

Introduction of an experimental model for the rapid destruction of hair cells: the use of DPOAEs in assessment of rat ear function

Mesbahzadeh B., M.Sc*., Ajalloueyan M., M.D., Asgari A.R., Ph.D., Kaka Gh.R., Ph.D., Sadraei S.H., Ph.D., Hasanlifard M., M.Sc.,

** Physiology and Pharmacology Department of, School of Medicine, Medical Sciences Birjand University, Birjand, 9717853577, Iran*

Received: Dec 2011

Accepted: Feb 2012

Abstract

Purpose: the aim of this survey is establishment of an animal model through which a rapid distortion of the hair cell of cochlea administering amikacin and furosemide and using distortion product otoacoustic emission (DPOAE) the functioning of rat's ear would be assessed.

Materials and Methods: Forty-eight male Sprague dawley rats (with average of weight 200-250g, 12 weeks post natal) were randomly divided into six equal groups. Except the control group the rest received 0.5mg/g , 0.75mg/g, 1mg/g, 1.25mg/g, and 1.5mg/g, of subcutaneous amikacin respectively. 30 minutes later every rat received 0.1mg/g of furosemide intraperitoneally. DPOAE of rats was measured prior to these injections and 72 hours later. Then tissue section of the rat's cochlea was prepared. Data were analyzed by means of SPSS (version 17) and ANOVA test and paired sample T test at the significant level of $p \leq 0.05$.

Results: All the cases had a significant decrease in their DPOAE with the frequencies 2KHz-8KHz ($p \leq 0.05$). The most change in DPOAE was in rats which had received 1mg/g – 1.5mg/g amikacin. Histological studies approved distortion of hair cell even within the apical turn.

Conclusion: To establish a deafness model due to losing hair cells, it is recommended to use a combination of 1mg/g amikacin and 0.1mg/g furosemide. Besides, DPOAE can be used to approve deafness.

Key Words: Amikacin, Furosemide, Hair cell loss, DPOAE, Rat

معرفی مدل تجربی برای تخریب سریع سلول‌های مویی: استفاده از DPOAEs

در ارزیابی عملکرد گوش رت

✍ بهزاد مصباح‌زاده *M.Sc.، محمد اجل لوئیان **M.D.، علیرضا عسکری *Ph.D.، غلامرضا کاکا ***Ph.D.،

سید همایون صدرایی ****Ph.D.، مهدیه حسنعلی فرد ****M.Sc.

* گروه فیزیولوژی-بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

** مرکز تحقیقات شنوایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

*** مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

**** گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

***** اودیولوژیست بیمارستان بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ماه ۹۰، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۹۰

چکیده

هدف: ایجاد یک مدل حیوانی و ایجاد یک تخریب سریع در سلول‌های مویی حلزون در آن با استفاده از آمیکاسین و فوروزیماید و سپس ارزیابی عملکرد گوش رت با استفاده از DPOAE (*Distortion product otoacoustic emission*)

مواد و روش‌ها: ۴۸ رت از نوع Sprague dawley (سن ۱۲ هفته) به صورت تصادفی به شش گروه هشت‌تایی تقسیم شد. به جز گروه کنترل سایر گروه‌ها به ترتیب ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ میلی گرم برگرم آمیکاسین به طریق زیر جلدی دریافت کردند. سپس به تمام گروه‌های دریافت کننده آمیکاسین بعد از ۳۰ دقیقه فوروزیماید به میزان ۰/۱ میلی گرم برگرم به طریق داخل صفاقی تزریق شد. DPOAE تمام رت‌ها قبل و ۷۲ ساعت بعد از تزریق داروها اندازه‌گیری و سپس مقاطع بافتی از حلزون گوش رت‌ها تهیه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۷) و آزمون آماری ANOVA و تی زوج شده در سطح معنی‌داری ($p \leq 0.05$) تجزیه تحلیل شد. **یافته‌ها:** در رت‌های دریافت کننده آمیکاسین- فوروزیماید DPOAEs در فرکانس‌های ۲ تا ۸ کیلو هرتز به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($p \leq 0.05$). بیشترین تغییرات DPOAE در رت‌های دریافت کننده ۱ تا ۱/۵ میلی گرم برگرم آمیکاسین مشاهده شد. مطالعات بافت‌شناسی تأیید کننده تخریب سلول‌های مویی حتی در پیچ رأسی در این محدوده دارویی بود.

