

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ
OLUŞTURULAN YENİDOĞAN SIÇANLARDA
İŞİTSEL FONKSİYON KAYBI VE ERİTROPOETİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR YÜKSEL OLGUN
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. SEMİH SÜTAY**

İZMİR -2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerini ve deneyimlerini bizlere aktaran, tez konumun seçilmesi ve tez çalışmamın yürütülmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sayın Semih Sütay'a,

Bilgi ve deneyimleriyle yetişmemde büyük emeği ve katkıları olan Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Ahmet Ömer İkiz'e,

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaştan, desteğini her zaman arkamda hissettiğim Prof. Dr. Sayın Enis Alpin Güneri'ye,

Her zaman örnek alacağım, yetişmemde büyük emekleri olan hocalarım Prof. Dr. Sayın Kerim Ceryan' a, Prof. Dr. Sayın Ataman Güneri'ye, Prof. Dr. Sayın Bülent Şerbetçioğlu' na, Doç. Dr. Sayın Taner Kemal Erdağ' a, Doç. Dr. Sayın Cenk Ecevit'e,

Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgilerini ve deneyimlerini bana aktaran ve hiçbir zaman manevi desteğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Sayın Günay Kırkım' a,

İhtisasa başladığım ilk günden itibaren önce bir ağabey daha sonra da hocam olarak yetişmeme büyük emek veren Öğr.Gör. Sayın Ersoy Doğan' a

Tez çalışmalarım süresince her an desteğini gördüğüm deney hayvanları laboratuvarı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Osman Yılmaz' a ve tez çalışmam süresince hiç bıkmadan bana yardım eden sevgili arkadaşım Uzm. Biyolog Sayın Efsun Kolatan' a, tezimin histolojik ve elektron mikroskopik incelemelerinde benden katkılarını esirgemeyen ve her an destek olan Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç Dr. Sayın Alper Bağrıyanık' a, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sayın Müge Kiray' a, model oluşturulması sırasında anestezi konusunda yardımlarını gördüğüm Prof. Dr.Sayın Necati Gökmen' e, model oluşturulması konusunda deneyimlerini aktaran Prof Dr Sayın Abdullah Kumral'a ve tezimin istatistiksel değerlendirilmelerinde desteğini esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Hülya Ellidokuz' a,

Zorlu ve bir o kadar da keyifli geçen uzmanlık eğitimim süresince iyi ve kötü anlarımı paylaştığım asistan arkadaşlarıma; asistanlığım boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm odyoloji bölümü çalışanlarına, servis, poliklinik ve ameliyathane hemşire ve personeline en içten duygularla teşekkür ederim.

Asistanlık sürecinde sonsuz özveri, sevgi ve desteği nedeni ile sevgili eşime,

Bugüne dek sevgi, şefkat ve özverileri ile yetişmemde büyük emekleri olan başta sevgili anne ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Dr.Yüksel Olgun

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

İzmir-2012

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	3
Şekiller Dizini.....	4
Resimler Dizini.....	5
Tablolar Dizini.....	6
Kısaltmalar.....	7
Özet.....	8
Summary.....	10
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	12
2. GENEL BİLGİLER.....	15
2.1 Hipoksik iskemik ensefalopati.....	15
2.2 Koklea anatomisi.....	17
2.3 Santral işitme yollarının nöroanatomisi.....	23
2.4 İşitsel beyinsapı yanıtları.....	28
2.5 Eritropoetin.....	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 Çalışma grupları.....	37
3.2 Hipoksik iskemik beyin hasarının oluşturulması.....	37
3.3 İntraperitoneal eritropoetin uygulanması.....	38
3.4 İşitmenin değerlendirilmesi.....	39
3.5 Histolojik değerlendirme.....	41
3.6 İstatistiksel analiz.....	45
3.7 Çalışmanın metodu.....	46
4.BULGULAR.....	48
4.1 ABR ölçüm değerleri.....	48
4.2 Histolojik inceleme sonuçları.....	60
5.TARTIŞMA.....	73
6.SONUÇLAR.....	82
7.KAYNAKLAR.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Apoptoz yolakları.....	17
Şekil 2: Koklea	18
Şekil 3: Koklea kesiti.....	19
Şekil 4: Korti organı.....	20
Şekil 5: Santral işitme yolları.....	23
Şekil 6 : Santral işitme yolları.....	26
Şekil 7 : Primer işitsel korteks.....	27
Şekil 8: Rat ABR trasesi.....	29
Şekil 9: Nöral hücrede EPO sinyal yolları.....	33
Şekil 10: Eritropoetinin nöroprotektif etki mekanizmaları.....	34
Şekil 11: Kontrol grubu sağ ve sol kulak klik ABR örneği.....	48
Şekil 12: Kontrol grubu sağ kulak 6 ve 8 Khz ABR örneği.....	48
Şekil 13: Kontrol grubu sol kulak 6 kHz ve 8kHz ABR örneği	49
Şekil 14: Sham grubu klik ABR örneği.....	50
Şekil 15: Sham grubu sağ kulak 6 kHz ve 8 kHz ABR örneği.....	50
Şekil 16: Sham grubu sol kulak 6 kHz ve 8 kHz ABR örneği.....	51
Şekil 17: HİE grubu sağ ve sol kulak klik ABR örneği	53
Şekil 18: HİE grubu sağ kulak 6 kHz ve 8 kHz ABR örneği.....	53
Şekil 19: HİE grubu sol kulak 6 Khz ABR örneği	54
Şekil 20:HİE grubu sol kulak 8 kHz ABR örneği	54
Şekil 21 :HİE+EPO grubu sağ ve sol kulak klik ABR örneği	56
Şekil 22: HİE+EPO grubu 6 kHz sağ ve sol kulak ABR ölçümü.....	56
Şekil 23: HİE +EPO grubu sağ ve sol kulak 8 kHz ABR örneği	57
Şekil 24: Tüm gruplarda apoptotik hücre oranları.....	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Wistar Albino sıçan yavruları.....	36
Resim 2: Sol karotis arterin bağlanması	38
Resim 3: ABR elektrotlarının yerleştirilmesi.....	39
Resim 4: Beyin ve beyin sapı dokularının çıkarılması.....	41
Resim 5: Beyin ve temporal kemiklerin makroskopik görünümü.....	42
Resim 6: Kontrol ve Sham grubu beyinsapı kesiti (krezil violet boyaması)	60
Resim 7 : HİE grubu beyinsapı kesiti (krezil violet boyaması).....	60
Resim 8 : HİE+EPO grubu beyinsapı kesiti (krezil violet boyaması).....	61
Resim 9 : Kontrol ve Sham grubu beyinsapı kesiti(TUNEL boyama).....	61
Resim10 : HİE grubu beyinsapı kesiti(TUNEL boyama).....	62
Resim11: HİE +EPO grubu beyinsapı kesiti(TUNEL boyama).....	62
Resim 12: Kontrol ve Sham grubu beyinsapı kesiti (Kaspaz 3 boyama).....	63
Resim 13: HİE grubu beyinsapı kesiti(Kaspaz 3 boyama).....	63
Resim14: HİE+EPO grubu beyinsapı kesiti(Kaspaz 3 boyama).....	64
Resim 15: Tüm grupların beyinsapı histolojik görüntüleri.....	65
Resim 16: Kontrol ve sham grubu tüylü hücrelerin elektron mikroskopik görüntüleri	67
Resim 17: HİE ve HİE+EPO grubu tüylü hücrelerin elektron mikroskopik görüntüleri	69
Resim 18: Kontrol ve Sham grubu Spiral ganglion hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri.....	69
Resim 19: HİE ve HİE+EPO grubu spiral ganglion hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri.....	70
Resim 20: Kontrol ve Sham grubu temporal lob elektron mikroskopik görüntüleri...	71
Resim 21:HİE ve HİE+EPO grubu temporal lob elektron mikroskopik görüntüleri	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: ABR testinde kullanılan klik uyaran ve kayıt parametreleri.....	40
Tablo 2: ABR testinde kullanılan 6 kHz, 8kHz ton burst uyaran ve kayıt parametreleri.....	40
Tablo 3: Çalışma grupları.....	46
Tablo 4: Kontrol grubu ABR ölçüm değerleri.....	48
Tablo 5: Sham grubu ABR ölçüm değerleri.....	49
Tablo 6: HİE grubu ABR ölçüm değerleri.....	52
Tablo 7: HİE +EPO grubu ABR ölçüm değerleri.....	55
Tablo 8: Sol kulak ABR değerlerinin istatistiksel analizi.....	58
Tablo 9: Sağ kulak ABR değerlerinin istatistiksel analizi.....	59

KISALTMALAR

Hipoksik iskemik ensefalopati: HİE

İşitsel beyinsapı yanıtları (Auditory Brainstem Responses): ABR

Eritropoetin: EPO

Platelet aktive edici faktör: PAF

N-metil-D-aspartat: NMDA

Nitrik oksid sentetaz : NOS

Nitrik oksid : NO

Apoptoz indükleyici faktör: AIF

High temperature requirement serin protease : HTR/A2

Autocatalytic Activation of Procaspase: APAF -1

Eritropoetin reseptörleri: EPO-R

Rekombinan eritropoetin: rhEPO

Food and Drug Association: FDA

Reaktif oksijen türleri: ROS

Single Photon Emission Computerised Tomography: SPECT

Vascular Endotelial Growth Factor: VEGF

ÖZET

HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ OLUŞTURULAN YENİDOĞAN SIÇANLARDA İŞİTSEL FONKSİYON KAYBI VE ERİTROPOETİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Yenidoğan sıçanlarda hipoksik iskeminin işitme üzerine etkisi ve rekombinan eritropoetin koruyucu etkinliğinin araştırılması

Gereç ve Yöntem: Postnatal yedinci günde Wistar albino cinsi 28 adet yavru sıçan dört grup halinde çalışmaya alınmıştır. Birinci grupta (n=8) sadece intraperitoneal serum fizyolojik uygulanmış, ikinci gruptaki deneklere (n=5) hipoksik-iskemi uygulanmadan sadece orta hat boyun insizyonu yapılmış ve intraperitoneal serum fizyolojik verilmiştir. Üçüncü gruptaki (n=8) yavrulara hipoksik iskemi oluşturulup, intraperitoneal serum fizyolojik uygulanmış, dördüncü gruba (n=7) ise hipoksik iskemi sonrasında 1000Ü/kg rekombinan eritropoetin intraperitoneal yolla verilmiştir. Hipoksik iskemik ensefalopati için cerrahi işlem olarak sol common karotid arter bağlanarak iskemi oluşturulmuş, daha sonra üçüncü ve dördüncü gruptaki denekler 2,5 saat süre ile %92 saf nitrojen,%8 oksijen içeren bir karışımı solumuşlardır. Çalışmanın yedinci haftasında grupların klik uyaran ve 6 kHz, 8 kHz tone burst uyaran verilerek ABR kayıtları elde edilmiş ve sakrifikasyon yapılmıştır. Beyin sapı, sağ ve sol temporal lob ve koklea yapıları ışık mikroskobu, TUNEL, kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yöntemleri ve elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

Bulgular: Hipoksik iskemi ensefalopati grubunda ABR kayıtlarında işitmenin tüm hayvanlarda etkilendiği ve etkilenmenin bazı deneklerde iki taraflı olduğu görülmüştür. Hipoksik iskemi ile birlikte rekombinan eritropoetin uygulanan grupta ABR kayıtlarında işitmenin normal değerlerde olduğu ve iki grup arasında istatistiksel fark olduğu saptanmıştır. Histopatolojik değerlendirmelerde; hipoksik iskeminin beyin sapı nöronlarında apoptotik değişikliklere neden olduğu ışık mikroskobu ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş, Corti organı, spiral ganglion hücreleri ve temporal lob elektron mikroskopik incelemelerinde ise hücrelerde belirgin apoptotik değişiklikler dikkati çekmiştir. Hipoksik iskemi ile eşzamanlı rekombinan eritropoetin uygulamasının apoptotik değişiklikleri önemli ölçüde engellediği saptanmıştır.

Sonuç: Hipoksik iskemik ensefalopati işitme sisteminde apoptotik yolakları tetikleyerek işitme kaybına yol açmaktadır. Bu etkilenme rekombinan eritropoetin uygulanması ile nlenebilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hipoksik iskemik ensefalopati, yenidoğan işitme kaybı, koklea, eritropoetin

SUMMARY

INVESTIGATION OF HEARING LOSS AND THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN IN THE NEWBORN RATS WITH HYPOXIC- ISCHEMIA INDUCED ENCEPHALOPATHY

Objective: To investigate the effect of hypoxic-ischemia on the hearing and otoprotective effect of recombinant erythropoietin.

Materials and Methods: Twenty eight seven-day Wistar albino rat pups were divided into four groups: Control group (n=8), sham group (n=5), hypoxic- ischemic encephalopathy group (n=8), recombinant erythropoietin treated group (n=7). Control group were injected intraperitoneal serum physiologic, sham group had only neck incision without carotid ligation and intraperitoneal serum physiologic, Hypoxic ischemic encephalopathy group and recombinant erythropoietin treated group were subjected to left common carotid artery ligation followed by 2.5 hour hypoxic exposure to a mixture of 8% oxygen ,92% pure nitrogen. Hypoxic ischemic encephalopathy group were injected intraperitoneal serum physiologic and recombinant erythropoietin treated group received erythropoietin 1000units/kg within the same volume as serum physiologic. At seventh week hearing of the animals were evaluated by click ABR, 6 kHz and 8 kHz tone burst stimuli. Animals sacrificed and both temporal lobes, cochleas and brainstems of the animals were collected. Tissue samples were evaluated with light microscopy, immunohistochemical studies such as TUNEL and caspase-3 stainings and electron microscopy.

Results: Hearing was deteriorated in hypoxic-ischemic encephalopathy group animals, in some of the rats hearing loss were bilateral. In recombinant erythropoietin treated group ; ABR values were close to controls. Difference between hypoxic ischemic encephalopathy group and erythropoietin treated group were statistically significant ($p < 0.05$). Hypoxic ischemic encephalopathy is found to cause apoptotic changes within brainstem shown by light microscopy and immunohistochemical methods. Apoptotic changes also were found within the organ of Corti, spiral ganglion cells and neurons of temporal lobe by electron microscopic investigation. In recombinant erythropoietin treated group most of those apoptotic changes were found to be decreased.

Conclusion: Hypoxic-ischemic encephalopathy leads to hearing loss by inducing apoptotic pathways of the hearing system and recombinant erythropoietin is found to prevent those effects.

Key words: Hypoxic-ischemic encephalopathy, newborn hearing loss, cochlea, erythropoietin

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksi ve iskemiye bağlı santral sistemi hasarlanması yenidoğan döneminin en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. Bu olayda prematürite önemli bir risk faktörü olmakla birlikte terminde doğan bebeklerde de öncelikle plasenta ve kordon sorunları, uzamış doğum, hiperbilirubinemi gibi nedenlere bağlı olarak 1-6/1000 oranında hipoksik iskemik ensefalopati (H E) görüldüğü bildirilmektedir (1). Etkilenmiş bebeklerin %15-20'si postnatal dönemde kaybedilmekte, %25'inde ise hafif nöral gelişim bozukluklarından ciddi serebral palsiye kadar değişen nörolojik sekeller görülebilmektedir (2). Sekel gelişen bu olgularda işitme kaybı, görme bozuklukları, tanıma-algılama bozuklukları, geç öğrenme, dil bozuklukları gibi çocuğun entellektüel gelişimini etkileyen ve yaşamın erken döneminde rehabilite edilmeyecek olursa ciddi iletişim bozukluklarına yol açabilecek patolojiler ortaya çıkabilir (3,4).

 skemik hasarlanma ve geç kognitif performans ilişkisi prematüre infantlarda görüntüleme yöntemleri ile de gösterilmiştir. Magnetik rezonans görüntüleme ile prematürelerde periventriküler lökomalazi ile heceleme ve okuma problemleri arasında ilişki olduğu ileri s r lm ştir (5). Yanısıra, ventrikül, corpus callosum, beyaz cevherin diğer bölgelerinin hipoksiye bağlı oluşan patolojileri ile okuma problemleri arasında da ilişki olduğu vurgulanmıştır (6).

