksisiteyi sağlayabilmek için literatürü incelediğimizde Somdaş ve arkadaşlarının 2015'te yapmış oldukları gentamisin için doz tayini ve işitme testi baz alındı (36). Yapılan bu çalışmada, öncelikle bir ön çalışma uygulanmış ve ototoksisite için gerekli doz belirlenmiştir. Bu çalışmada öncelikle, 16 siçana ön deneme amaçlı olarak ototoksisite uygulanmış olup bu amaçla 4 Wistar Albino siçana, Gentamisin (80 mg/kg) uygulanmıştır. Ancak işitme testinde ototoksisite belirlenmeden hemen önce ne yazık ki denekler kaybedilmiş. Bunun üzerine siçan türü değiştirilerek 4 Sprague- Dawley siçana gentamisin uygulanmış. Ototoksisite sonuçlanana kadar, ilk önce 80 mg/kg, sonrada 100 mg/kg ve 120 mg/kg uygulamaya devam edilmiş. Ototoksisitenin oluşup oluşmadığını anlayabilmek için ABR (Bera) testi (işitme testi) uygulanmıştır (36).

Bizim çalışmamızda; ototoksisite için gerekli gentamisin dozu literatüre uygun olarak belirlendikten sonra, sağlıklı Sprague- Dawley cinsi dişi siçanlara 120 mg/kg dozunda gentamisin uygulayarak ototoksisiteyi sağladık(36). Ototoksisite ne yazık ki hayat kalitesini düşüren bir etkiye sahiptir. Renal işlev bozukluğuna sahip olan hastalarda ototoksisitenin gelişme olasılığı daha yüksektir.



Bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalarda yan etkilerden korunmak için doz kısıtlamasına gidilmesi gerekmektedir (43). Ototoksik ajanların yapmış oldukları hasarın, deney hayvanlarının kohlear kanallarında insandakine benzer şekilde olduğunu Huang ve ark. yapmış oldukları çalışmada açıkça ifade etmişlerdir (44).

Literatürde, kohlear hasar üzerine yapılmış çalışmalardan sisplatin (CP) gibi bazı antineoplastik ilaçların etkileri histopatolojik olarak incelendiğinde; CP ototoksitesinden etkilenen primer bölgenin kohleanın orta ve bazal kıvrımlarındaki dış tüy hücreleri (DTH) olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarda ayrıca destek hücrelerinin ve stria vaskülaris'in genellikle normal olduğu, spiral ganglion hücrelerinde ise değişiklikler görülebildiği, nadiren de olsa kohleanın apikal bölümünde DTH kaybı ve bazen de içtüy hücrelerinde kayıp görülebildiği bildirilmiştir (45-49). CP nörotoksitesisi esas olarak ototoksiste ve nöropati biçiminde meydana gelir. CP ayrıca vestibüler siniri de etkilemekte ve periferik sinirlerde de hasara yol açarak proprioseptif ve duyuşal hislerde değişimlere neden olmaktadır. CP kullananlarda, doza bağımlı olarak karıncalanmalar, derin tendon reflekslerindeki azalma ve ataksi bildirilmiştir. Ayrıca, otonom sinir sistemi bozukluklarının da olduğu rapor edilmiştir (50). NAC kullanımı ile CP ototoksitesisinin önlenilebileceğine ilişkin pek çok yayın mevcuttur (51-54).