نتیجه‌گیری: برای ایجاد یک مدل ناشنوای ناشی از بین رفتن می‌توان از ترکیب آمیکاسین و فوروزیماید ۰/۱ میلی گرم برگرم و برای تأیید این ناشنوایی از ثبت DPOAE استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: آمیکاسین، فوروزیماید، Hair cell loss، DPOAE، رت

مقدمه

می‌شود سبب آسیب به سیستم وستیبولار و ناشنوایی به دلیل از بین رفتن سلول مویی می‌شود. در میان آن‌ها برخی از آمینوگلیکوزیدها مثل gentamicin و streptomycin اغلب

آثار اتوتوکسیک غیرقابل برگشت آمینوگلیکوزیدها مدت‌هاست که شناخته شده است. این گروه دارویی که شامل gentamicin, amikacin, kanamycin, neomycin, dihydrostreptomycin,

✍ آدرس مکاتبه: بیرجند، خیابان غفاری، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، گروه فیزیولوژی-

فارماکولوژی، کد پستی ۹۷۱۷۸۵۳۵۷۷

Email: mesbahmoen@yahoo.com

مواد و روش‌ها

رت‌های مورد مطالعه

۴۸ سر رت از نژاد اسپراگو - دالی (Sprague dawley) با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم (سن ۱۲ هفته) از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. قبل از انجام تحقیق مورد نظر با استفاده از اتوسکوپ و مشاهدات فیزیکی از سلامت گوش رت‌ها و نداشتن هر گونه ناهنجاری در گوش خارجی، پرده تیمپانیک و نداشتن اوتیت گوش میانی اطمینان حاصل شد. لازم به ذکر است که اوتیت میانی در گوش رت‌ها بسیار شایع است. سپس با استفاده از دستگاه OAE یک میانگین آستانه شنوایی به شکل نمودار DP-gram و I/O Function از تمام رت‌های مورد مطالعه ثبت شد. رت‌ها به شکل تصادفی به شش گروه تقسیم شدند: گروه ۱: گروه کنترل، گروه ۲: آمیکاسین، گروه ۳: ۰/۷۵ میلی‌گرم بر گرم آمیکاسین، گروه ۴: ۱ میلی‌گرم بر گرم آمیکاسین، گروه ۵: ۱/۲۵ میلی‌گرم بر گرم آمیکاسین، گروه ۶: ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم آمیکاسین. در تمام گروه‌ها آمیکاسین به طریق زیر جلدی در ناحیه پشت گردن تزریق شد. سپس به تمام گروه‌هایی که آمیکاسین دریافت کرده بودند به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم دیورتیک لوپ فورسیماید بعد از ۳۰ دقیقه به طریق داخل صفاقی تزریق شد.

روش ثبت DPOAEs

OAEs (otoacoustic emission) گسیل‌های صوتی است که در حالت معمول نیز توسط گوش داخلی ایجاد شده و انعکاس آن را می‌توان با قرار دادن میکروفون‌های بسیار حساس در کانال خارجی ثبت کرد. منشاء این گسیل‌های صوتی سلول‌های مویی خارجی (OHC) است؛ زیرا این سلول‌ها در پاسخ به تحریک صوتی یا الکتریکی تغییر شکل نشان داده و سبب حرکت در غشای پایه (basilar membrane) می‌شود. بنابراین OHC به‌عنوان