Hipoksik iskemi sonucunda kan akımı azalmakta ve buna bağlı olarak beyne oksijen transportu olamamaktadır. Bu durum normal enerji metabolizmasında bozulmalara neden olmakta, sonuçta ATP düzeyleri düşmekte, hücre membranında depolarizasyon gelişmekte, eksitatör aminoasit birikimi olmakta, intrasellüler kalsiyum artmakta, serbest radikaller birikmekte, inflamasyon oluşmakta, kaspaz ve sitokinler yanı sıra fosfolipazlar, proteazlar ve nükleazlar aktive olmaktadır. Tüm bu olayların sonucunda hücrede nekroz ve/veya apoptoz

gelişmektedir (7). Hipoksik iskemiye bağlı bu etkilerin santral sinir sistemi yanı sıra işitme organı ve yollarında da olması beklenmektedir.

Hipoksik iskemik ensefalopati ile işitme kaybının birlikteliği 1960'lı yıllardan beri üzerinde durulan bir konudur. Başlangıçta bazı araştırmacılar işitme kaybının santral işitme yollarının tutulmasının bir sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir (8). Buna karşılık daha sonraları postmortem bulgular göz önüne olarak periferik işitmenin de etkilenmiş olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların sonucunda perinatal asfiksini iç ve dış tüylü hücrelerde, destek hücrelerinde, stria vasküleriste ve spiral ganglion hücrelerinde apoptoz yaptığını, hatta bu değişikliklerin beyin sapı ve kortekste hücre hasarının gelişmesinden önce ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (1, 3, 8, 9, 10). Perinatal hipoksik ensefalopatide ortaya çıkabilecek işitme kaybının çoğu zaman asfiksini şiddeti ile bağlantılı olduğu da bildirilmiştir (3).

Perinatal ve postnatal hipoksi ve iskeminin yenidoğanlarda işitsel beyinsapı cevapları (ABR) yanıtlarını etkilediği ve bu testin asfiksini ciddiyetini ortaya koymada ve izlemde non invaziv bir yöntem olarak değer taşıyabileceği öne sürülmüştür. Perinatal asfiksiye maruz kalmış çocuklarda yapılan bir klinik çalışmada ABR yanıtları ile nörolojik gelişim arasında bir paralellik kurulabileceği ve bu testin asfiksi geçirenlerde işitme ve nörolojik gelişimin izlenmesinde değer taşıyabileceği öne sürülmüştür (11).

Neonatal dönemdeki ratlarda HİE'ye bağlı santral sinir sistemi etkilenmesi olduğu ve işitsel işleme / hafıza problemleri ortaya çıktığı bildirilmiş (12, 13) ve eritropoetin (EPO) uygulanmasından sonra bu bulgulara düzelmeler olduğu beyin dokusunda immunhistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Yanı sıra in vitro çalışmalarda koklear hücre kültürlerinde, hipoksik iskemiye bağlı olarak kokleadaki tüylü hücrelerde, özellikle kokleanın bazal kıvrımında olmak üzere belirgin hasar olduğunu ve EPO'nun hipoksik iskemiye bağlı apoptozis ve nekrozu önlediği gösterilmiştir (14, 15).

Ancak EPO kullanımının HİE'ye bağılı işitsel bozukluklar üzerindeki etkisini gösteren kombine elektrofizyolojik ve elektron mikroskopik in vivo deneysel bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda HİE modeli oluşturmak, HİE'nine işitmeye etkisini odyolojik, immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlerle ortaya koymak ve yine aynı yöntemlerle EPO'nun işitme ve işitsel yollar üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

2.GENEL BİLGİLER

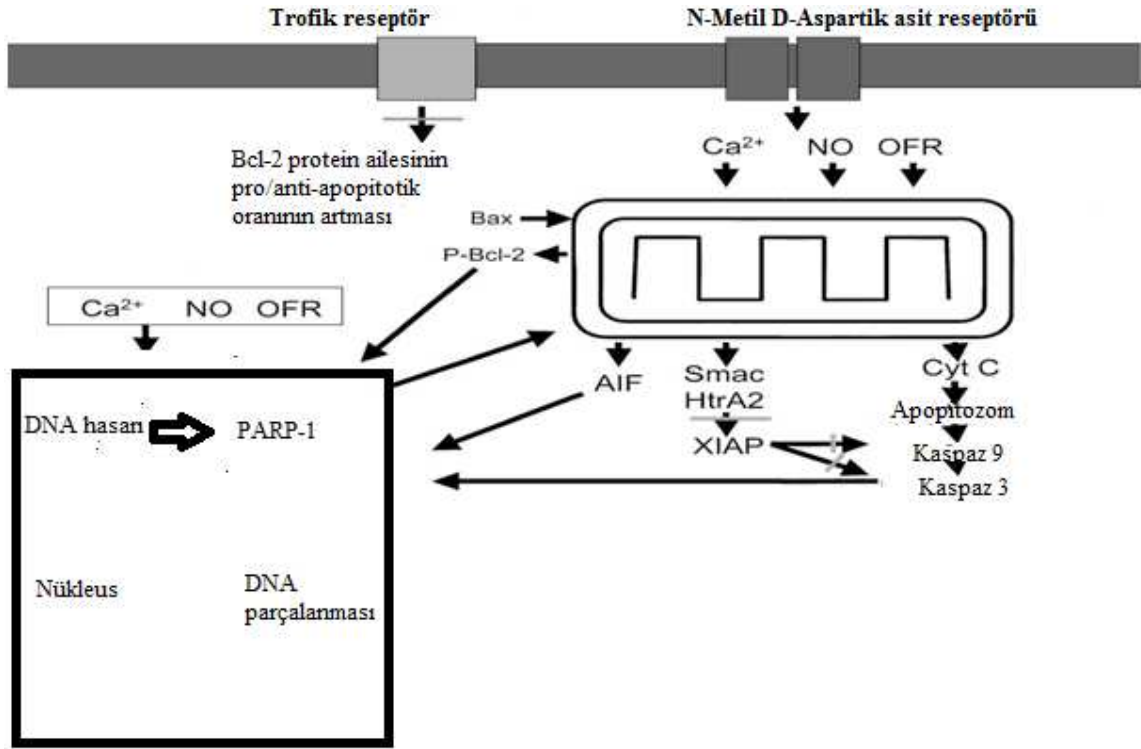
2.1 Hipoksik İskemik Ensefalopati

Hipoksi; dokulardaki parsiyel oksijen azlığını, iskemi hücre ve organların normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan kan akımındaki azalmayı ifade eder. Asfiksi ise Yunanca ‘nabızsızlık’ kelimesinden köken alır ve hipoksi ve iskemi sonucu doku düzeyinde olan asidozu tanımlar. HİE; asfiksiye bağlı gelişen akut veya subakut beyin hasarı ile karakterize klinik tablodur. HİE prenatal, natal ve postnatal faktörlerin etkisiyle oluşabilir. Genel insidans 1-6/1000 canlı doğumdur (1). Ülkemizde ise bu oran 2,3/1000 canlı doğum olarak saptanmıştır. Hastane dışı doğumların sık olduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ise bu oran %14,5’a yükselmektedir (16). Tıp alanındaki tüm gelişmelere rağmen HİE’ye bağlı mortalite (%20-50) ve morbidite (% 4-57) oranında bildirilmektedir (2, 16).

Hipoksik iskemik ensefalopatiye bağlı hücre ölümü temel olarak üç mekanizmayla olmaktadır:

- 1- Primer nöronal hasar: Hipoksik-iskemik olay süresince intrasellüler enerji azalır. Etkilenen hücrelerde enerji tükenmesi membran pompa yetersizliğine neden olur. Hücre içine su girer, sitotoksik serebral ödem ve primer nöronal ölüm oluşur. Resüsitasyonu takiben sağlam kalan nöronlarda da aynı durum görülebilir. Sağlam kalan nöronlar; hücre içine kalsiyum (Ca^{++}) girişi ve postiskemik serebrovasküler disfonksiyon nedeniyle ağır hasarlara karşı daha hassastır (17-22).
- 2- Postiskemik serebrovasküler disfonksiyon: Resüsitasyon sonrası oluşan reperfüzyon ve reoksijenizasyon sonucunda pekçok mekanizma serebrovasküler disfonksiyonun gelişmesinde rol oynar. Burada nötrofiller, Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) ve Eikosanoidler ve serbest radikaller önemli rol oynarlar. Bütün bunlar daha çok damar endoteli ve permeabilitesi üzerine etki ederek serebrovasküler disfonksiyona neden olurlar. Özellikle reperfüzyon sırasında serbest yağ asitleri ve prostaglandin metabolizmasından oluşan serbest radikaller direkt olarak damarlara etkiyle kan beyin bariyerinin permeabilitesinin artmasına, indirekt olarak da, nötrofil aktivasyonu ve PAF yapımının stimülasyonuna yol açarlar. Serebrovasküler otoregülasyondaki bu anormallikler sağ kalan nöronların iyileşme yeteneklerini tehlikeye sokarak sekonder nöronal hasara yol açar (17-22).

- 3- Sekonder nöronal hasar ve apopitoz: Asfiksi sonrası dönemde nöron ölümü hipoksik iskemik olayın direkt sonucu olarak nekrozla başlayabileceği gibi apoptoz sonucu da oluşabilir. Nekroz hücrelerde aşırı hasarlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan patolojik hücre ölümüdür. Apoptoz ise dokuların canlılığını sürdürebilmelerine yönelik fizyolojik bir ölüm sürecidir. Apoptozda karmaşık ve iyi anlaşılamayan hücreler arası sinyal sistemindeki bozukluğa bağlı gelişen programlı hücre ölümü söz konusudur. Sekonder nöron ölümü muhtemelen birbirleriyle ilişkili bu iki olayın birlikte sonucudur. Reoksijenizasyon ve reperfüzyon ile oluşan serbest radikallerin etkisi ile nöronlardan serbestleşen glutamat (hızlı uyaran nörotransmitter-eksitator nörotransmitter)’in etkisi ile Ca^{++} ‘un hücre içerisine girişi uyarılır. Glutamat postsinaptik iyon kanallarındaki N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri üzerinden etki eder. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu nöronal Nitrik oksid sentetaz (NOS) ile Nitrik oksid (NO) yapımına yol açar. NO’ da membranlardan geçerek glutamat salınımının uyarılmasına da yol açar. NO ayrıca moleküler oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid oksidasyonuna yol açan süperoksit, peroksit ve peroksinitrit gibi serbest oksijen radikallerini oluşturur ki, bunlar da apoptoz’un potansiyel indükleyicisidirler (17-22). Bu aşamadan sonra mitokondriler proapoptotik proteinlerin salınımına yol açarlar. Bunlar sitokrom C, apoptoz-indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G, “high temperature requirement serine protease” (Htr/A2) gibi apoptotik proteinlerdir (20, 21). Ayrıca mitokondrilerde bu proteinlerin salınımlarının düzenlenmesinde Bax, Bad, Bid gibi Bcl 2 gen ailesi üyelerinin de etkili olduğu bilinmektedir (20,23-25). Buna karşılık survivin gibi proteinler de programlanmış hücre ölümünü engelleyici olarak çalışır, agonist ve antagonist etkilerin belirli bir dengeye oturması ile homeostaz sağlanır (24). Mitokondrilerden salınan sitokrom-C, ‘autocatalytic activation of procaspase’(APAF-1), Adenosin difosfat (ADP) ve prokaspas-9 ve diğer yandan da AIF kaspaz bağımlı yolak üzerinden apoptozu indüklerler. Kaspaz-3 bu yolağın son ürünü olup programlanmış hücre ölümünün kanıtıdır. Bir başka deyişle Kaspaz-3’ün dokuda gösterilmesi apoptozun kanıtıdır (20, 26) (Şekil 1).



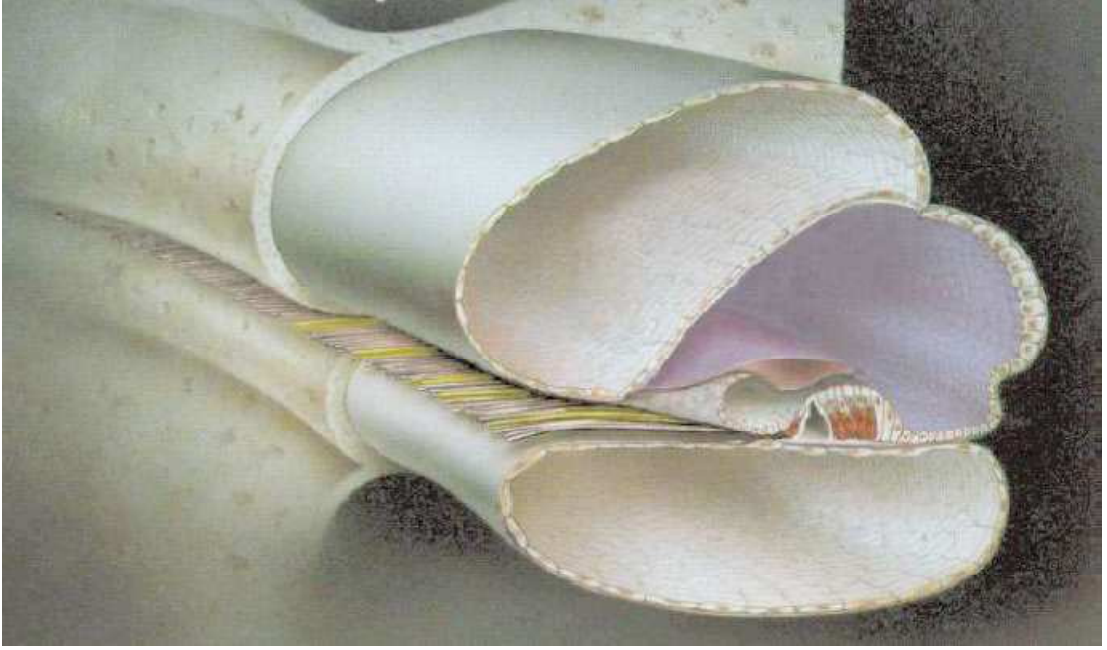
Şekil 1. Apoptoz yollakları

Yenidoğan HİE’de bu karmaşık mekanizmaların devreye girmesi hasarın yaygınlığına bağlı olarak mortaliteye ya da mikrosefali, motor mental retardasyon, işitme kaybı, körlük, epilepsi ve serebral palsi gibi ağır klinik tablolara yol açabilmektedir (14, 27, 28).

2.2 Koklea Anatomisi

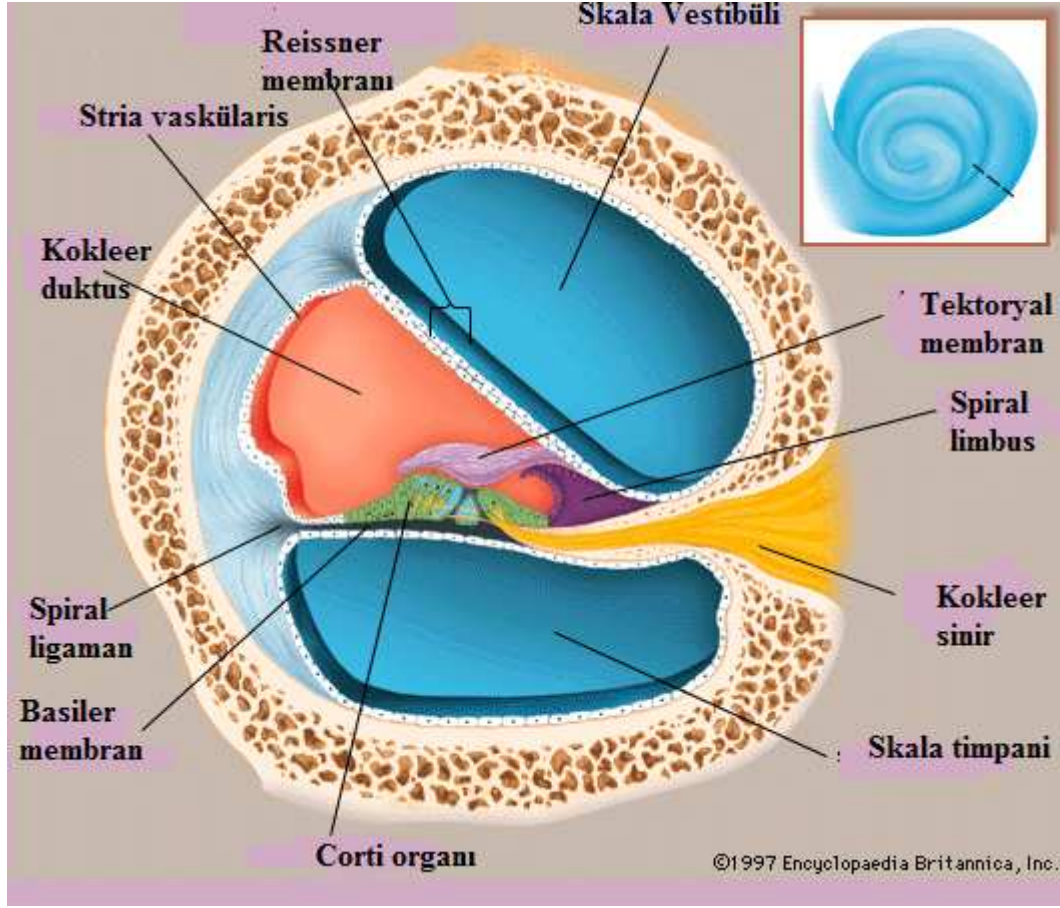
Petröz kemiğin derinlerine yerleşmiş olan iç kulak, işitme ve denge organlarını içerir, zar ve kemik labirent olmak üzere iki kısımdan oluşur. Labirentin işitme ve denge ile ilgili iki kısımdan oluşur. İşitme ile kısmını koklea oluşturur (29-31).