Bu çalışmamızda gentamisin'in kohlear sistemdeki sinir lifleri üzerindeki histopatolojik etkisini incelemek amaçlanmıştır. Önceki çalışmalarımızda Gentamisin'in kısmen bazal kısımdaki dış tüy hücrelerini harap ettiğini gözlemledik ve eğer ki bu ilacın dozu arttırılacak olursa iç tüy hücrelerinde de histopatolojik etkiler yaratabileceğini düşünmekteyiz (36). Ancak aminoglikozidlere bağlı gelişen ototoksiste için genetik yatkınlık bulunduğu dair çalışmalar mevcut olup bu nedenle her hastada aynı derecede etkilenme olmayacağı da unutulmamalıdır (55-57). Bu nedenle NAC kombinasyonuna bağlı koruyucu etkinin de benzer şekilde etkilenmesi muhtemeldir. Ayrıca aminoglikozid tedavisi planlanan hastanın birincini derece yakınında aminoglikozid ototoksitesisi öyküsü olması durumunda, başka bir antibiyotik tercihi yapılması daha doğru bir yaklaşım olacağı yönünde görüşler de bulunmaktadır (14, 58). N-asetil sistein (NAC) mukolitik ve antioksidan özellikleri için kullanılan, Türkiye'de tablet, şurup ve ampul formları olan bir ilaçtır. CP ototoksitesinin ve bazı karaciğer hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan NAC'in birçok çalışmada koruyucu sonuçları gösterilmiştir (51-54). Daha önceki çalışmalarda, NAC'in ototoksiteden koruyucu etkisi sadece antimikrobiyallerle kombine edildiğinde değil aynı zamanda bazı kemoteropötikler ile kombine edildiğinde de gösterilmiştir (32, 33). *Helicobacter pylori*'nin yok edilmesinde yardımcı olduğu ve renal diyaliz yapılan hastalarda gentamisin nedeniyle oluşan işitme kaybını önlediği gösterilmiştir (29, 59-63). Somdaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre gentamisin'in neden olduğu ototoksiteyi engelleyebilmek için N-asetilsistein uygulanan sıçan modelinde; histopatolojik incelemelerde tek başına gentamisin verilen grupta hücre ölümünde (apoptoz) azalma olduğu gözlenmiştir (36). Benzer şekilde gentamisine ilave olarak NAC verilen grubun işitme kaybı açısından daha iyi durumda olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılara göre; gentamisin ototoksitesisi NAC kombinasyonu ile önlenilebilmekte ve bu koruyucu etki hem histopatolojik hem de odiyometrik olarak gösterilebilmektedir (36). Bizim çalışmamızda da; gentamisin'in ototoksitesine karşı NAC koruyucu etkisini inceledik. İmmünohistokimyasal yönden yapmış olduğumuz incelemede, biri nörofilament (NF) ve diğeri sinir büyüme faktörü (NGF) olmak üzere iki boyama gerçekleştirdik.

Dış etmenler tarafından etkilenen nöronların maturasyonu hakkında birçok görüş bulunmaktadır. Bunlardan birisinde trofik faktörlerin, nöronların hedef dokularınca sentezlendiği ve akson boyunca hücre gövdesine doğru retrograd yönde transport edildiği ve sonuçta, periferik sinir sistemi gelişiminin ve nöronların hayatta kalmasında önemli oldukları gösterilmiştir (64). Kohleovestibular ganglion hücreleri ve hedefleri olan tüy hücreleri arasındaki trofik etkileşimleri incelemek amacıyla in vitro çalışmalar yapılmıştır (64-66). NGF periferik gangliyon hücreleri maturasyonunu, lokal olarak kontrol eden en karakteristik, trofik faktördür. Despres ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmaya göre, postnatal dönemde 7. gününde korti organı tüy hücrelerinde NGF varlığı direk tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda her üç grupta farklı boyama yerleri gösterilmiş olup, özellikle gentamisin + NAC grubu ve SF grubunda, modiolustaki spiral gangliondaki bazı nöronlarda ve afferent ve efferent sinir demetindeki bazı sinir liflerinde NGF ekspresyonları gösterilmiştir. Hu ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları bir başka çalışmada ise, nöronal doku nakli üzerinde durulmuştur. Yetişkin sıçan iç kulağında yapılan bir nakil sonrasında NGF'nin implante edilen dorsal kök gangliyon nöronlarından gelişen nörit büyümesini uyardığını göstermişlerdir (67).