سبب آسیب به سیستم وستیبولار شده و برخی دیگر مثل amikacin و kanamycin اغلب سبب آسیب به حلزون شنوایی می‌شود [۴-۱]. در پستانداران ناشنوایی ناشی از دست رفتن سلول‌های مویی دایمی است چرا که در پستانداران تولید مجدد سلول مویی صورت نمی‌گیرد [۵-۷]. توانایی دستکاری ژنتیکی و وجود جهش‌های مشابه انسانی که در سیستم شنوایی موش کوچک آزمایشگاهی و رت اتفاق می‌افتد سبب شده که این گونه به‌عنوان مدل حیوانی برای مطالعات روی سیستم شنوایی استفاده شود. در حال حاضر آمینوگلیکوزیدها به‌عنوان مواد سمی برای گوش به‌طور گسترده در تحقیقات حیوانی برای بررسی فرآیندهای مرگ و میر یا تولید مجدد سلول‌های مویی و نیز مطالعات کاشت حلزون شنوایی در مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. در بسیاری از این تحقیقات هدف اصلی از تزریق آمینوگلیکوزیدها تخریب سلول‌های مویی بدون آسیب به سلول‌های گانگلیون اسپیرال و سلول‌های محافظ است. اما در هر حال تخریب سلول‌های مویی در موش کوچک آزمایشگاهی یا رت توسط آمینوگلیکوزیدها به تنهایی دارای مشکلاتی است؛ از جمله این‌که در دوزهای پایین که به‌طور مکرر باید استفاده شود، تخریب به‌خوبی ایجاد نمی‌شود و دوزهای بالا نیز کشنده است. بنابراین باید از ترکیب داروهای آمینوگلیکوزیدها و دیورتیک لوپ بدین منظور استفاده کرد [۴ و ۸-۱۵]. در این تحقیق هدف به‌دست آوردن دوز لازم amikacin به همراه مقدار مشخص از دیورتیک لوپ furosemide برای تخریب سلول‌های مویی و ایجاد یک مدل ناشنوای حیوانی برای مطالعات روی ناشنوایی ناشی از از بین رفتن سلول‌های مویی است. در مطالعه حاضر تلاش شده تا برای بررسی آثار amikacin و furosemide بر سلول‌های مویی از (Distortion product otoacoustic emission) DPOAE و میکروسکوپ نوری استفاده شود

آماده‌سازی بافتی و رنگ‌آمیزی

سه روز پس از تزریق آمیکاسین - فوروزیماید و ثبت DPOAEs از گوش رت‌ها، آن‌ها را با کتامین - زیلازین بی‌هوش کرده و از طریق پرفیوژن داخل قلبی و وارد کردن نرمال سالین و به دنبال آن یک تثبیت‌کننده شامل پارافرمالیدید تازه ۴ درصد در بافر فسفات سالین (۰/۱ مول بر لیتر، pH=7/4)، بافت‌ها از آسیب دیدن حفظ شد. سپس سر حیوان قطع و پوست و سایر بافت‌های نرم از استخوان جمجمه جدا شد و به دنبال آن به دلیل شکننده بودن استخوان تیمپانیک بولا (Tympani bulla) با احتیاط جدا شد. استخوان Tympani bulla در همان تثبیت‌کننده که در بالا ذکر شد به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور دکلسیفیه شدن آن از محلول EDTA (۰/۱ مول بر لیتر، pH=7/4) به مدت ۷۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پس از این مرحله بخش حلزون از سایر بخش‌ها جدا کرده و مراحل آگیری با الکل و قالب‌گیری با پارافین روی نمونه‌ها انجام و سپس برش‌های ۵ میکرونی تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد.

داده‌ها با استفاده از SPSS نسخه ۱۷ و آزمون‌های ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی و آزمون T زوج شده قبل از تزریق دارو و سه روز پس از تزریق دارو در سطح معنی‌داری ($p \leq 0.05$) تجزیه و تحلیل شدند.