Koklea, yaklaşık 35mm uzunluğunda olup, modiolus etrafında 2 tam 3/4 kez dönüş yapar ve işitmenin reseptör organını taşır. Kokleanın orta kulakla bağlantısını promontoryumun arkasında bulunan iki kemik pencere sağlar. Oval pencere, yukarıda ve sagittal planda yerleşmiş olup, stapes tabanını içerir. Yuvarlak (koklear) pencere ise transvers planda, aşağıda yerleşmiştir ve sekonder timpanik membranla örtülüdür .



Şekil 2. Üstte skala vestibüli,ortada Corti organını da içinde yer aldığı skala media ve en altta skala timpani görülmektedir.(www.ci-centrum.de)

Koklea; modiolus denilen ve otik bir kapsüle bir septum aracılığıyla tespit edilmiş olan santral bir kemik spiralle desteklenir. Modiolus seviyesinden alınan bir kesitte koklea üç bölüme ayrılır (Şekil 2). Skala vestibuli, oval pencereden başlar ve koklear apekse uzanır, helikotrema vasıtasıyla skala timpani ile ilişkilidir. Skala timpani, helikotrema aracılığıyla skala vestibuli ile koklear apekse devamlılık gösteren ve kokleanın bazal kıvrımı civarında yuvarlak pencere membranına kadar uzanan bir bölmedir. Bu iki perilenfatik skala arasında kalan ve endolenf içeren bölüm ise skala media (duktus koklearis) dır. Skala media üçgen şeklinde, bir fibröz doku bandı aracılığıyla kemiksi spiral laminadaki dar bir tutunma yerinden otik kapsülün dışındaki geniş tutunma yerine doğru uzanan spiral bir ligamandır (Şekil 3).



Şekil 3: Koklea kesitinde spiral ligaman, baziler membran ve Reissner membranı ile birbirinden ayrılan üç boşluk skala mediada yer alan Corti organı görülmektedir.

Reissner membranı, skala media ile skala vestibüliyi birbirinden ayırır. Baziler membran ise skala media ve skala timpaniyi birbirinden ayırır (Şekil 3).

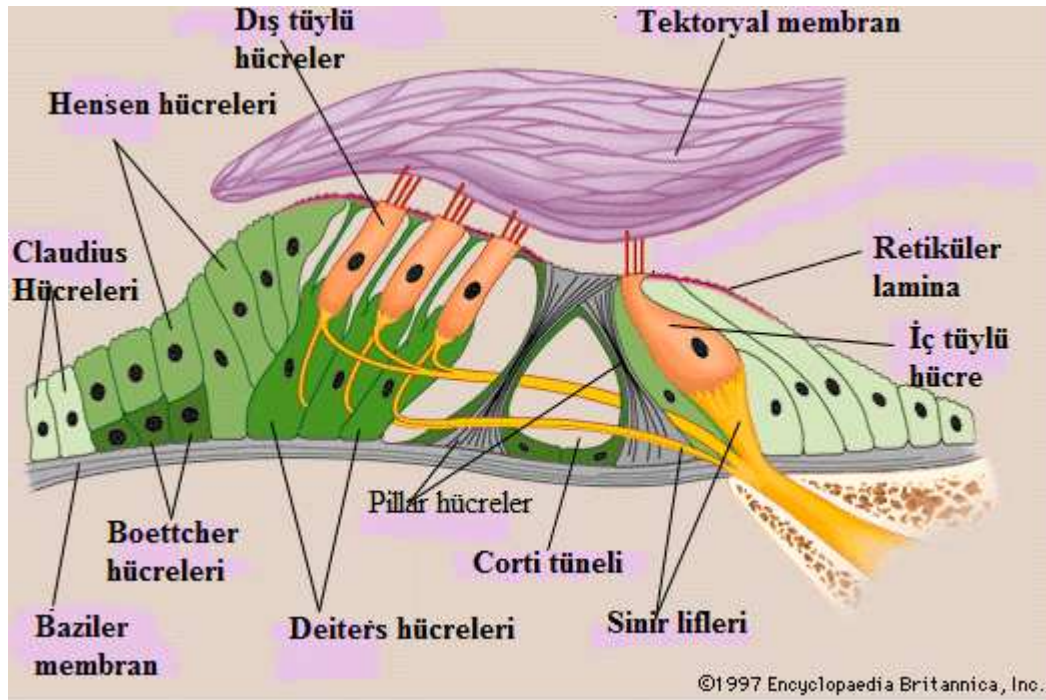
Kemiksi spiral lamina çengele benzer bir şekilde sonlanarak hamulus adını alır ve modiolus tepesiyle birlikte helikotrema denen yuvarlak açıklıkta skala vestibüli ve skala timpani birleşir. Skala timpani, proksimalde kör bir kese şeklinde sonlanır. Burası yuvarlak pencerenin açıldığı yerdir. Skala vestibüli direkt olarak vestibüle açılır. Aquaduktus koklea denilen kemiksi bir geçiş, skala timpaninin sonlanma noktasıyla subaraknoid boşluğu birleştirir ve BOS ile perilemf arasında madde değişimini sağlayan trabeküler bir bağ dokusu oluşturur.

VIII. sinire ait liflerin hücre gövdelerinin yer aldığı spiral ganglion, Rosenthal kanalı içine yerleşmiştir ve osseöz spiral lamina ve modiolus arasında koklear duktus boyunca uzanır. Baziler membran 2.5 dönüş yaptığı halde spiral ganglion sadece 1.5 dönüşü tamamlar. Böylece apikal kısımdan gelen periferik uzantılar, daha aşağıda yerleşmiş ganglion hücrelerine ulaşırlar. Spiral gangliondaki bipolar nöronlar, koklear reseptörleri santral sinir sistemine bağlar. Bipolar nöronlar bir uçları ile habenula perforata denen açıklıklardan sensöriyel epitele ulaşırken, diğer uçları ile de fasikül halinde gruplanmış aksonlar olarak Rosenthal kanalından çıkarlar ve VIII'inci sinirin akustik komponentini oluştururlar. Spiral ganglion, bu afferent lifler dışında superior olivar kompleksteki nükleustan uzanan efferent nöronlara ait aksonları da içerir.

Koklear duktus, Reissner membranı, stria vaskülaris, baziler membran ve Corti organı olmak üzere histolojik olarak birbirinden farklı dört yapı içerir. Reissner membranı, spiral ligamentten spiral limbuse uzanırken koklear duktusun üst çatısını oluşturur. Baziler membran, osseöz spiral ligamentin alt kısmından spiral ligamente horizontal olarak uzanarak koklear duktusu skala timpaniden ayırır ve üzerinde Corti organını barındırır. Baziler membranın genişliği kokleanın bazal kıvrımdan apeksine doğru artar. Stria vaskülaris, koklear duktusun lateral duvarını yapar ve yoğun bir kapiller ağ ile üç sıra epitel hücre tabakasından oluşur. Stria vaskülarisin duktus koklearisin lümenine bakan ucunda en iç kısımda endolenfe temas eden koyu (dark) hücreleri yerleşmiştir. Diğer iki tabaka intermediate ve bazal tabakadır. Intermediate tabakadaki hücreler fagositik aktivite gösterirler ve karbonik anhidraz enzimi içerdikleri bildirilmiştir (32). Stria vaskülaris, endolenfin iyonik bileşiminin aktif olarak devamını sağlar. Bu fonksiyonda, sodyum-potasyum ATP'az pompası ile skala mediadan sodyumu alıp potasyum veren koyu hücre tabakası rol oynar.

Baziler membran üzerinde bulunan Corti organında oluşan elektriksel aktivite, modiolus içinde bulunan spiral gangliondaki sinir hücrelerinin dendritleri tarafından algılanır. Corti organı, işitmenin reseptör organıdır. Sensöriyel ve destek hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücreler, baziler membran tarafından desteklenir ve üzerinde tektoryal membran bulunur. Corti organının primer fonksiyonu, baziler membranın mekanik titreşimlerini beyine iletmek üzere nöral impulslara çevirmektir. Corti organı birçok yapıdan oluşur. Bunları dıştan içe doğru; Hensen hücreleri, dış Corti tüneli, dış tüylü hücreler, Deiters hücreleri, Nuel aralıkları,

dış sütun (pillar) hücreleri, iç tüylü hücreler, iç parmaksı hücreler, iç sınır hücreleridir (29-31) (Şekil 4).



Şekil 4 : Corti organı : İç ve dış tüylü hücreler, destek hücreleri, tektorial membran, Corti tüneli ve sinir lifleri şematik olarak gösterilmektedir.

1. Destek Hücreler:

Hensen hücreleri: Corti organının yan sınırını oluşturur.

Deiters hücreleri: Dış tüylü hücrelerin destekleyici hücreleridir. Baziler membrana bağlıdır. Sadece tabanda açıktır, buradan da efferent ve afferent sinir lifleri dış titretilen tüylü hücrelere ulaşır. Dış titretilen tüylü hücreler ve Deiters hücreleri ve parmak çıkıntılarıyla retiküler membranın oluşmasına katkıda bulunurlar.

Sütun hücreleri (pillar hücreler): Dış ve iç olmak üzere iki tip pillar hücre vardır. Retiküler laminanın bazı kısımları ile Corti tünelinin oluşmasına katkıda bulunurlar.

İç sınır ve falangeal (parmakası) hücreler: İç tüylü hücrelerle, iç sulkus hücrelerini birbirinden ayırır.

2. *Duyusal Hücreler:* Titrek tüylere sahiptirler; bunlara stereosilya denir. Stereosilyalar hem iç hem de dış titrek tüylü hücrelerin apikal kısmında bulunur.

Dış tüylü hücreler: Corti organı içinde, apikal ya da bazal uçlarından Deiters hücrelerine ve bunların parmaklı çıkıntılarına bağlı olarak bulunurlar ve elektriksel stimülasyonla kasılıp uzayabilirler. Üçlü sıra halinde bulunurlar. Sayıları insanda 13400 olarak kabul edilmektedir (30). Dış titrek tüylü hücrelerin tabanları geniş veziküller içeren sinir lifleri ile bağlantılıdır.

İç tüylü hücreler: Bu hücreler vestibüler hücrelere benzerler ve bazı özellikleri ile dış titrek tüylü hücrelerden ayrılırlar. Tek sıralı hücre dizileri biçiminde yerleşmişlerdir ve destek hücreleri ile çevrilidirler. Bu hücrelerin taban kısmında birçok sinaptik sinir sonlanması görülür. Her afferent uca komşu sitoplazma içinde, bir presinaptik kalıp vardır. Efferent uçlar daha geniş veziküller içerir ve daha çok afferent uçlarla sinaps yaparlar.

3. *İç Sulkus:*

Spiral limbusun dış kenarı, Corti organının iç kenarı ve yukarıda tektoryal membran arasında kalan spiral biçiminde üstü açık bir kanaldır. İç sulkus hücrelerinin üst yüzeylerinde mikrovilliler vardır ve hücre arası flamanları ile birbirlerine sıkıca bağlanmışlardır .

4. *Spiral Limbus:*

Lamina spiralis osseanın iç kenarına bağlanır. En iç kenarına ise Reissner membranı bağlanır. Spiral biçiminde vaskülarize bağ dokusundan ibarettir.

5. *Tektorial Membran:*

Hücre içermez, spiral limbus, iç sulkus ve Corti organını örten ekstrasellüler bir matrikstir. Esas itibarıyla fibröz materyalden yapılmıştır ve endolenfle temastadır.

6. *Kemiksi spiral lamina:*

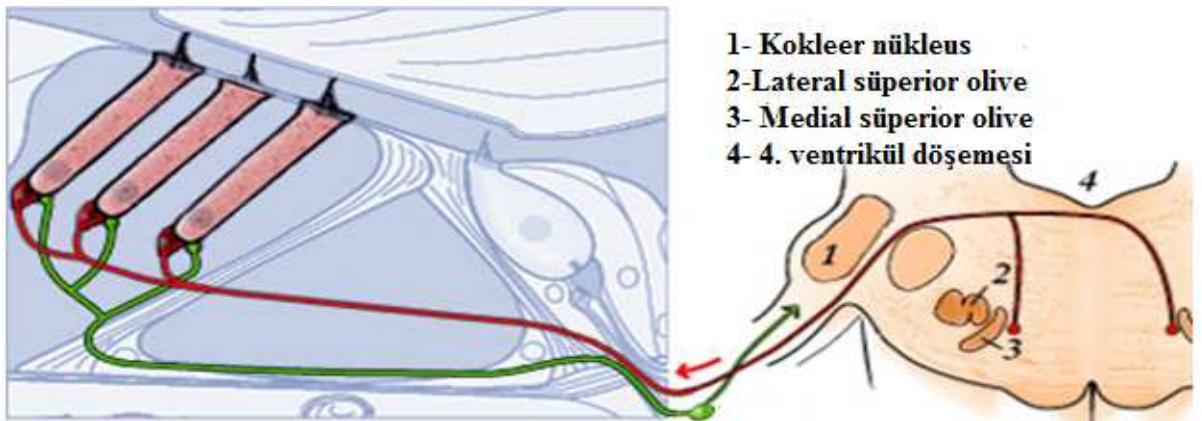
Modiolustan baziller membranının iç tarafına kadar uzanan bir kemik çıkıntıdır. İçi kanallarla doludur. Bu kanalların içinden sinir lifleri Corti organına gider ve oradan geri döner. Spiral lamina, aynı zamanda, spiral limbus ve iç sulkusun ve bunların hücrelerinin oluşmasına katkıda bulunur. İç tüylü hücreler lamina spiralis osseanın dış kenarında bulunurlar.

İç kulak sıvıları: İç kulak sıvıları perilenf, endolenf ve Cortilenf olmak üzere üç çeşittir. Perilenf BOS'tan kaynaklanmaktadır. Kimyasal olarak ekstrasellüler sıvıyı andırır, Na^+ 'dan zengin, K^+ 'dan fakirdir. Endolenf yapımında stria vaskularis rol alır. K^+ 'dan zengin, Na^+ 'dan fakirdir. Kortilenf Corti tüneli ve Nuel boşluklarında bulunur. BOS'tan kemiksi spiral laminanın kanalcıkları içinde seyreden akustik sinirin lifleri boyunca gelir. Endolenfin yüksek K^+ içeriği nöral iletiyi engelleyeceği için Corti tünelinin içinden geçen dış tüylü hücrelerin lifleri kimyasal olarak perilenfe benzeyen kortilenf ile sarılmıştır (30-31).