Literatürdeki nörofilament immünoreaktivitesi ile ilgili kohlea çalışmalarına bakıldığında, Despres ve arkadaşlarının insan fetüsü kohleasında hücre iskeleti proteinlerinin dağılımını inceledikleri görülmüştür. Bu çalışmada incelenen başlıca hücre iskeleti proteinleri nörofilamentler, periferin ve MAP- tau proteinleridir. Gelişen fetusun kohleasında nörofilament immünoreaktivitesinin spiral gangliyon nöronlarında daha az bulunduğu ancak kohlear inervasyonun afferent ve efferent liflerde ise daha yoğun olarak tespit edilmiştir (68). Bizim çalışmamızda, tek başına SF verilen ve gentamisin + NAC gruplarında korti organındaki iç ve dış tüy hücrelerinden gelen, spiral limbusun tabanından uzanan sinir liflerinde, modiolustaki spiral ganglionun arasındaki sinir liflerinde, afferent ve efferent sinir demetinde oldukça kuvvetli nörofilament ekspresyonu gözlenmiştir. Bauwens ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışmada ise, yetişkin insan kohleasında ara filament proteinlerin ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmalarında, ara filamentlerden olan nörofilament proteinlerin, tüy hücrelerindeki sinir sonlanmalarında, nöronal demetlerde ve gangliyon hücrelerinde var olduklarını vurgulamışlardır (69). Kamakura ve arkadaşlarının 2018 de yapmış oldukları insanda kohlear implantasyonu sonrası dendritik sürecin inervasyonu ve korti organı tüy hücrelerinin korunması üzerine yapmış oldukları çalışmada, iki taraflı şiddetli sensörinöral işitme kaybı yaşayan ve tek taraflı kohlear implantları olan 40 hastadan 28'inde selloidine gömülü temporal kemik üzerinde çalışılmış, implante olan ve implante olmayan kulaklarda nörofilament, miyozin VIIa, ve tubulin immünohistokimyasal boyaması sonucunda, iç ve dış tüy hücrelerindeki nörofilament immünoreaktivitesinin implante kohlea boyunca azaldığını göstermişlerdir. Kamakura ve arkadaşlarına göre, kohlear implant uygulaması iç ve dış tüy hücrelerini önemli ölçüde etkilemektedir (70).

## SONUÇLAR

Çalışmamızda, gentamisin'in kohleada neden olduğu ototoksitesinin, sinir liflerinde ve demetlerinde NF ve NGF gibi faktörlerin ekspresyon kaybına ve dolayısıyla nörofilamentler üzerinde dejenerasyona neden olabileceği gösterilmiştir. Bulgularımıza göre; gentamisin'in ototoksik etkisinin N-asetilsisteinin (NAC) verilen grupta azaltılabileceğini literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde gözlemledik (36). Çalışmamızda NAC'nin kohlea tüy hücrelerindeki hasarı engelleme mekanizmasının, nörofilamentler üzerinde koruyucu etki göstererek de olabileceği düşünülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda, doz bağımlı değişikliklerin ve bu etkiye aracılık eden mediatörlerin başka ajanların kullanımı ile de araştırılıp değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Palomar García FAM, E. Bodet Agustí, L. Andreu Mencía, V. Palomar Asenjo, V. Drug-induced ototoxicity: current status. *Acta oto-laryngologica*. 2001;121(5):569-72.
2. Smith CR, Lipsky JJ, Laskin OL, Hellmann DB, Mellits ED, Longstreth J, et al. Double-blind comparison of the nephrotoxicity and auditory toxicity of gentamicin and tobramycin. *New England Journal of Medicine*. 1980;302(20):1106-9.
3. Kocyigit M. Ototoksik ilaçlar ve iç kulağa etkileri. *IKSST Derg*. 2017;9(3):91-5.
4. Selimoğlu E, Kalkandelen S, Erdogan F. Comparative vestibulotoxicity of different aminoglycosides in the Guinea pigs. *Yonsei medical journal*. 2003;44(3):517-22.
5. Keene M, Hawke M, Barber HO, Farkashidy J. Histopathological findings in clinical gentamicin ototoxicity. *Archives of Otolaryngology*. 1982;108(2):65-70.