۳- یافته‌ها

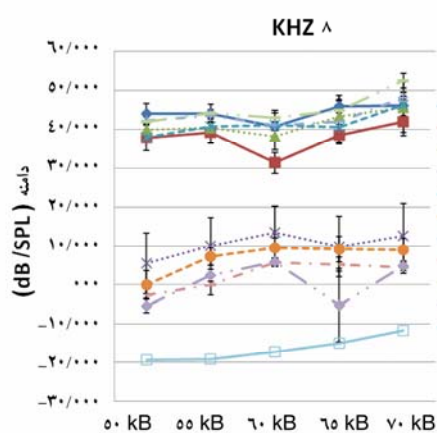
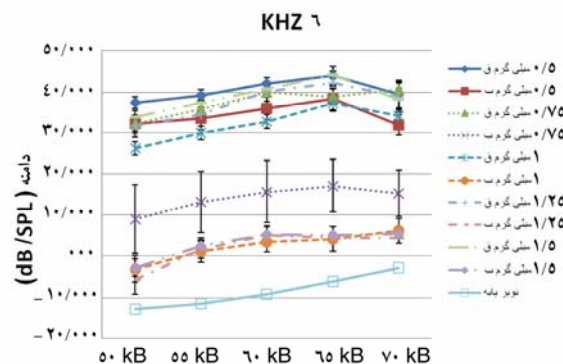
۳-۱ اندازه‌گیری DPOAEs

۳-۱-۱ DP-gram

DP-gramها (شکل ۱ a و b) فراهم‌کننده روشی برای بیان اثر ترکیب آمیکاسین - فوروزیماید روی شنوایی گوش رت در محدوده آزمون شده (۲ تا ۸ کیلو هرتز) است. میانگین آستانه شنوایی از گروه کنترل و گروه‌های دیگر قبل از تزریق دارو به دست آمده است. شکل a. ۱ DPOAEهای خروجی قبل از تزریق داروها است در حالی که شکل b. ۱ DPOAEهای

cochlear amplifier سبب افزایش حرکت غشای پایه به صورت موضعی می‌شود و OAEs محصول جانبی این فرایند است. در شکل طبیعی OAEs بسیار ضعیف است. روش ثبت DPOAEs در واقع ثبت گسیل‌های ایجاد شده و تقویت شده گوش داخلی در پاسخ به دو صوت با فرکانس‌های مشخص $f1$ و $f2$ است. این فرکانس‌های صوتی توسط پروب‌های کوچکی در کانال گوش خارجی قرار داده شده به سمت پرده تیمپانیک ارسال می‌شود و انعکاس این صوت‌ها با اندکی تأخیر توسط میکروفون تعبیه شده در همین پروب دریافت می‌شود. تمام ثبت‌ها در یک اتاق ساکت و آرام با استفاده از دستگاه استاندارد OAE (Madsen Capella, Danmark) انجام گرفت. اندازه‌گیری به روش فیرات (Firat) و همکارانش انجام شد [۱۶]. به طور خلاصه در این روش نسبت فرکانس صوت‌های ارسالی توسط دستگاه به درون گوش حیوان ($f2/f1$) ۱/۲۲ و شدت این دو صوت با یکدیگر برابر و به میزان ۶۵ دسی‌بل تنظیم شد. DPOAEs حاصل از این زوج فرکانسی که توسط میکروفون دستگاه ثبت شد در حالت $2f1-f2$ که در انسان و رت بالاترین DPOAEs را ایجاد می‌کند برای مقایسه مد نظر قرار گرفت. در نمودارهای حاصل که تحت عنوان DP-gram به آن اشاره می‌شود محدوده فرکانسی مورد ارزیابی در این مطالعه ۲ تا ۸ کیلو هرتز است. در این مطالعه نوع DPOAE I/O Function نیز در فرکانس‌های ۶ و ۸ کیلو هرتز ارزیابی شد. در این نوع ثبت در یک فرکانس خاص (در این جا ۶ یا ۸ کیلو هرتز) شدت صوت‌های ارسالی به جای ثابت بودن (۶۵ دسی بل)، به تدریج با فواصل ۵ دسی‌بل افزایش پیدا می‌کند. محدوده شدت صوت ارزیابی شده در این مطالعه ۵۰ تا ۷۰ دسی‌بل بود. با این نوع ثبت، جزئیاتی در ارتباط با افزایش دامنه پاسخ‌ها و همچنین آستانه شنوایی یعنی شدت فرکانس‌ها برای اینکه نسبت سیگنال ارسالی به نویز پایه محیط از یک مقدار تعریف شده برای دستگاه (در این جا ۶ دسی‌بل است) بالاتر باشد، مشخص می‌شود.