2.3 Santral İşitme Yollarının Nöroanatomi

Spiral gangliondaki bipolar ganglion hücrelerinin santral uzantıları VIII. kranial sinirin miyelinli koklear kısmını oluşturur. Sinir içindeki liflerin tonotopik bir düzenlemesi vardır. Düşük frekanslı sesler sinirin merkezinde yer alırken, yüksek frekanslı sesler sinirin dış yüzeyindeki apikal lifleri sarar. Koklear sinir, pontomeduller bileşkenin posterolateralinden beyin sapına girer. Lifler anteroventral koklear nükleusta sonlanacak şekilde assendan bir dala ve posteroventral nükleusta veya dorsal nükleusta sonlanacak şekilde dessendan bir dala ayrılır (30) (Şekil 5).

İşitsel bilginin işlenmesi için, santral işitme yollarındaki yedi ana merkez mevcuttur. Aşağıdan yukarıya doğru bu merkezler, medulla oblongatada koklear nükleus, ponsta süperior olivar kompleks, mezensefalonda lateral lemniskus, inferior kollikulus ve süperior kollikulus, talamusta medial genikulat cisim ve işitsel kortekstir (30,32).



Şekil 5: Santral işitme yolları

Beyinsapı seviyesinde afferent ve efferent liflerin organizasyonu

Koklear çekirdekler: Koklear çekirdekler bütün işitme sinir liflerinin beyin sapında ilk uğradıkları yerdir. Çekirdekler pontomeduller kavşakta bulunup, simetrikler. VIII. kranial sinirin girişine göre daha dışta kalırlar. Koklear nükleuslar, iki ana nükleustan oluşurlar. Bunlar; dorsal ve ventral koklear nükleuslardır. Ventral koklear nükleus da anteroventral ve posteroventral koklear nükleus olmak üzere iki kısma ayrılır.

İşitsel sistemde taşınan bilgilerin santral işleme yeri, koklear nükleuslarda başlar. Burası ilk sinaps bölgesidir. Koklear nükleuslarda liflerin dağılımı rastgele değildir. İşitsel sistemin tonotopik organizasyonu, santral işitsel sistemin tüm seviyelerinde yer alır. Corti organında elektriksel enerji haline dönüşen uyarı, gerek işitme sinirinden, gerekse beyin sapındaki nükleuslardan geçişi sırasında bazı işlemlere uğrar. Yani sinir fibrilleri ile nükleuslardaki hücreler, elektriksel aktarımdaki görevlerinin yanısıra bir entegre devre gibi çalışırlar. Bu işlemler kodlama faaliyeti olarak bilinirler, bilgisayardaki dijital kodlamaya çok benzerler.

Akustik sinir ile koklear nükleuslar arasındaki bağlantı sadece ipsilateraldir. Buna karşılık bu nükleuslar ile daha üst seviyedeki bağlantılar ise ipsi ve de kontrlateral olarak kurulmuştur. Koklear nükleuslardan başlayan ipsilateral yol, önce süperior oliver komplekse, oradan da lateral lemniskus yolu ile inferior kollikulusa gider. İnferior kollikulus ile üç koklear nükleus arasında direkt ipsilateral bağlantı da vardır (32).

Süperior Oliver Kompleks: Ponsun gri cevherinin hemen arka alt kısmında yerleşmiştir. Birkaç çekirdekten oluşur, medial çekirdek, lateral çekirdek, trapezoid cismin medial çekirdeği ve perioliver çekirdektir. Süperior oliver kompleks, her iki koklear çekirdekten lifler alır, bu sayede her iki kulağa seslerin geliş zamanı ve seviyelerini monitörize ederek sesi yer tespiti için sıralar. Bir bütün olarak süperior oliver kompleks, binaural sürecin yer aldığı işitme sistemindeki en düşük seviyeyi temsil eder. Trapezoid cisim üzerindeki işitsel uzanımın tüm seviyelerinde binaural seviye ve zaman farklılıklarına duyarlı üniteler vardır.

İnsanlarda süperior medial çekirdekler iridir ve lateral çekirdek ise kalıntı şeklindedir. Süperior olivanın medial çekirdeği bipolar nöronlardan yapılmıştır. Buna karşılık lateral çekirdeğinde ise multipolar nöronlar bulunur. Süperior oliver kompleks, lateral lemniskus ve inferior kollikulusa çıkan lifler gönderir. Süperior olivar kompleksin inen lifleri ise korti

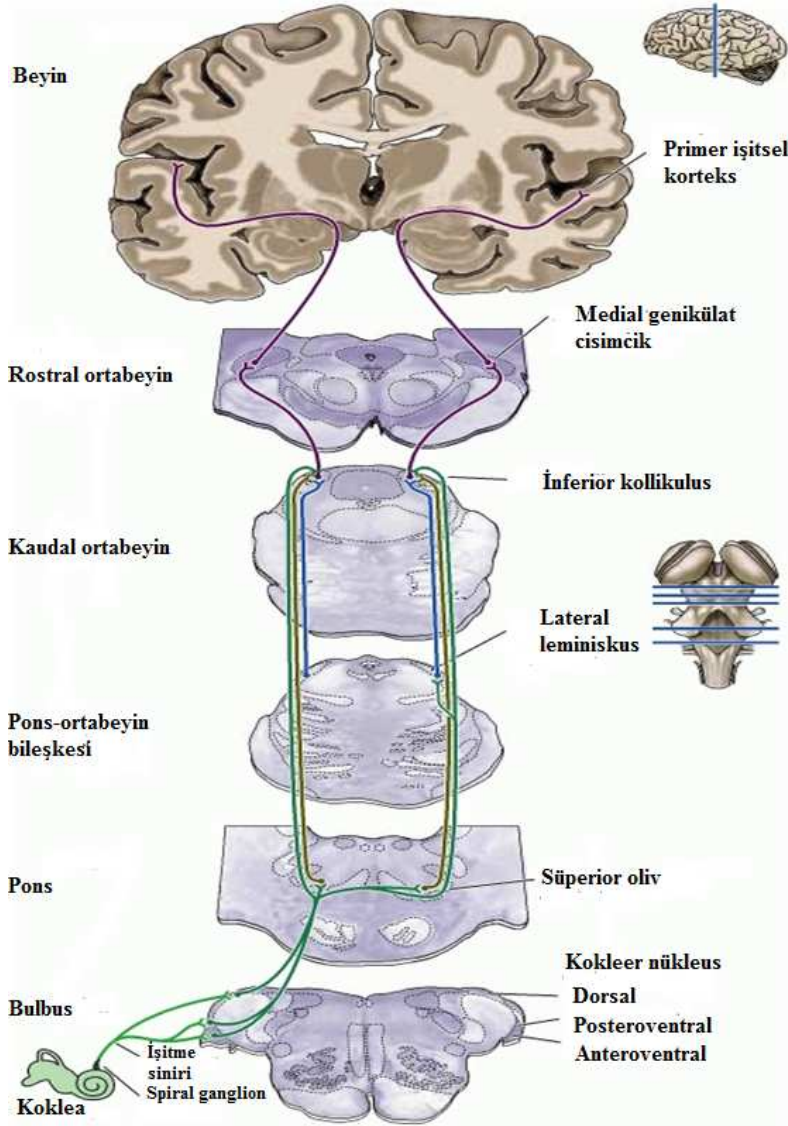
organının tüylü hücrelerine gider. Olivokoklear demet, miyelinli liflerden oluşan iç ve miyelinsiz liflerden oluşan dış olmak üzere iki demetten meydana gelmiştir (30,32).

Lateral Lemniskus: Beyin sapındaki temel asendan işitsel yoldur. Beyinsapı tegmentumunun lateral kısmında yer alır. Koklear nükleus ve süperior olivar kompleks ile inferior kollikulusla bağlantı kurar. Üç ana grup nükleusu vardır. Bunlar; ventral, dorsal ve intermediate nükleuslardır. Ventral nükleus başlıca kontrlateral ventral koklear nükleustan lif alır. Az miktarda ise dorsal koklear nükleus ve süperior olivar kompleksten lifler alır. Böylece kontrlateral kulağın stimülasyonuna geniş çapta yanıt verir.

Lateral lemniskusun hücre dağılımı diğer nükleuslarda olduğu gibi tonotopikaldır. Yüksek frekans hücreleri ventral, alçak frekans hücreleri ise dorsal planda yerleşmiştir. Lateral lemniskus da, diğer işitsel nükleuslardaki gibi, ancak daha az düzeyde olacak şekilde işitme kodlaması yapar (32).

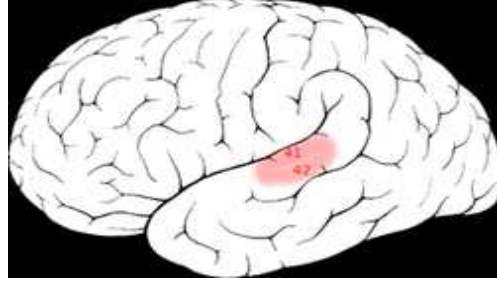
Inferior Kollikulus: Mezensefalonda bilateral yerleşmiş bir yapıdır. Çıkan işitme lifleri için ara istasyondur ve akustik bilgilerin işlendiği alandır. Süperior olivar kompleksin yer tespiti ile dorsal koklear nükleusun frekans analizi özelliğini birleştirir. Alt beyin sapından gelenleri üst kısımdaki medial genikulat cisme ve işitme korteksine gönderir. Inferior kollikulusun başlıca projeksiyonu, medial genikulat cisimciğe doğru uzanır. Diğer projeksiyonu ise süperior kollikulusun derin kısımlarına ulaşır; ayrıca posterior talamik grupla da bağlantısı vardır. Süperior kollikulusta uzaydaki sesin pozisyon bilgisi görme alanı ile entegre edilir (32)

Medial Genikulat Cisim: Talamusta lateral genikulat cismin iç tarafında yerleşmiştir. Burası inferior kollikulus ile işitme korteksi arasındaki çıkan liflerin ara istasyonudur. Medial genikulat cisim işitsel korteks yanında görsel ve dokunsal duylardan da girdiler alır (32).
(Şekil 6)



Şekil 6. Santral işitme yolları; kokleadan işitsel kortekse kadar santral işitme yolları şematik olarak gösterilmektedir. (wikipedia)

İşitsel korteks: İnsanda primer işitsel korteks, temporal lobun üst kısmındaki Sylvian fissürde lokalizedir (Broadman'ın 41-42. alanları). İşitsel korteks üç bölgeye ayrılmıştır.



Şekil 7. Primer işitsel korteks; primer işitsel korteks A1, assosiasyon bölgesi A2 olarak gösterilmiştir. (wikipedia)

A1 bölgesi olarak tanımlanan yer Broadman'ın 41. alanıdır. Primer işitsel korteksi temsil eder. Medial genikulat cismin ventralinden gelen lifler daima A1 bölgesine gider. Primer işitsel korteksi çevreleyen pek çok kortikal alanlar veya kuşak bölgeleri bulunur. Bunlara assosiasyon alanları denir ki bunlar Broadman'ın 52 ve 22. alanını kapsarlar. Assosiasyon alanları primer korteksi, konuşma ve kelime hazneleri ve görmeyle ilgili olan frontal ve temporopariyetal bölgeye bağlar.

Primer işitsel korteks, tonotopik ve binaural organizasyonu içerir (yüksek frekanslar rostralde, düşük frekanslar kaudalde yerleşmiştir). Buradaki hücreler spesifik stimuluslara ve genelde binaural inputlara yanıt gösterirler.

Her bir işitsel kortikal bölgenin, kontrlateral hemisferik alana bağlı olduğu ve korpus kallosum ile anterior kommisüre yayıldığı bilinmektedir. İşitsel kortekste bilgi bir hemisferden diğerine korpus kallosum aracılığıyla aktarılır. Bu sayede bilginin, işitsel algı için lisan açısından nondominant olan hemisferden dominant olan hemisfere aktarması sağlanmış olur. Konuşma dominant hemisferde, müzik ise nondominant hemisferde işlenir. Doğumla birlikte başlayan işitsel uyarılar işitsel korteksin organize olmasını sağlar diğer bütün beyin fonksiyonları gibi işitme fonksiyonu da beyin plastisitesi sayesinde gelişir, uygun uyarılar kortekste gerekli nöral bağlantıların kurulmasını sağlar.

İşitsel bilgi serebelluma da ulaşarak diğer duysal bilgilerle etkileşir. İşitsel sistemin tüm düzeylerinde her iki kulaktan da girdi mevcuttur. Bu durum gürültüde işitme yanında, ses lokalizasyonuna da katkıda bulunur (32).

2.4 İşitsel Beyinsapı Yanıtları (Auditory Brainstem Responses)

İşitsel uyarılmış potansiyeller kullanarak yapılan incelemeler işitsel uyarana karşı oluşan yanıtın elektrofizyolojik olarak kayıtlanması temeline dayanırlar. İşitme yollarında kayıt alınan bölge ve kayıtların zamansal penceresine göre değişik seviyelerin değerlendirilmesi olanağını veren objektif yöntemlerdir. Elektrofizyolojik ölçüm teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak büyük değer ve önem kazanmışlardır. Bu incelemelerin başlıcaları elektrokokleografi, İşitsel beyinsapı yanıtları (ABR), orta latanslı kortikal yanıtlar ve geç latanslı kortikal yanıtlardır (33).

İşitsel beyinsapı yanıtları (ABR), temel olarak işitsel uyarana karşı kokleer nükleuslar ve beyin sapı seviyesinde oluşan yanıtların kaydedilmesi esasına dayanır. Bir bilgisayar yardımı ile yüksek hızda ses uyarını gönderilerek kayıtlama yapılır. Ancak çevrede pek çok nöral ve musküler yapı olduğu için kayıtlamada özel filtre sistemlerinin kullanılması zorunludur. Tipik olarak, aktif elektrot vertekse veya alın orta hatta saç çizgisine, referans elektrot mastoid apekse veya kulak memesine yerleştirilerek diferansiye amplifikasyon tekniğiyle kaydedilirler (34). ABR kaydı için ani başlangıcı olan bir stimulusun kullanılması gerekir. ABR potansiyellerinin oluşturulması için en sık kullanılan ses stimulusu 100 mikrosaniyelik köşeli bir dalga olan klik'dir. Bunun dışında belli frekans bölgelerini değerlendirmek için ton burst şeklinde sınırlandırılmış uyarılarla da test yapmak mümkündür. Yenidoğan işitme taraması gibi özel amaçlar için otomatik ABR cihazları da geliştirilmiştir (33). Normal bir ABR trasesinde, geleneksel olarak I'den VII'ye kadar numaralandırılan verteks pozitif pikler yer alır. ABR dalgalarının kaynaklandığı lokalizasyonlar şu şekildedir (33,35). (Şekil 8)

I.dalga: Kokleer sinirin distali

II.dalga: Kokleer sinirin proksimali

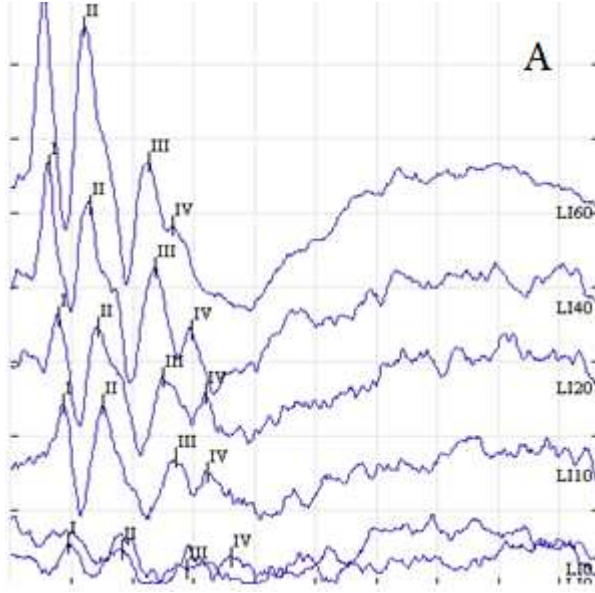
III.dalga: Ventral kokleer nükleus

IV. dalga: Superior oliver kompleks

V. dalga: Pozitif dalga: Lateral leminiskus, Negatif dalga: İnferior kollikulus

VI. dalga: Corpus geniculatum mediale

VII. dalga: Talamokortikal bölge



Şekil 8. Rat ABR trasesi (Wikipedia)

ABR trasesinde I. ve II. dalga gibi erken pikler işitsel sinir kaynaklı senkronize nöral aktiviteyi gösterirken, V. dalga primer olarak superior oliver kompleks ile inferior kollikulus arasındaki bağlantıyı yapan lateral lemniskustaki nöronların aktivitesini yansıtır. ABR trasesindeki her bir dalganın amplitüdü gerek olgular arasında, gerek aynı olgudaki değişik ölçümler arasında farklılık gösterebilirken, latanslar stabildir ve süreleri çok iyi belirlenmiştir (35).