6. Malgrange B, Lefèbvre PP, Moonen G. *Biologie cellulaire de la prévention et du traitement des surdités neurosensorielles*. 1998.
7. Meyers RM. Ototoxic effects of gentamicin. *Archives of Otolaryngology*. 1970;92(2):160-2.
8. Ruan Q, Ao H, He J, Chen Z, Yu Z, Zhang R, et al. Topographic and quantitative evaluation of gentamicin-induced damage to peripheral innervation of mouse cochleae. *Neurotoxicology*. 2014;40:86-96.
9. Pyykkö I, Ishizaki H, Kaasinen S, Aalto H. Intratympanic gentamicin in bilateral Meniere's disease. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. 1994;110(2):162-7.
10. Feldbaum JS, Silverstein H. Streptomycin drug fever during treatment of bilateral Meniere's disease. *Archives of Otolaryngology*. 1984;110(8):538-9.
11. Parnes LS, Riddell D. Irritative spontaneous nystagmus following intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *The Laryngoscope*. 1993;103(7):745-9.
12. Kalkandelen S, Selimoğlu E, Erdoğan F, Üçüncü H, Altaş E. Comparative cochlear toxicities of streptomycin, gentamicin, amikacin and netilmicin in guinea-pigs. *Journal of international medical research*. 2002;30(4):406-12.
13. Roland J, Cohen N. *Vestibular and auditory ototoxicity*. *Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 3rd ed St Louis, Mosby. 1998:3186-97.

14. Roland PS. New developments in our understanding of ototoxicity. *Ear, nose & throat journal*. 2004;83(9\_suppl\_4):15-7.
15. Strupp M, Arbusow V. Acute vestibulopathy. *Current opinion in neurology*. 2001;14(1):11-20.
16. Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2003;11(5):328-33.
17. Sha S-H, Schacht J. Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity. *Laboratory investigation*. 1999;79(7):807-14.
18. Wu W-J, Sha S-H, Schacht J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiology and Neurotology*. 2002;7(3):171-4.
19. Sagit M, Korkmaz F, Gürgeç SG, Kaya M, Akçadağ A, Özcan I. The protective role of thymoquinone in the prevention of gentamicin ototoxicity. *American journal of otolaryngology*. 2014;35(5):603-9.
20. Ünal ÖF, Ghoreishi SM, Ataş A, Akyürek N, Akyol G, Gürsel B. Prevention of gentamicin induced ototoxicity by trimetazidine in animal model. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2005;69(2):193-9.
21. Eldin Mostafa B, Tawfik S, Galal El Hefnawi N, Amir Hassan M, Abbas Ismail F. The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta oto-laryngologica*. 2007;127(3):234-9.
22. Sinswat P, Wu W-J, Sha S-H, Schacht J. Protection from ototoxicity of intraperitoneal gentamicin in guinea pig. *Kidney international*. 2000;58(6):2525-32.
23. Park SK, Choi D, Russell P, John EO, Jung TT. Protective effect of corticosteroid against the cytotoxicity of aminoglycoside otic drops on isolated cochlear outer hair cells. *The Laryngoscope*. 2004;114(4):768-71.
24. Fetoni AR, Sergi B, Scarano E, Paludetti G, Ferraresi A, Troiani D. Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol against gentamicin-induced oto-vestibulo toxicity: an experimental study. *Acta oto-laryngologica*. 2003;123(2):192-8.
25. Conlon BJ, Aran J-M, Erre J-P, Smith DW. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. *Hearing research*. 1999;128(1-2):40-4.
26. Wood JW, Bas E, Gupta C, Selman Y, Eshraghi A, Telischi FF, et al. Otoprotective properties of mannitol against gentamicin induced hair cell loss. *Otology & Neurotology*. 2014;35(5):e187-e94.
27. Le Prell C, Ojano-Dirain C, Rudnick E, Nelson M, DeRemer S, Prieskorn D, et al. Assessment of nutrient supplement to reduce gentamicin-induced ototoxicity. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2014;15(3):375-93.