کیلوهرتز حاصل شده است ($p \leq 0.05$).

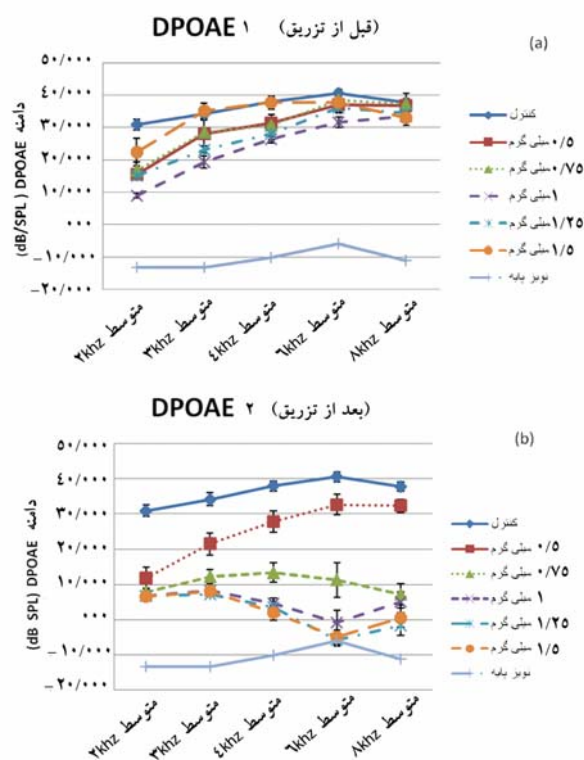


شکل ۲. نمودار DPOAE I/O functions در فرکانس‌های ۶ کیلوهرتز (بالا) و ۸ کیلوهرتز (پایین) قبل از تزریق دارو (ق) و سه روز پس از تزریق دارو (ب). هر گروه قبل و بعد آن با خودش مقایسه گردیده است. هر نقطه بیانگر میانگین \pm میانگین خطای استاندارد است.

نتایج بافتی

شکل ۳ نشان دهنده برش‌هایی از اندام کورتی و سلول‌های مویی در رت‌های طبیعی و رت‌های تحت تأثیر آمیکاسین-فوروزیماید است. تصویر ۳a و ۳b سلول‌های مویی و اندام کورتی سالم و دست نخورده را در پیچ رأسی حلزون رت طبیعی نشان می‌دهد. در حالی که در اثر آمیکاسین-فوروزیماید تقریباً تمام سلول‌های مویی خارجی (OHC) از بین رفته‌اند و تونل کورتی شکل طبیعی خود را از دست داده و سلول‌های Deiter به‌طور نا منظم دیده می‌شوند. غشای پایه فاقد پارگی است و بنابراین جدایی مایع اندولینف و پری‌لینف حفظ شده است

خروجی سه روز پس از تزریق دارو است. حداکثر تغییرات مربوط به دوزهای ۱ میلی‌گرم بر گرم تا ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم از ترکیب آمیکاسین-فوروزیماید است به‌طوری‌که متوسط تغییرات آستانه در این مقادیر برای ۲ کیلوهرتز در حدود ۲۰ دسی‌بل و برای فرکانس ۶ و ۸ کیلوهرتز در حدود ۳۵ دسی‌بل است. در مطالعه حاضر بهترین فرکانس‌های حساس به ترکیب آمیکاسین-فوروزیماید فرکانس‌ها ۶ و ۸ کیلوهرتز بود.



شکل ۱. DP-gram های ثبت شده از رت‌های مورد مطالعه قبل از تزریق دارو (a) و سه روز پس از تزریق دارو (b). هر نقطه بیانگر میانگین \pm میانگین خطای استاندارد است.