ABR dalgalarının analizinde en az iki tekrarlanabilir kayıt alınması esastır. Bundan sonra her kulak için latanslar simetri ve dalga formları yönünden analiz edilir.

İşitsel sensitivitesi normal olan bir erişkinde yaklaşık 1,5 msn latans ardından I. dalga oluşur. Takip eden diğer dalgalar yaklaşık 1 msn aralıklarla oluşur ve yüksek şiddetlerdeki stimulus seviyesinde V. dalganın latansı tipik olarak 5-6 msn arasındadır. Stimulus şiddeti düştükçe ABR dalgalarının amplitüdü de düşer, ancak klinik olarak asıl önemli olan her bir dalga latansının gittikçe uzamasıdır. Stimulus şiddeti işitme eşiğine yakın seviyelere kadar indikçe, erken latanslı dalgalar gittikçe yok olur. Bu kadar düşük şiddetteki stimulus seviyelerinde yalnızca V. dalga kaydedilebilir (33,35).

ABR potansiyellerinin pek çok diğer uyarılmış potansiyellere bir üstünlüğü de yeni doğanlarda güvenilir şekilde kaydedilebilmesidir. Özellikle bebeklerin büyümelerinin ABR üzerine etkileri çok iyi çalışılmıştır. Doğumda ABR potansiyelleri başlıca I. III. ve V. dalga olmak üzere üç pikten oluşur. Yeni doğanlarda I. ve V. dalganın göreceli amplitüdüleri, III. dalganinkine eşit, hatta daha büyük olabilir. İnfantlardaki I. dalga ile V. dalga arasındaki bu ilişki, erişkin yaşlarda tersine döner. İnfantlarda I. dalganın latansı, erişkin döneme göre çok az daha uzundur. Ancak I-III. ve V. dalganın latansları normal erişkinlere göre oldukça uzundur, bu durum infantlarda interpik latansların daha uzun olmasına neden olur. Çocuk büyüdükçe, ABR potansiyelleri yaklaşık 2 yaş civarında erişkin formlarına ulaşır ve gerek absolut, gerekse interpik latanslar kısalır, II. ve IV. dalgalar gittikçe belirginleşir ve V. dalga amplitüdü artar. Yaşamın ilk 2 yılı süresince ABR potansiyellerinin maturasyona bağlı değişimleri öyle belirgindir ki, her bir dönem için ayrı normal değerlerin belirlenmesi gerekir. ABR potansiyellerinin 27-30 haftalık prematür infantlarda kaydedilmesi mümkündür, ancak bu kadar küçük çocuklarda işitme eşikleri daha yüksek bulunur (35).

Klinik Uygulamalar: ABR potansiyelleri klinikte hem işitme seviyesinin tespitinde, hem de bir dizi nörootolojik hastalığın tanısında faydalı olabilmektedir (33). ABR, işitsel uyarılmış potansiyellerin en sık kullanılanıdır. Bunun nedenleri arasında tekniğin noninvazif oluşu kadar, etraflı araştırılmış olması, kolay kaydedilmesi, sonuçlarının stabil olması, dikkat, uyku, sedasyon, anestezi veya yaşlanmadan etkilenmemesi sayılabilir.

1) İşitme seviyesinin tespiti: ABR potansiyellerinin primer klinik uygulama alanlarından biri çocuklarda ve geleneksel davranışsal tekniklerin kullanılamadığı olgularda işitme seviyesinin tespitidir. ABR tekniğinin etkili bir klinik uygulama olduğu kabul edilse de, bu potansiyellerin beyin sapının alt bölgelerindeki işitsel yollardan kaynaklandığını akılda tutmak gerekir. ABR potansiyelleri eşik tespitinde davranışsal yöntemlere yardımcı olarak kullanılabilirler (34).

İşitmesi normal olan kişilerde klik stimulusu için ABR eşikleri, davranışsal işitme eşiklerinin 10-15 dB içindedir. Kokleer işitme kaybı olan olgularda, ABR eşikleri işitme kaybının seviyesine göre yükselme gösterir. ABR potansiyellerinin uyarılması için en sık kullanılan stimulus, frekans spesifik olmayan klicktir ve hastadaki işitme seviyesi hakkında sağlayacağı bilgi de frekansa spesifik olmayacaktır. Ancak ton burst uyaran kullanılarak 1000 Hz ve üzerindeki frekanslara özgü bilgiler elde edilebilir (34).

İletim tipi işitme kaybı, ses kokleaya ulaşmadan önce şiddetinin azalmasına neden olur. Sonuçta normal gruplarla karşılaştırıldığında iletim tipi işitme kaybı olan hastalarda ABR dalgalarının intermik latansları değişmezken, absolut latanslarında uzama görülecektir. Bunun dışında iletim tipi işitme kaybından kuşulanılan olgularda kemik yolu ABR yardımı ile patolojinin doğrulanması mümkün olabilmektedir (34).

2) Otonörolojik uygulamalar: ABR potansiyellerinin klinikte ikinci büyük kullanım alanı, koklea ile inferior kollikulus arasındaki işitsel yolları etkileyebilecek lezyonların tespitine olanak tanınmasıdır. Bu tip lezyonlar arasında akustik nörinom gibi yer kaplayan kitleler olabileceği gibi, multipl skleroz, inme veya travma gibi patolojiler de sayılabilir. Bunun için genellikle yüksek şiddetli kliklerle uyarılan ABR dalgalarının morfolojileri değerlendirilir. Her ne kadar günümüzde manyetik rezonans veya bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme yöntemleri retrokokleer patolojilerin ayırıcı tanısında ön plana çıkmış gibi görünse de bu yöntemlerin kullanılmadığı veya retrokokleer patoloji şüphesinin yüksek olmadığı durumlar mevcuttur ve böyle durumlarda ABR hala faydalı bir tanısal yöntemdir.

Retrokokleer patolojiler nedeniyle klik ile uyarılan ABR potansiyellerindeki bozulmanın birkaç şekli vardır. Bazı olgularda retrokokleer patolojinin olduğu kulaktan ölçülen ABR dalgalarının tamamen yok olması veya bozulmasıyla karşılaşılabilir. Örneğin tonal odyometrisi normal veya orta derecede işitme kaybı gösteren bir olguda ABR dalgalarının tamamen yok olması, veya sadece erken dalgaları ölçülebilen bir ABR trasesi, ya da I. dalgadan daha küçük amplitüdü bir V. dalga bulunması gibi durumların tümü retrokokleer bir patolojiyi gösterir (36).

Olası retrokokleer patolojilerin tanısında sıklıkla kullanılan ikinci ölçüm dalgaların uzamış absolut veya intermik latanslarıdır. Pek çok olguda, yüksek şiddetli bir klik stimulusuna karşılık V. dalga latansı yaklaşık 5,5 ms, I-V intermik latansı ise 4,0 ms dolaylarındadır. İnternal akustik kanal yerleşimli bir akustik nörinom sinir iletimini yavaşlatacaktır. V. dalga latansının 6,3 ile 6,4 msnin üzerinde olması veya I-V intermik latansının 4,4 ile 4,5 msnin üzerinde olması durumunda, retrokokleer bir patolojinin olup olmadığı ekarte edilmelidir (33,36).

Son olarak, retrokokleer yerleşimli patolojilerin genellikle tek taraflı olması nedeniyle, V. dalga latanslarının veya intermik latansların her iki kulak arasında karşılaştırılması sık kullanılan bir tekniktir. Her iki kulaktan ölçülen V. dalga absolut latansları arasında 0,3 ile 0,4

msnnin üzerinde fark olması veya I-V intermik latanslar arasında 0,3 msnnin üzerinde fark saptanması, muhtemel bir retrokokleer patolojiye işaret eder (33).

ABR potansiyellerinin klinikte kullanıldığı diğer bir alan nörootolojik cerrahi sırasında işitme sinirinin monitörizasyonudur. ABR potansiyellerinin nöral yapıların durumuna hassas olması ve anesteziden etkilenmemesi özellikleri, intraoperatif monitörizasyon için uygun bir yöntem olma sonucunu doğurmuştur. Cerrahi sırasında ABR testlerinin yapılmasının amacı, cerraha işitme sinirinin fonksiyonları hakkında sürekli geribildirimde bulunmasıdır. Bu bilgilendirme ABR trasesindeki V. dalga latansının veya I-V intermik latansının sürekli monitörizasyonu ile sağlanır. V. dalga latansında veya I-V intermik latansında uzama tespit edilmesi kokleaya veya işitme sinirine travma olduğuna işaret eder (33,36).

Bu uygulamalar dışında ABR komadaki hastalarda beyin ölümünün saptanmasında güvenilir bir yöntem olarak uygulama alanı bulmaktadır (36).

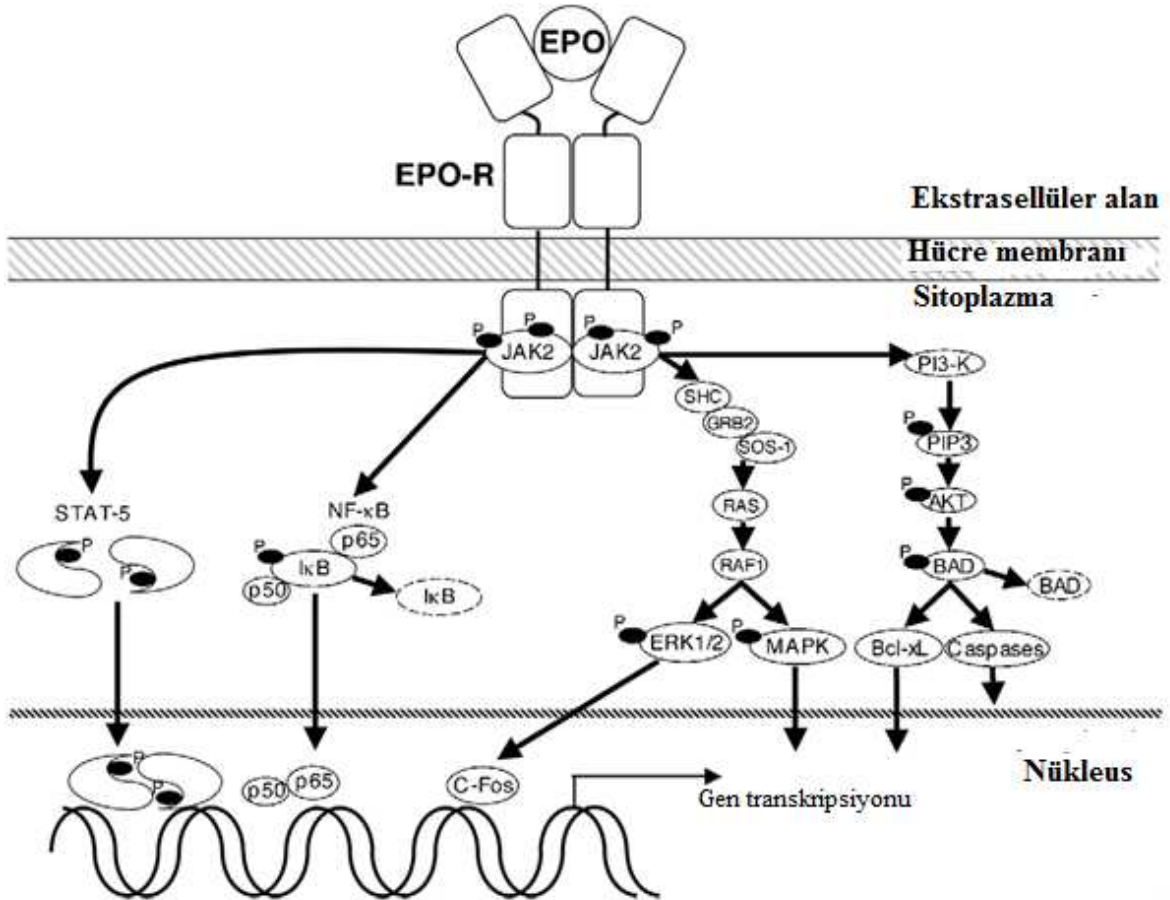
ABR'ın bir diğer uygulama alanı ise kuşlardan memelilere kadar değişen pek çok hayvan türünde işitmenin değerlendirilmesidir. Böylelikle işitmeyi ilgilendiren pek çok in vivo çalışma mümkün olabilmektedir (37-39). Sıçanlarda ve kobaylarda anestezi altında dış kulak yoluna yerleştirilen bir mikrofona kullanılması ve klik ve ton burst ölçümlerin dermal elektrotlar ile kaydedilmesinin uygun olduğunu bildirilmektedir. (37,38,39,40, 41). ABR kayıtlarında 4 dalga elde edilmekte ancak değerlendirmede 2. dalgaya ait bulgular temel alınmaktadır (38).

2.5 Eritropoetin

Eritropoetin 30.4 kD ağırlığında bir glikoprotein olup fetal karaciğer, erişkin böbrek dokusu yanı sıra beyinde astrosit ve nöronlar tarafından da üretilmektedir. Kemik iliğinde eritroid öncül hücrelerin apoptozunu engelleyerek eritroid hücre differansiasyonunu sağlamaktadır. Beyin hücrelerindeki endojen üretim hipoksiye bağımlıdır. Aynı zamanda nöral öncü hücrelerin yaşamlarının idamesini ve proliferasyonunu sağlar. EPO reseptörleri (EPO-R) sadece hematopoetik hücrelerde değil endotelial ve nöral hücrelerde de tespit

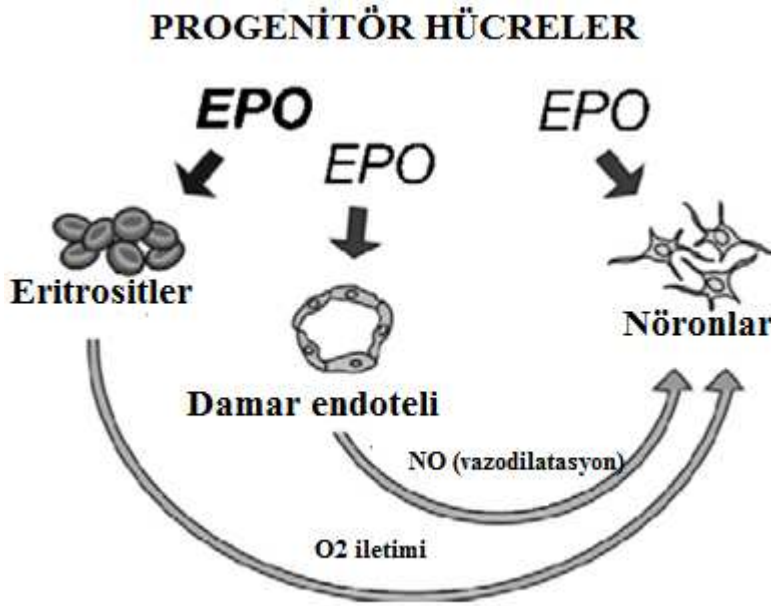
edilmiştir. Nöral hücrede EPO – EPO-R’ye bağlanarak değişik yolları aktive eder ve nöral hücre yaşamında rol oynar (Şekil 9) (42, 43).