28. Maniü A, Perde-Schrepler M, Cosgarea M. Protective effect of LN-acetylcysteine against gentamicin ototoxicity in the organ cultures of the rat cochlea. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(1):159-64.
29. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *American family physician*. 2009;80(3):265-9.
30. Feldman L, Efrati S, Eviatar E, Abramsohn R, Yarovoy I, Gersch E, et al. Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney international*. 2007;72(3):359-63.
31. Tokgoz B, Ucar C, Kocyigit I, Somdas M, Unal A, Vural A, et al. Protective effect of N-acetylcysteine from drug-induced ototoxicity in uraemic patients with CAPD peritonitis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(12):4073-8.
32. Low W-K, Sun L, Tan MG, Chua AW, Wang D-Y. LN-Acetylcysteine protects against radiation-induced apoptosis in a cochlear cell line. *Acta oto-laryngologica*. 2008;128(4):440-5.
33. Okur E, Kilinc M, Yildirim I, Kilic MA, Tolun FI. Effect Of N-Acetylcysteine on Carboplatin-Induced Ototoxicity and Nitric Oxide Levels in a Rat Model. *The Laryngoscope*. 2007;117(12):2183-6.
34. Tsukimura N, Yamada M, Aita H, Horii N, Yoshino F, Lee MC-I, et al. N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly (methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials*. 2009;30(20):3378-89.
35. Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Brummett RE, Doolittle ND, Zuhowski EG, et al. Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(1):309-15.
36. Somdaş MA, Korkmaz F, Gürgeç SG, Sagit M, Akçadağ A. N-acetylcysteine prevents gentamicin ototoxicity in a rat model. *J Int Adv Otol*. 2015;11(1):12-8.
37. Yeşil H, Tuğlu İ. The relation of oxidative stress and apoptosis to histopathologic alterations in the lungs as a result of global cerebral ischemia. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019;94(8):555-68.
38. Sagit M, Korkmaz F, Gürgeç SG, Gundogdu R, Akçadağ A, Özcan I. Quercetin attenuates the gentamicin-induced ototoxicity in a rat model. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2015;79(12):2109-14.
39. Rutka J. *Aminoglycoside Vestibulotoxicity*. Vestibular Disorders. 82: Karger Publishers; 2019. p. 101-10.
40. Selimoglu E. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(1):119-26.
41. Chen L, Xiong S, Liu Y, Shang X. Effect of different gentamicin dose on the plasticity of the ribbon synapses in cochlear inner hair cells of C57BL/6J mice. *Molecular neurobiology*. 2012;46(2):487-94.
42. Tokgoz B, Somdas MA, Ucar C, Kocyigit I, Unal A, Sipahioğlu MH, et al. Correlation between hearing loss and peritonitis frequency and administration of ototoxic intraperitoneal antibiotics in patients with CAPD. *Renal failure*. 2010;32(2):179-84.
43. Czock D, Giehl M, Keller F. A Concept for Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Dosage Adjustment in Renal Impairment. *Clinical pharmacokinetics*. 2000;38(4):367-75.
44. Huang MY, Schacht J. Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. 1990.
45. Strauss M, Towfigh J, Lord S, Lipton A, Harvey HA, Brown B. Cis-platinum ototoxicity: Clinical experience and temporal bone histopathology. *The Laryngoscope*. 1983;93(12):1554-9.
46. Laurell G, Jungnelius U. High-Dose cisplatin treatment: Hearing loss and plasma concentrations. *The Laryngoscope*. 1990;100(7):724-34.
47. Ciges M, Fernandez-Cervilla F, Crespo P, Campos A. Pantothenic acid and coenzyme A in experimental cisplatin-induced ototoxicity. *Acta oto-laryngologica*. 1996;116(2):263-8.
48. Comis SD, Rhys-Evans PH, Osborne MP, Pickles JO, Jeffries DJ, Pearce HA. Early morphological and chemical changes induced by cisplatin in the guinea pig organ of Corti. *The Journal of Laryngology & Otology*. 1986;100(12):1375-83.