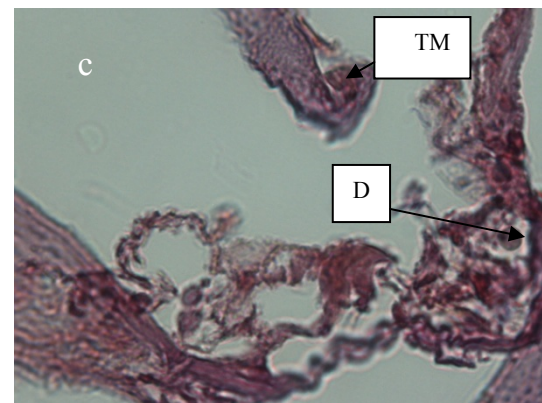
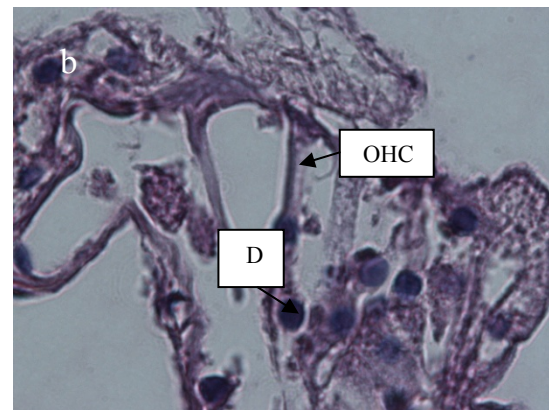
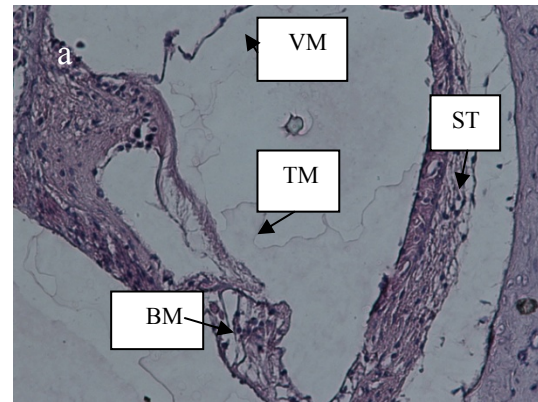
DPOAE I/O Function

شکل ۲ افزایش DPOAE ها را با افزایش در شدت اصوات اولیه داده شده (DPOAE I/O) قبل از تزریق دارو و سه روز پس از تزریق دارو روی فرکانس‌های ۶ و ۸ کیلوهرتز نشان می‌دهد. در تمام گروه‌های تیمار شده با دارو، تغییرات معنی‌داری در روند صعودی منحنی I/O Function در ۶ و ۸