Gestasyon süresinde EPO-R’leri bloke edilen ve EPO eksikliği yaratılan farelerde matür eritrositler azalmakta bu hayvanlarda beyin gelişimi bozulmakta ve yavrular in-utero kaybedilmektedir (42). Radyoaktif I-125 –EPO işaretli fare çalışmalarında maddenin insanlar ve maymunlardaki homolog bölgeler olan hipokampal alan, korteks ve orta beyinde yerleştiğini göstermektedir (42). Esasen EPO’nun nöroprotektif özellikleri son 1990’lı yıllardan başlayarak çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan ajan rekombinan EPO’dur (rhEPO). İlaç 1995 yılında klonlanmış olup 1989 yılında ‘Food and Drug Association’ (FDA) tarafından onaylanmıştır. Gerek çocuklarda gerekse erişkinler de etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış olup son dönem böbrek yetmezliğine bağlı anemiler ve prematürelde kullanılmaktadır (42).



Şekil 9. Nöral hücrede EPO- EPO reseptörlerine bağlanarak değişik sinyal yollarını aktive eder ve nöral hücrenin yaşamında rol oynar (42).

Rekombinan eritropoetin ile tedavi edilmiş anemik hastalarda nöromusküler fonksiyonların düzeldiğinin gösterilmesinden sonra hipoksi oluşturulmuş nöron hücre kültürlerinde EPO'nun koruyucu etkisinin gösterilmesine dair araştırmalar yapılmıştır. Daha sonra da sıçan beyni astrositlerinde EPO tanımlanmıştır (42). İn vitro olarak başlayan çalışmalar yerini invivo çalışmalara bırakmaya başladığında birçok hayvan modelinde özellikle travma ve HİE yaratılan sıçan çalışmalarında EPO'nun beyin ve spinal hasarı önlediği gösterilmiştir (12, 13, 19, 21, 24, 44, 45). Bu etkinin mekanizması henüz tam açıklanamamış olup EPO tedavisinin reaktif oksijen türleri (ROS) ve glutamat gibi dokuyu hasara uğratan moleküllerin üretimini azalttığı vazospazmı engellediği, anjiyogenezi uyardığı, enflamasyonu azalttığı ve eritroid ve nöronal kök hücreleri uyardığı şeklinde mekanizmalar öne sürülmektedir (19, 42, 43) (Şekil 10).



Şekil 10. Eritropoetin ROS, glutamat gibi doku hasarı yapan moleküllerin üretimini azaltır, vazospazmı engeller, angiogenezi, eritroid ve nöral kök hücrelerini uyarır (43).

Nöroprotektif etki türlerine, yaşa hasarın natürüne, hasarlanan dokuya verilen doz ve doz aralıklarına bağlı olarak değişim gösterir (19). Bugün EPO ile ilgili tartışılan önemli bir diğer nokta da EPO'nun kan beyin bariyerini geçip geçemediğidir. EPO'nun molekül ağırlığının büyüklüğünün kan beyin bariyerini geçmesini engellediği ileri sürülse de yenidoğan ve erişkin sıçanlarda fokal beyin iskemisi, beyin travması veya deneysel ensefalomyelitte sistemik veya intraperitoneal eksojen rhEPO uygulaması koruyucu etkisi gösterilmiştir (43). Bu bulgular EPO'nun belirli miktarlarda kan beyin bariyerini geçebildiğinin ya da indirekt mekanizmalarla nöroprotektif olabildiğinin göstergesidir ancak bu nokta henüz tam olarak aydınlatılmış değildir (43).

Bu çalışmalar sürerken 2005 yılında Caye-Thomasen ve ark (46) kobay iç kulağında EPO ve EPO-R varlığını, sonrasında da Monge ve ark (47) yenidoğan ve erişkin sıçanların Corti organı tüylü hücrelerinde EPO-R'yi göstermişlerdir. Corti organ kültürlerinde yapılan çalışmalar r-EPO'nun hipoksi ve ototoksisiteye karşı koruyucu etkisi olabileceğini (15, 45, 48) ancak akustik travmada etkisiz olduğunu düşündürmektedir (49). Ancak EPO'nun HİE'de beyin hücreleri üzerine olan nöroprotektif etkisi ile ilgili araştırmalar oldukça kapsamlı olmasına karşın iç kulak üzerine etkilerini araştıran çalışmalar henüz emekleme aşamasındadır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izin alınarak (Protokol No:27/2010) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı İşitme Konuşma Denge Ünitesi ve Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Birimleri ile birlikte gerçekleştirilmiştir.

Postnatal 7. günde olan Wistar Albino cinsi, ağırlıkları 9-11 gram arasında değişen 31 adet yavru sıçan 4 grup halinde çalışmaya alınmıştır. Deneklerin araştırma başlangıcına kadar oniki saat aydınlık on iki saat karanlık ortamda 20+/- 2derece oda sıcaklığında barındırılmış ve standart pellet yem, musluk suyu ile beslenmiştir. Bu yavru sıçanlara annelerinin emzirdiği göz önüne alınarak kanibalizmi önlemek amacıyla el ve eldivenle yapılacak manipulasyonlarda mümkün olduğu kadar pamukla dokunulmuştur (Resim1).



Resim 1.Wistar Albino sıçan yavruları

3.1 Çalışma Grupları

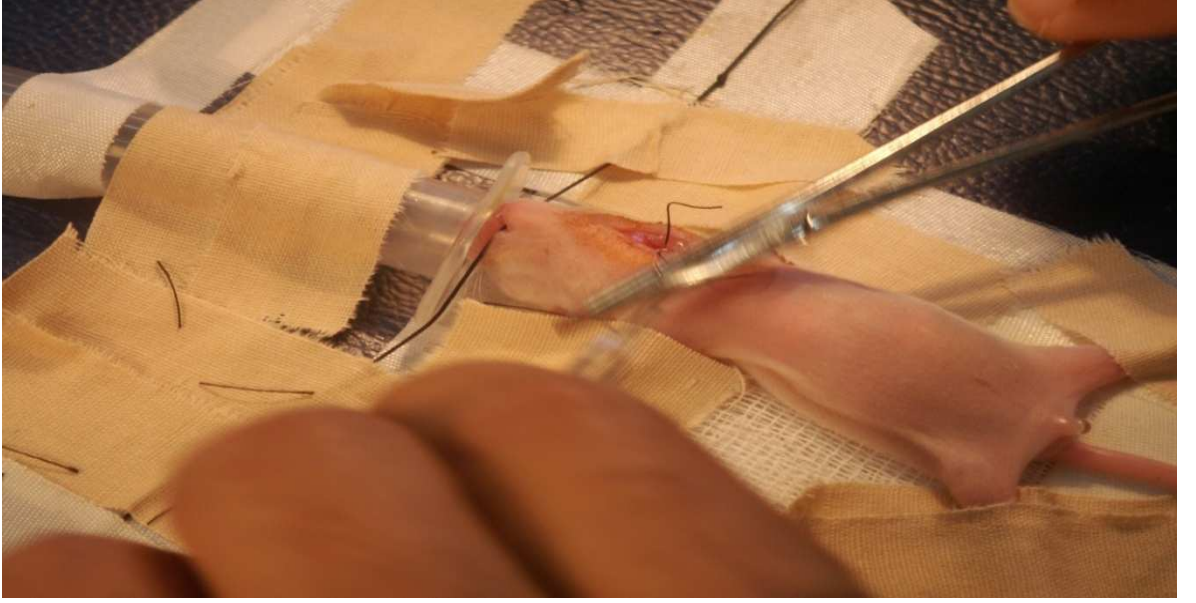
Hayvanlar 4 ayrı grup halinde çalışmaya alındı. Kontrol grubunda (Grup 1) 8 hayvan yer almaktaydı, bu gruba herhangi bir cerrahi stres ve anestezi uygulanmadan sadece intraperitoneal olarak 0,2ml SF verildi. Sham grubu (2.grup) 5 hayvandan oluşmaktaydı, bu gruptaki hayvanlara genel anestezi altında boyun orta hattan insizyon yapıldı ve karotis bağlanmadan insizyon sütüre edilip ardından 0,2ml intraperitoneal SF verildi. HİE (Grup3) grubunda 9 hayvan vardı, bu gruba HİE uygulanıp ardından 0,2ml intraperitoneal SF verildi. HİE +EPO grubu (Grup 4) ise 9 hayvandan oluşmaktaydı, bu gruba HİE uygulanıp ardından intraperitoneal EPO verildi

3.2 Hipoksik-İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

Anestezi Başlangıcı: Anestezi uygulaması için denekler, anestezi gazının giriş ve çıkış yapabileceği bölümleri bulunan cam fanusa yerleştirilerek, sisteme %100 O₂ içinde % 2,5 halotan verilerek anestezi uygulaması gerçekleştirildi. Halotan vaporizatöründen gelen gaz karışımı, anestezi gaz monitöründen (Anesthesia Gas Monitoring 1304,Aarhus, Denmark) izlenerek sabit tutuldu.

Anestezi İdamesi: Cerrahi işlem için yavru sıçanlar cam fanustan çıkarıldığında, anestezi idamesi deneğin ağız ve burnuna adapte olan bir maske ve konnektör yardımıyla sağlanmıştır. Oksijen ve halotan düzeyleri anestezi gaz monitöründen izlenerek sabit tutulması sağlandı.

Cerrahi işlem: Deney hayvanlarının boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0.5-1 cm'lik cilt, ciltaltı insizyonu yapıldı. Trakea bulunarak sol a. carotis communis mikroskop altında 6/0 ipek ile önce askıya alınıp, sonra da kalıcı olarak bağlandı; karotid arterde pulsasyon olmadığı doğrulandıktan sonra, insizyon yeri dikildi. Daha sonra anestezi gaz girişi durdurulup deney hayvanının uyanması sağlandı. Cerrahi işlem sırasında HİE+ EPO grubundan bir hayvan kaybedildi ve bu nedenle çalışmadan çıkarıldı (Resim 2).



Resim 2. Sol karotis arterin bağlanması

Beslenme: Deney hayvanları derlenme ve beslenme için annelerinin yanına 2 saat süreyle bırakıldı.

Hipoksi düzeneği: Her deney hayvanı için ayrı olmak üzere 450 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar kullanıldı. Cam kavanozlara nemlendirilmiş %92 saf nitrojen ve %8 oksijen girişi sağlandı. Hipoksik karışımın düzeyi ortak giriş hattına bağlanan anestezik gaz monitörü ile izlenerek sabit tutuldu. Tüm kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirildi. Deney hayvanları 2,5 saat süre ile bu kavanozlarda hipoksik karışımı soludular. Hipoksik ortamda 2,5 saatlik süre tamamlanmadan solunumu duran, HİE ve HİE+EPO verilen gruplardan birer hayvan resüsitasyon uygulanmayıp çalışmadan çıkarıldı.

3.3 İntraperitoneal eritropoetin uygulanması

Eritropoetin için uygun intraperitoneal dozlar, daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlendi (12).

Eritropoetin: rEPO 1000 U/kg (Eprex, Cilag, Zug, Switzerland) dozunda 0.2 ml serum fizyolojik içerisinde, hipoksik iskemiye maruziyetten hemen sonra tek doz olarak intraperitoneal yolla uygulandı (12).

3.4 İşitmenin değerlendirilmesi

Sıçanlarda juvenil periyot olan yedi haftaya dek büyütülmüş hayvanlarda (13) tüm gruplarda klik ve tone burst ABR ile işitsel fonksiyonlar değerlendirildi. Tüm sıçanlara ABR yapmadan önce otoskopik muayene yapılarak dış kulak yolu ve kulak zarlarının normal olduğu belirlendi. ABR kayıtlarmaları için ICS CHARTR EP Software v5.2 (GN Otometrics A/S,Kopenhagen, Denmark) sistemi kullanılarak işitme eşikleri tayin edildi. Kayıt elektrodu olarak standart altın kaplama kubbe ABR elektrodlarına 22 numara enjektör ucunun lehimlenmesiyle hazırlanan dört adet subkutan elektrot kullanıldı. Her iki retroaurikuler bölgeye iki adet referans, oksipital bölgede orta hatta bir adet aktif, orta hat sırta ise topraklama olarak bir adet elektrot yerleştirildi.(Resim 3)



Resim 3. ABR elektrotlarının yerleştirilmesi

ABR testinde klik ve 6kHz, 8kHz frekanslardaki ton burst uyarılar kullanılarak, her kulak için aynı uyarı şiddetinde en az iki kayıtlama yapıldı. Eşik değeri, uyarı şiddeti 90dB'den başlayarak eşik üstü değerlerde 10 dB, eşik değeri yakın değerlerde ise 5 dB azaltılarak bulundu.

ABR testinde kullanılan kayıt ve parametreleri Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1: ABR testinde kullanılan klik uyaran ve kayıt parametreleri

Uyarı- Kayıt Parametreleri / Klik
Polarite : Alterne
Uyaran: Klik
Kulaklık: Insert earphone
Uyaran sıklığı: 21.1/sn
Uyaran yönü: Monaural
Kayıtlama penceresi:15msn
Amplifikasyon:0,5mV
Kayıtlama filtresi: 100-3000Hz

Tablo 2: ABR testinde kullanılan 6 kHz ve 8 kHz frekans aralığı ton burst uyaran ve kayıt parametreleri

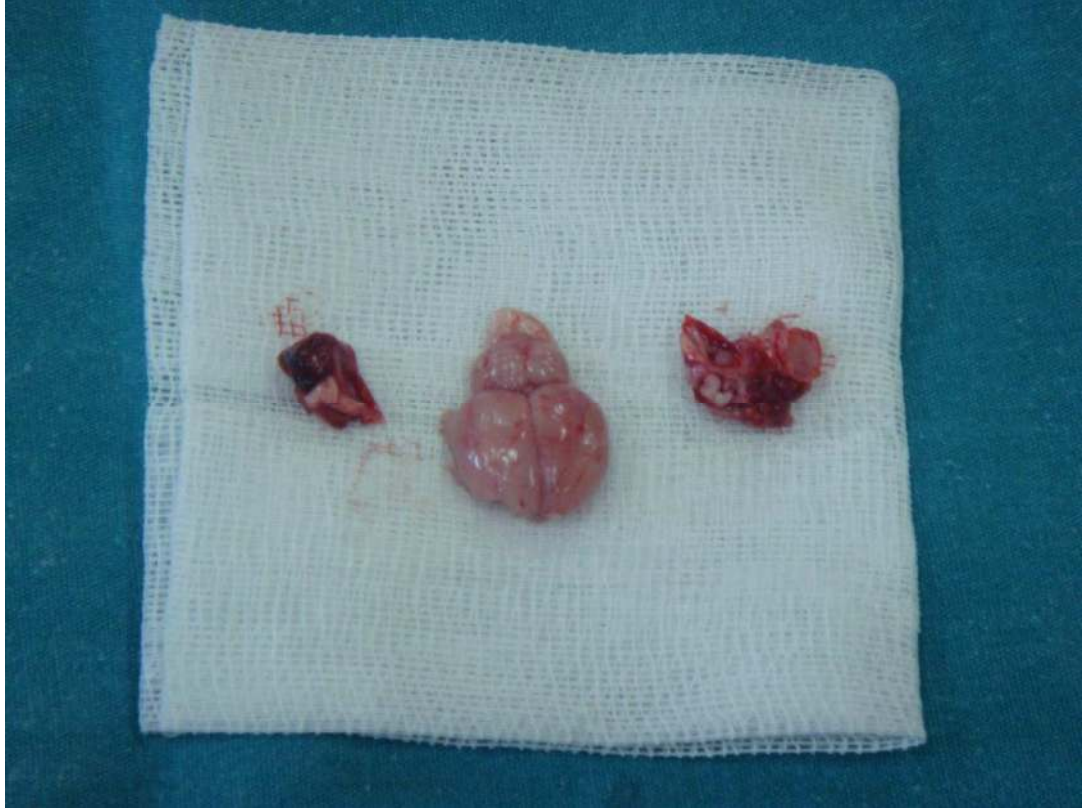
Uyarı- Kayıt Parametreleri / 6-8kHz Ton Burst
Polarite : Alterne
Uyaran: 6-8 kHz Ton burst
Kulaklık: Insert earphone
Uyaran sıklığı: 31.1/sn
Uyaran yönü: Monaural
Kayıtlama penceresi:25msn
Amplifikasyon:0,5mV
Kayıtlama filtresi: 50-1500Hz

3.5 Histolojik Değerlendirme

ABR uygulamasından sonra 7 haftalık hayvanlar eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Çıkartılan sağ, sol temporal lob, sağ, sol koklea ve beyin sapı örnekleri immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik inceleme için işleme alındı (Resim 4, 5).