49. Wright CG, Schaefer SD. Inner ear histopathology in patients treated with Cis-Platinum. *The Laryngoscope*. 1982;92(12):1408-13.
50. Akyıldız N. Tinnitus, Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi II, Bilimsel tip yayınevi. Ankara; 2002.
51. Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App E, et al. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respiratory medicine*. 1997;91(3):159-68.
52. Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;314(3):1052-8.
53. Neuwelt EA, Pagel MA, Hasler BP, Deloughery TG, Muldoon LL. Therapeutic efficacy of aortic administration of N-acetylcysteine as a chemoprotectant against bone marrow toxicity after intracarotid administration of alkylators, with or without glutathione depletion in a rat model. *Cancer research*. 2001;61(21):7868-74.
54. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *The Laryngoscope*. 2001;111(7):1147-55.
55. Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;884(1):99-109.
56. Tang H-Y, Hutcheson E, Neill S, Drummond-Borg M, Speer M, Alford RL. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: how many are at risk? *Genetics in Medicine*. 2002;4(5):336-45.
57. Gürtler N, Schmuziger N, Kim Y, Mhatre AN, Jungi M, Lalwani AK. Audiologic testing and molecular analysis of 12S rRNA in patients receiving aminoglycosides. *The Laryngoscope*. 2005;115(4):640-4.
58. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Chaltraw WE, Wendt KA, Nelson RA, Arnos KS, et al. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *American journal of otolaryngology*. 1997;18(3):173-8.
59. Gurbuz AK, Ozel AM, Ozturk R, Yildirim S, Yazgan Y, Demirturk L. Effect of N-acetyl cysteine on *Helicobacter pylori*. *Southern medical journal*. 2005;98(11):1095-8.
60. Bagshaw SM, McAlister FA, Manns BJ, Ghali WA. Acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy: a case study of the pitfalls in the evolution of evidence. *Archives of internal medicine*. 2006;166(2):161-6.
61. Zagler A, Azadpour M, Mercado C, Hennekens CH. N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of 13 randomized trials. *American heart journal*. 2006;151(1):140-5.
62. Seyon RA, Jensen LA, Ferguson IA, Williams RG. Efficacy of N-acetylcysteine and hydration versus placebo and hydration in decreasing contrast-induced renal dysfunction in patients undergoing coronary angiography with or without concomitant percutaneous coronary intervention. *Heart & Lung*. 2007;36(3):195-204.
63. Gonzales DA, Norsworthy KJ, Kern SJ, Banks S, Sieving PC, Star RA, et al. A meta-analysis of N-acetylcysteine in contrast-induced nephrotoxicity: unsupervised clustering to resolve heterogeneity. *BMC medicine*. 2007;5(1):32.
64. Despres G, Giry N, Romand R. Immunohistochemical localisation of nerve growth factor-like protein in the organ of Corti of the developing rat. *Neurosci Lett*. 1988;85:5-8.
65. Van De Water TR, Ruben RJ. Neurotrophic interactions during in vitro development of the inner ear. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. 1984;93(6):558-64.
66. Sobkowicz HM, Rose JE. Innervation of the organ of Corti of the fetal mouse in culture. *Development of Auditory and Vestibular systems*. 1983:27-45.
67. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiology of disease*. 2005;18(1):184-92.
68. Després G, Leger G-P, Dahl D, Romand R. Distribution of cytoskeletal proteins (neurofilaments, peripherin and MAP-tau) in the cochlea of the human fetus. *Acta otolaryngologica*. 1994;114(4):377-81.
69. Bauwens LJ, Veldman JE, Ramaekers FC, Bouman H, Huizing EH. Expression of intermediate filament proteins in the adult human cochlea. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. 1991;100(3):211-8.
70. Kamakura T, O'Malley JT, Nadol Jr JB. Preservation of cells of the organ of Corti and innervating dendritic processes following cochlear implantation in the human: an immunohistochemical study. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otolology and Neurotology*. 2018;39(3):284.