بحث

روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی برای تخریب سلول‌های شنوایی وجود دارد ولی اغلب موارد از داروهای ototoxic برای این منظور استفاده می‌شود. اما روش استفاده از ترکیب یک داروی اتوتوکسیک آمینوگلیکوزیدی و یک داروی دیورتیک لوپ برای اولین بار توسط وست (west) و همکارانش مطرح شد و سپس از این روش در مطالعات مختلفی استفاده شد [۳ و ۱۹-۱۷]. در تحقیق حاضر تلاش شد تا با استفاده از داروی آمینوگلیکوزید آمیکاسین و دیورتیک لوپ فوروزیماید دوز لازم برای تخریب سریع سلول‌های مویی شنوایی رت معرفی شده و برای پی‌گیری آثار آمیکاسین - فوروزیماید روی شنوایی تصمیم گرفته شد تا از اندازه‌گیری DPOAE استفاده شود. در DP-grams پاسخ‌ها در تن‌های با شدت ثابت ($L1=L2=L3=65$ دسی‌بل) و فرکانس‌های متفاوت ثبت شد. در I/O Functions پاسخ‌ها از طریق افزایش شدت اصوات اولیه (primary tones) از ۵۰ تا ۷۰ دسی‌بل در فواصل ۵ دسی‌بل به‌دست آمد. یک پاسخ گسیل شده زمانی پذیرفته شد که در DP-gram نسبت سیگنال به noise برابر ۶ دسی‌بل یا بیشتر از آن باشد. در گروه‌های مطالعه بررسی حاضر بعد از تزریق آمیکاسین-فوروزیماید دامنه پایین‌تر (lower amplitude) را در تمام I/O Functions (۶ تا ۸ کیلوهرتز) و DP-grams نسبت به کنترل به‌دست آمد. به‌رحال بیشترین کاهش دامنه در دوزهای ۱/۲۵ میلی‌گرم بر گرم و ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم بود که تفاوت معنی‌داری با مقدار ۱ میلی‌گرم بر گرم نداشت ($p \leq 0.05$) با این تفاوت که در دوزهای بالاتر از ۱ میلی‌گرم بر گرم مرگ و میر رت‌ها زیاده‌تر بود. ضمناً آسیب جدی به ساختار آناتومیک اندام کورتی وارد شده و به‌جز غشاء بازیلار سایر ساختارها از بین می‌رفت. در دوزهای ۱ میلی‌گرم بر گرم ضمن از بین رفتن سلول‌های مویی در پیچ رآسی علاوه بر پیچ پایه بخش‌های دیگر اندام کورتی هنوز قابل مشاهده است. نتایجی مشابه یافته‌های تحقیق حاضر اما

(شکل ۳). در پیچ پایه کل سلول‌ها از بین رفته و اثری از اندام کورتی دیده نمی‌شود.



شکل ۳. دژنره شدن سلول‌های مویی (hair cells) در پاسخ به آثار اتوتوکسیک آمیکاسین-فوروزیماید. تصاویر a و b مربوط به رت‌های گروه کنترل است و تصویر c مربوط به گروه دریافت‌کننده آمیکاسین-فوروزیماید به میزان ۱ میلی‌گرم بر گرم است. در این گروه نظم سلولی مشاهده نمی‌شود و سلول‌های مویی نیز از بین رفته‌اند. BM: غشای پایه، VM: غشای دهلیزی، TM: غشای تکتوریال، D: سلول دپتر و شبکه عروقی استریا (ST: Stria vascularis).

باشد. به‌طور خلاصه پیشنهاد می‌شود که ترکیب آمیکاسین یک میلی‌گرم بر گرم و فوروزیماید می‌تواند به سرعت سبب تخریب سلول‌های مویی در حلزون رت شده و می‌توان این آسیب را از طریق DPOAE نشان داد. مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی بود که مهمترین آن محدودیت دستگاه OAE در ثبت فرکانس‌های بالاتر از ۸ کیلوهرتز بود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق به‌صورت طرح تحقیقاتی (مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..) و با حمایت مالی مرکز تحقیقات شنوایی و کاشت حلزون دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا.. به انجام رسید. بدین وسیله از اعضای محترم شورای پژوهشی و مرکز تحقیقات شنوایی تشکر و قدردانی می‌شود.

باموش کوچک آزمایشگاهی (۱۸ تا ۲۱ روز) و ترکیب کانامایسن - فوروزیماید توسط سایر محققین به‌دست آمده است [۸ و ۲۰]. علاوه بر این DPOAEs به‌عنوان معیاری برای ارزیابی آسیب‌های وارده به گوش موش کوچک آزمایشگاهی و رت در تحقیقات زیادی استفاده شده است [۲۳-۲۱]. برخلاف یافته‌های بررسی حاضر برخی از محققین بیان کرده‌اند که آمینوگلیکوزیدها فقط قادرند سلول‌های مویی را در بخش پیچ پایه از بین ببرند و سلول‌های مویی در پیچ رأسی مربوط به فرکانس‌های پایین صدمه نمی‌بینند [۳، ۱۴، ۲۴ و ۲۵]. تفاوت بین نتایج بررسی حاضر و سایر محققین که بیان می‌کند سلول‌های مویی در قسمت رأسی سالم می‌ماند، ممکن است مربوط به تفاوت نژاد موش‌ها، سن حیوان و نوع میزان داروی آمینوگلیکوزیدی و دیورتیک لوپ استفاده شده