Resim 4. Beyin ve beyin sapı dokularının çıkarılması



Resim 5. Beyin, beyin sapı ve temporal kemiklerin makroskopik görünümü

Işık mikroskopik inceleme

Çıkarılan beyin sapı örnekleri oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit edildikten sonra, %70,%80, %96'lık etil alkol serilerinden yirmişer dakika tutulmuş, sonrasında yirmişer dakikalık dört aseton serisinden geçirildi. Dokular şeffaflandırma amacıyla 3 değişim ksilole tabi tutulduktan sonra parafin içine gömülerek bloklanmıştır.

Parafine gömülen bloklardan Mikrotom (Leica RM2255) yardımı ile bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara yerleştirildi. Her bloktan seri kesitler alındı. Kesitlere krezil violet, TUNEL boyama ve Kaspaz-3 için immunohistokimya uygulandı (50-52) . Kokleer nukleus için kesit seviyesi sıçan beyin atlası ile belirlendi. Her hayvandan Paxinos ve Watson'un sıçan beyin atlasına göre tanımlanmış figure 60-61 ve 62. seviyelere denk gelen 3'er kesit alındı .(53)

Krezil violet ile boyama yöntemi

Krezil violet ile nöronların Nissl granüllerinin boyanması amaçlanmıştır. Dokular 20, 10, 10 dakikalık üçlü ksilol serisinden sonra absolü alkol, %96 alkol, %80 alkol ve %70 alkole birer dakika tutulmuş. Distile su ile 5 dakika yıkandıktan sonra 20 dakika boya solüsyonunda tutulmuş, 5 dakika %90 alkol ile çalkalanmış, 60 dakika yine 3lü ksilol serisine sabit tutularak entellan ile kaplanarak histopatolojik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

TUNEL Tekniği ile Boyama

Koklear nukleus seviyesinden alınan kesitler dokudaki apoptotik hücreleri göstermek amacı ile neuronal spesifik terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick and labelling (TUNEL) tekniği ile boyandı. Bu teknik için ApopTAG Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore) kullanıldı. Kesitler boyama için iki gece 37 °C, bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dokuya zarar vermeden kurulanıp pappen (Invitrogen, Camarillo, CA, 00-8877) ile çevreleri sınırlandı. Kesitler 5 dakika sitrat tampon ile mikrodalgada kaynatıldıktan sonra, distile su ile 5 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (Merck, Germany) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline Solution, DBS, Pleasanton, CA) ile yıkanan kesitler TdT-enzimi 37°C de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler %70, %80 ve %96'lık alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk 3 değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

TUNEL tekniği ile belirlenen apoptozun desteklenmesi amacıyla, kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Kaspaz-3

immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-kaspaz-3 (1:100; Neomarkers, Fremont, CA, USA) antikoru kullanıldı. Lizinli kesitler üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Proteinaz K solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 20 dk oda ısısında bloklama solusyonu (Invitrogen, Histostain- Plus Bulk Kit, Camarillo, CA, USA) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-kaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de enkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum, Camarillo, CA, USA) ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum, Temecula, CA, USA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi 0.02% Diaminobenzidin (DAB) kullanılarak görünür hale getirildi. Zemin boyaması Mayers hematoksilin ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

Apoptotik hücre sayılarının belirlenmesi

İmmunohistokimyasal boyama işlemlerinin tamamlanmasının ardından hazırlanan preparatlar Olympus BX-51 model ışık mikroskobu ve video kameradan (Olympus DP71) oluşan görüntü analiz sistemi (DP Controller Olympus Corp. 3.1.1.267) aracılığıyla bilgisayar ekranında kaydedilerek değerlendirildi.

Beyin sapındaki apoptoz oranını belirlemek için 40X objektif ile her kesitteki nöronlar sayılarak TUNEL-pozitif ve anti-kaspaz-3 pozitif hücre sayıları belirlendi. Apoptotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı ve gruplar arasındaki fark analiz edildi.

Elektron mikroskopik inceleme

Dokulardaki ultrastüktürel değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla her gruptaki deneklerden koklea ve 1x1 mm büyüklüğünde temporal korteks örnekleri alındı. Örnekler %2.5'luk gluteraldehid içinde fikse edildi. Koklea örnekleri dekalsifikasyon amacıyla 2 ay EDTA+gluteraldehid solusyonunda bekletildi. %1'lik osmiumtetraoksit içinde postfiksasyon yapıldıktan sonra dereceli alkollerde dehidratasyon işlemleri yapıldı. Doku örnekleri propilen

oksitten geçirildikten sonra araldit içine gömülerek 60°C etüvde polimerizasyon için 48 saat bekletildi. Ultraince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak Zeiss Libra 120 TEM (Jena, Germany) ile incelendi.

Elektron mikroskopik takip prosedürü

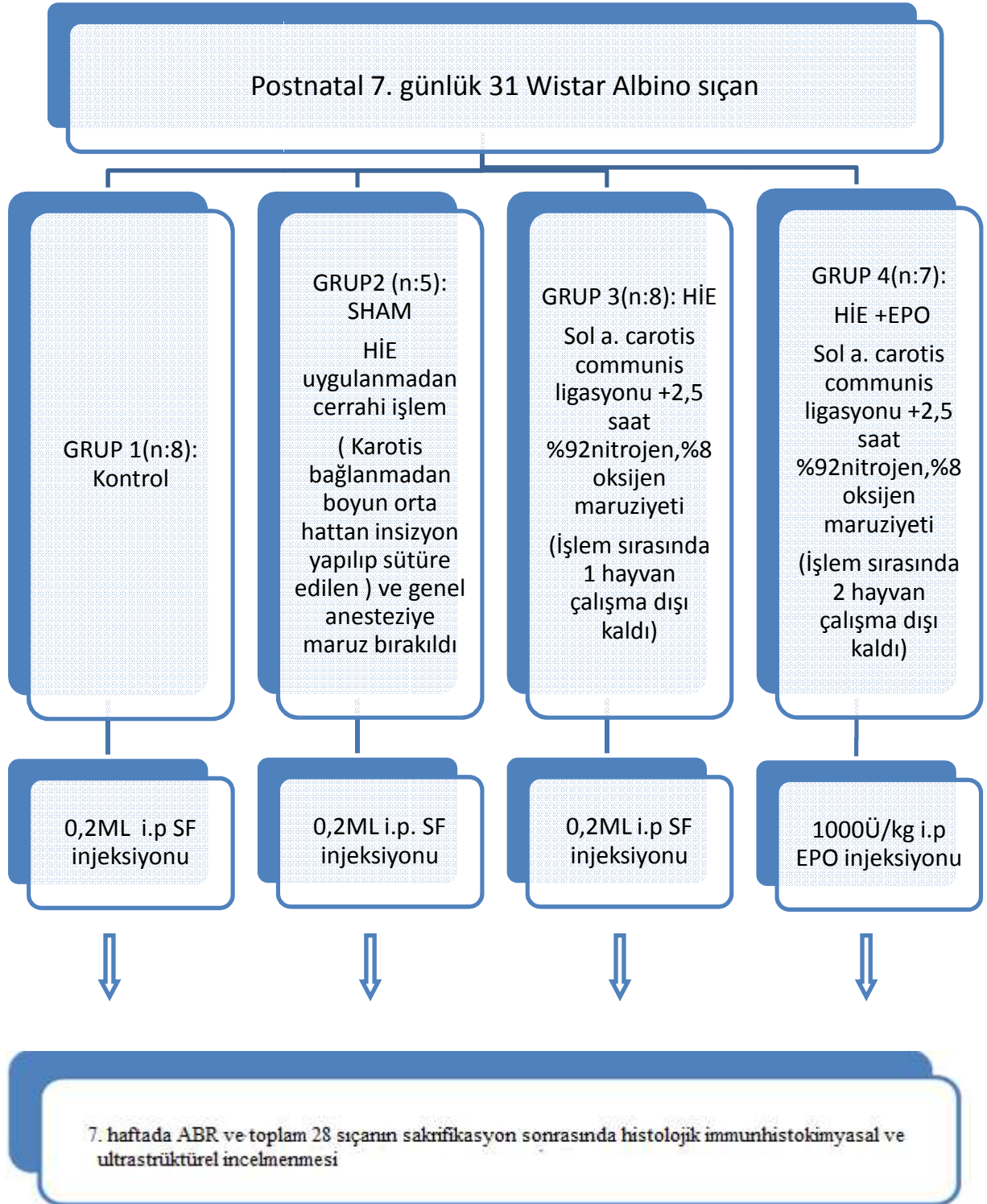
Dokular 48 saat %2,5luk gluteraldehid (kemik için EDTA+gluteraldehid) içerisinde fikse edilmiş, 15 dakika Sorensen fosfat tamponu ile 3 değişimle yıkanmış, Sorensen + osmium tetraoksit içinde 1 saat tutulmuş, tekrar Sorensen fosfat tampon ile 3 değişimli 3 yıkamaya tabi tutulmuştur. Daha sonra sırasıyla %70,%100, %100 alkol içerisinde 10'ar dakika propilen oksit içerisinde iki defa 15 dakika tutulmuş. Bir saat propilen oksit + araldit karışımına maruz bırakılmış, 1 gece saf araldit içerisinde tutulduktan sonra oda sıcaklığında 2 saat ve etüvde 48 saat tekrar araldit ile muamele edilmiştir.

Çalışmanın genel görünümü Tablo 3'te verilmektedir.

3.6 İstatistiksel Analiz

ABR ve ışık mikroskopi sonuçları SPSS 15.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Ölçülebilen veriler arasındaki fark analizi için Bonferonni düzeltmeli Kruskal Wallis Varyans analizi kullanıldı. Grup içi sağ sol kulak ölçüm karşılaştırılmasında Wilcoxon Testi kullanıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ anlamlılık kabul edildi.

Tablo 3. Çalışma metodu



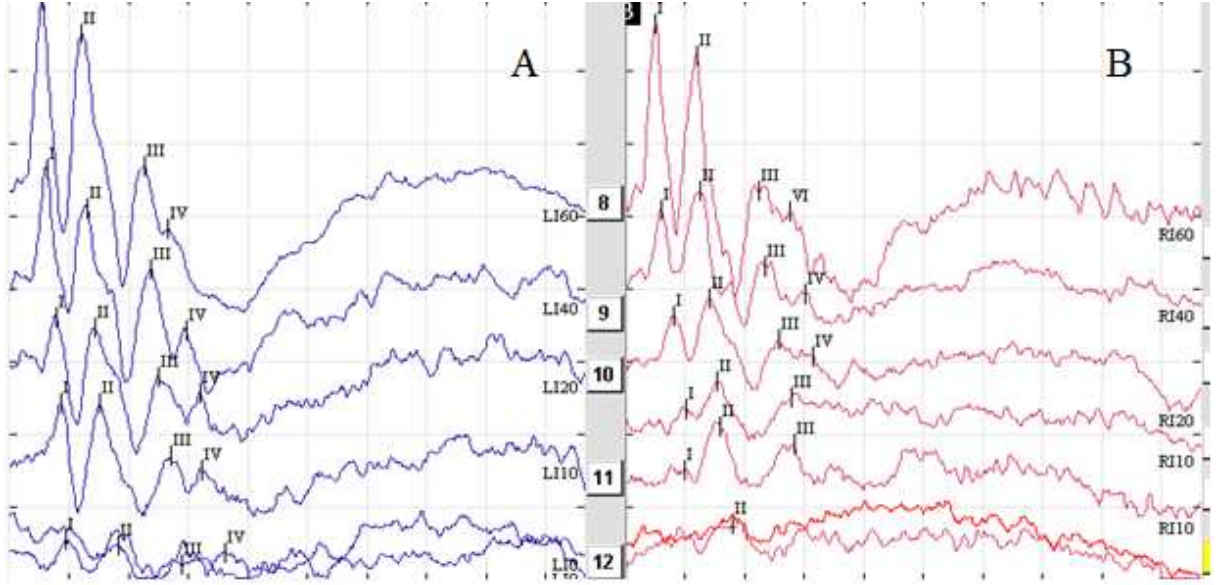
4.BULGULAR

4.1 ABR ölçüm değerleri

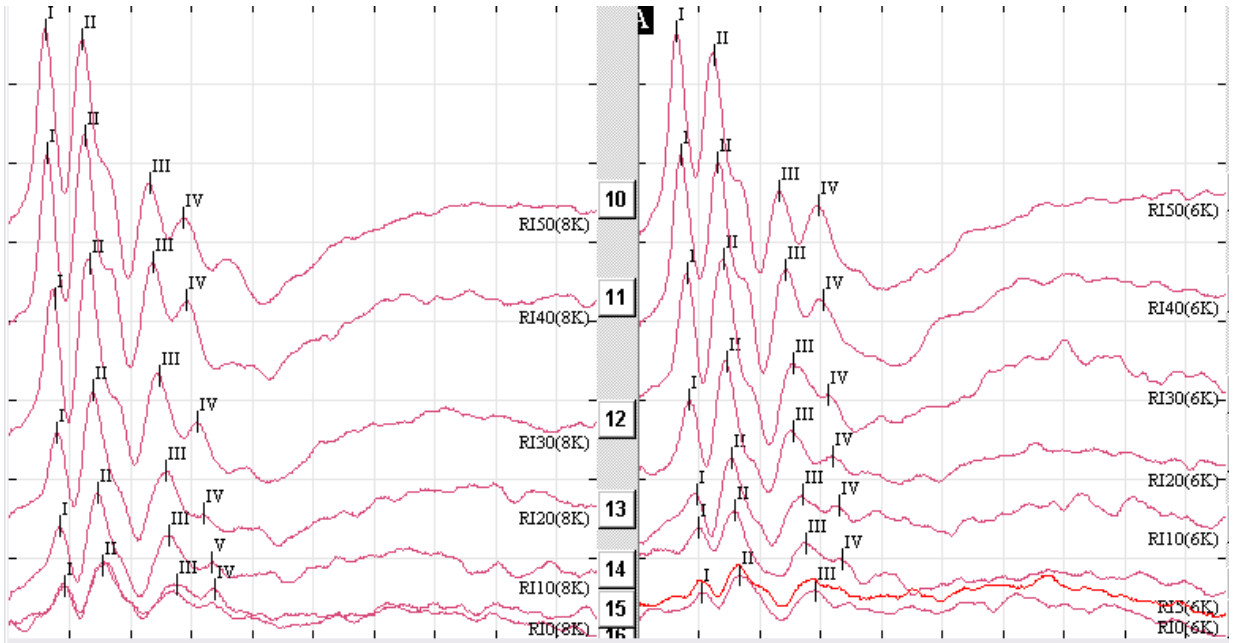
Tablo 4. Kontrol grubu ABR ölçüm değerleri

<i>Kontrol</i>	<i>Klik</i>		<i>6Khz</i>		<i>8Khz</i>	
	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>
<i>1. sıçan</i>	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>2. sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>3. sıçan</i>	<i>5</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>0</i>	<i>5</i>
<i>4.sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>5.sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>6.sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>7.sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>8.sıçan</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

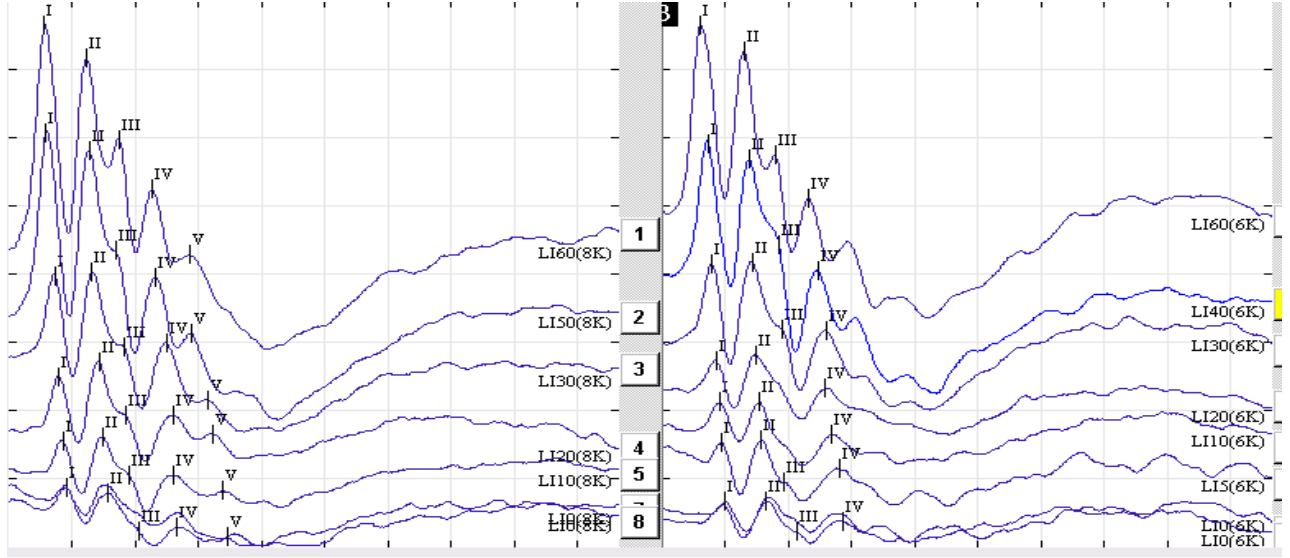
Kontrol grubunun sağ ve sol kulak ABR değerleri kendi içinde Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında, klik uyarı (p:0,655), 6 kHz uyarı (p:0.317) ve 8 kHz uyarı (p:0.317) ile elde edilen yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır.