References

1. **Rizzi MD, Hirose K.** Aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 352-7.
2. **Matthew CH.** Keynote review: The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1269-82.
3. **Guthrie OW.** Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 2008; 249: 91-6.
4. **Swan EE, Mescher MJ, Sewell WF, Tao SL, Borenstein JT.** Inner ear drug delivery for auditory applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1583-99.
5. **Breuskin I, Bodson M, Thelen N, Thiry M, Nguyen L, Belachew S, et al.** Strategies to regenerate hair cells: Identification of progenitors and critical genes. *Hear Res* 2008; 236:1-10.
6. **Xu SA, Shepherd RK, Chen Y, Clark GM.** Profound hearing loss in the cat following the single co-administration of kanamycin and ethacrynic acid. *Hear Res* 1993; 70: 205-15.
7. **Warchol ME.** Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: Differences at the levels of cells and species. *Hear Res* 2010; 273: 72-9.
8. **Taylor RR, Nevill G, Forge A.** Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008; 9: 44-64.
9. **Shibata SB, Raphael Y.** Future approaches for inner ear protection and repair. *J Commun Disord* 2010; 43: 295-310.
10. **Matsui JI, Parker MA, Ryals BM, Cotanche DA.** Regeneration and replacement in the vertebrate inner ear. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1307-12.
11. **Alam SA, Ikeda K, Kawase T, Kikuchi T, Katori Y, Watanabe K, et al.** Acute effects of combined administration of kanamycin and furosemide on the stria vascularis studied by distortion product otoacoustic emission and transmission electron microscopy. *Tohoku J Exp Med* 1998; 186:79-86.
12. **Bock GR, Yates GK, Miller JJ, Moorjani P.** Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res* 1983; 9: 255-62.

13. **Brummett RE.** Effects of antibiotic-diuretic interactions in the guinea pig model of ototoxicity. *Rev Infect Dis* 1981; 3: S216.
14. **Brummett RE.** Animal models of aminoglycoside antibiotic ototoxicity. *Rev Infect Dis* 1983; 5: S294.
15. **Gratacap B, Charachon R, Stoebner P.** Results of an ultrastructural study comparing stria vascularis with organ of Corti in guinea pigs treated with kanamycin. *Acta otolaryngol* 1985; 99: 339-42.
16. **Firat Y, Kizilay A, Ozturan O, Ekici N.** Experimental otoacoustic emission and auditory brainstem response changes by stellate ganglion blockage in rat. *Am J Otolaryngol* 2008 ; 29: 339-45.
17. **Mitchell A, Miller JM, Finger PA, Heller JW, Raphael Y, Altschuler RA.** Effects of chronic high-rate electrical stimulation on the cochlea and eighth nerve in the deafened guinea pig. *Hear Res* 1997;105: 30-43.
18. **Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL.** Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 2007; 231: 1-12.
19. **Webster M, Webster DB.** Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study. *Brain Res* 1981; 212:17-30.
20. **Hirose K, Sato E.** Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. *Hear Res* 2011; 272: 108-16.
21. **Hatzopoulos S, Petruccelli J, Laurell G, Avan P, Finesso M, Martini A.** Ototoxic effects of cisplatin in a Sprague-Dawley rat animal model as revealed by ABR and transiently evoked otoacoustic emission measurements. *Hear Res* 2002; 170: 70-82.
22. **Khvoles R, Freeman S, Sohmer H.** Transient evoked otoacoustic emissions can be recorded in the rat. *Hear Res* 1996; 97:120-6.
23. **Pouyatos B, Campo P, Lataye R.** Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hear Res* 2002; 165: 156-64.
24. **Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J.** Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res* 2001; 158:165-78.
25. **Henry KR, Chole RA, McGinn MD, Frush DP.** Increased ototoxicity in both young and old mice. *Arch Otolaryngol*1981; 107: 92.