Şekil 11. Kontrol grubu sol ve sağ kulak klik ABR örneği. (A sol, B sağ)



Şekil 12. Kontrol grubu sağ kulak 6 ve 8 kHz ABR örneği

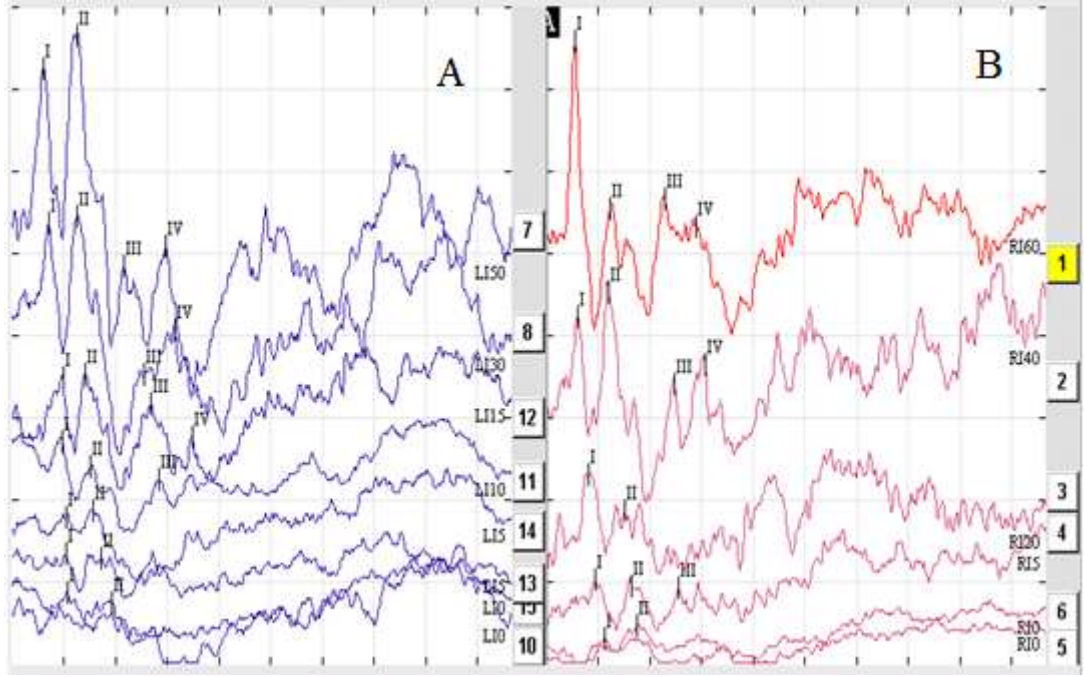


Şekil 13. Kontrol grubu sol kulak 6 kHz ve 8 kHz ABR örneği

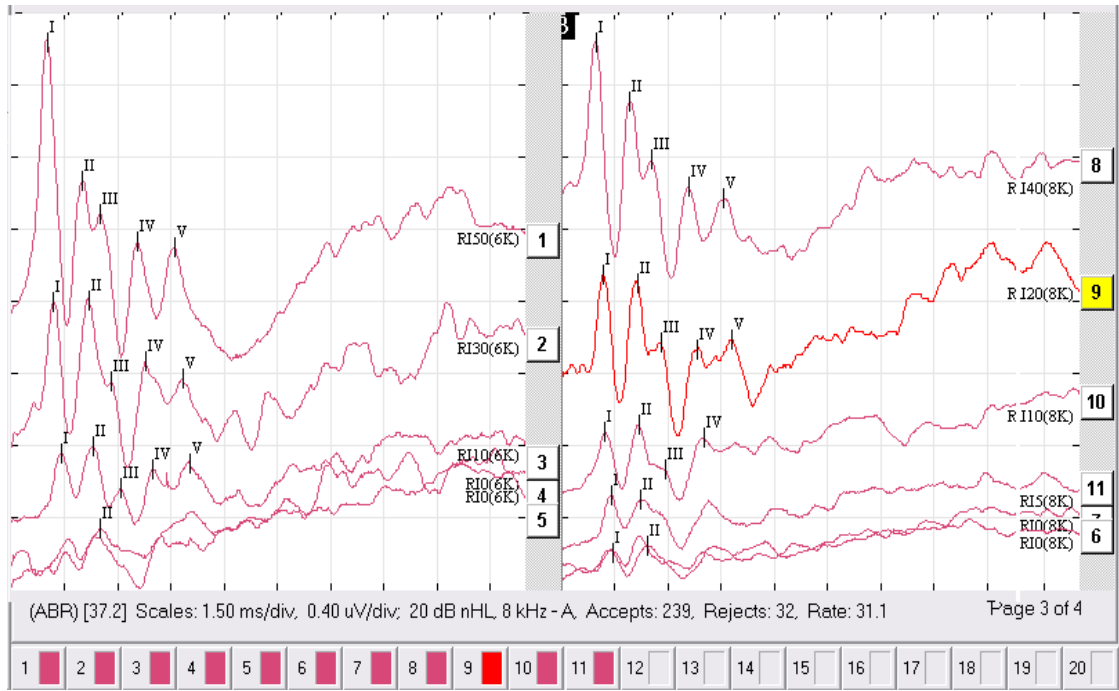
Tablo 5. Sham grubu ABR ölçüm değerleri

<i>Sham</i>	<i>Klik</i>		<i>6Khz</i>		<i>8Khz</i>	
	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>
<i>1. sıçan</i>	0	0	0	0	0	0
<i>2. sıçan</i>	5	0	0	0	0	0
<i>3. sıçan</i>	0	0	0	0	0	0
<i>4. sıçan</i>	0	0	0	0	0	0
<i>5. sıçan</i>	0	0	0	0	0	0

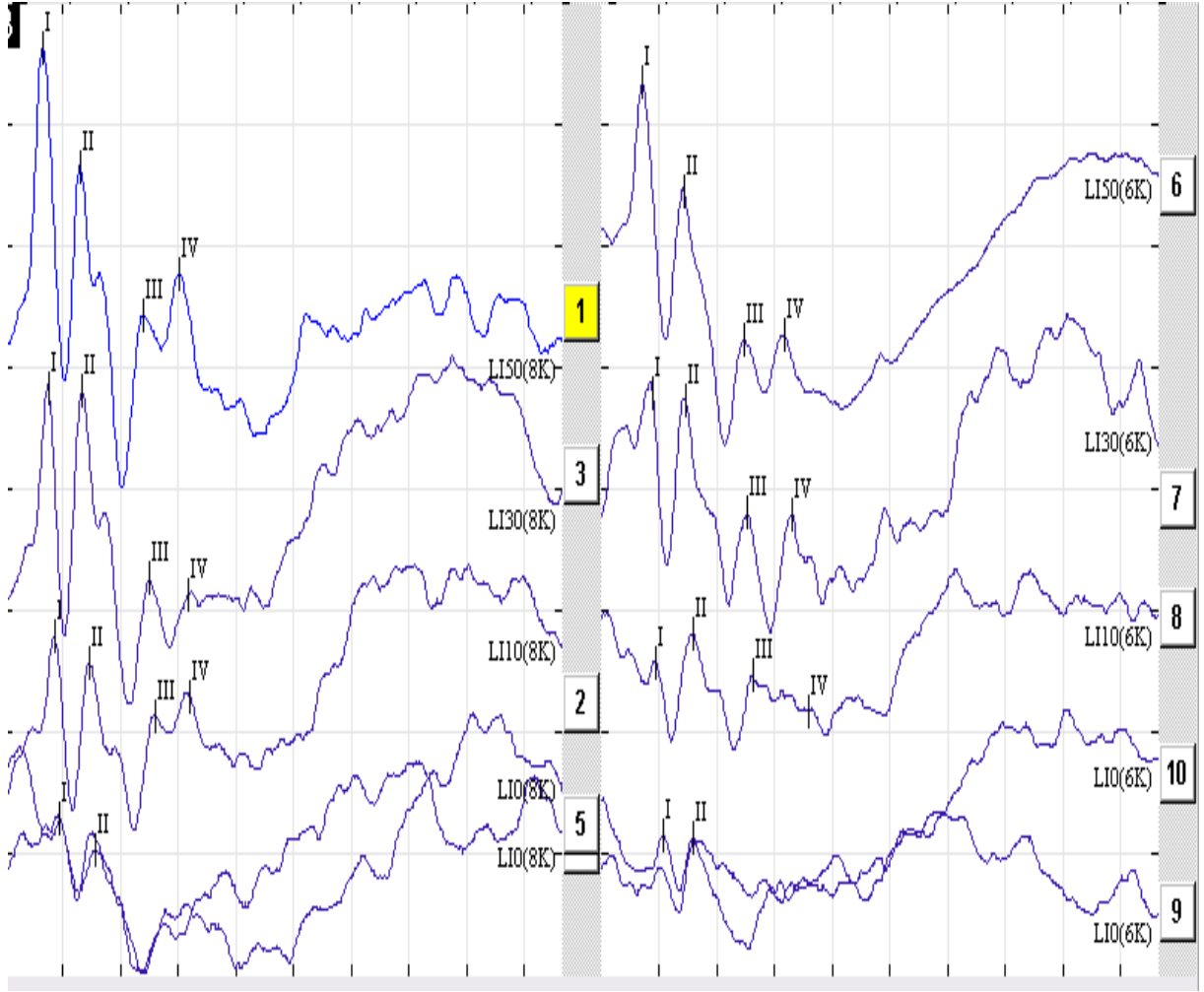
Sham grubunun sağ ve sol kulak ABR değerleri kendi içinde Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında; klik uyarı (p:0,317), 6 kHz uyarı (p:1,000) ve 8 kHz uyarı (p:1,000) ile elde edilen yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır



Şekil 14. Sham grubu klik ABR örneği (A sol, B sağ)



Şekil 15. Sham grubu sağ kulak 6 ve 8 kHz ABR örneği

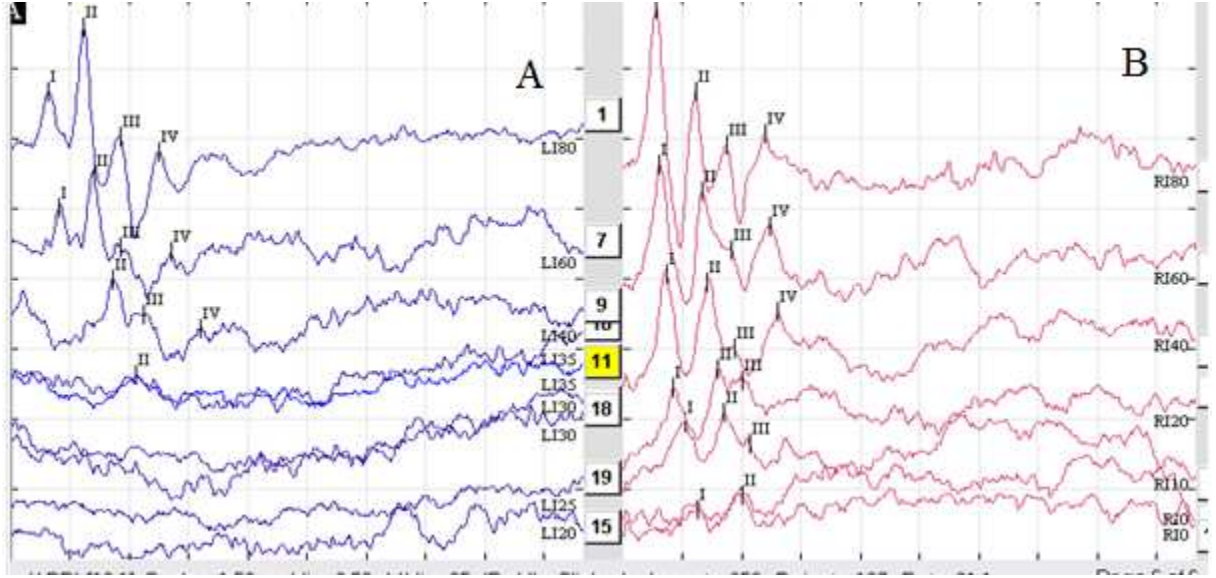


Şekil 16. Sham grubu sol kulak 6 ve 8 kHz ABR örneği

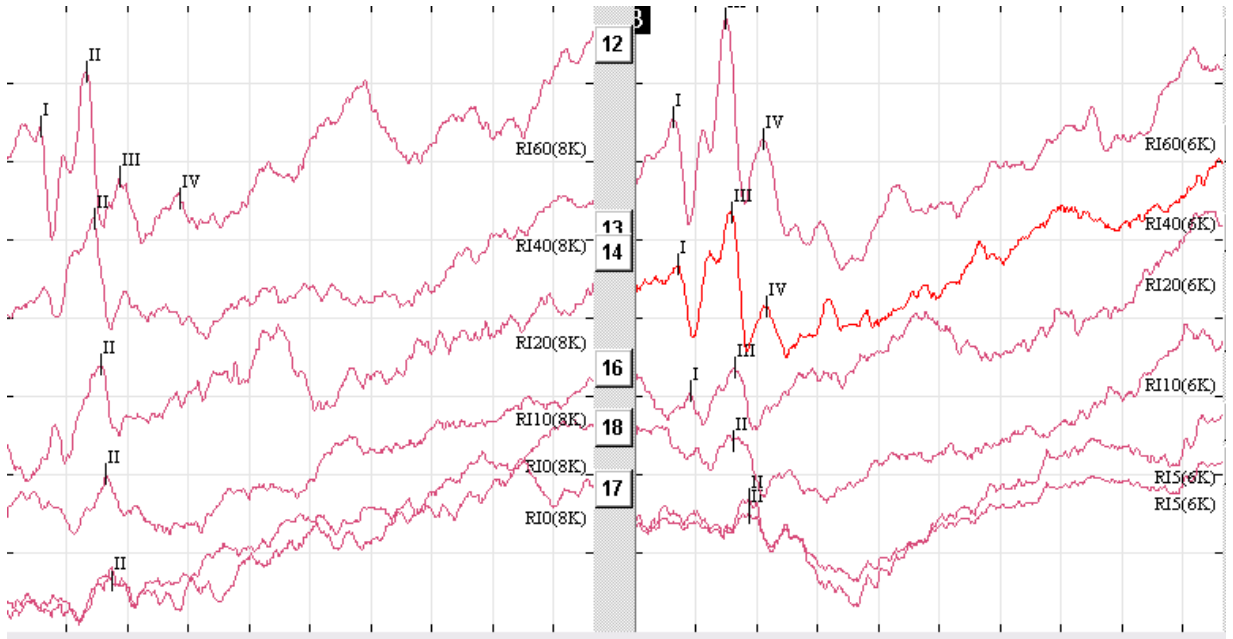
Tablo 6. HİE grubu ABR ölçüm değerleri

<i>HİE</i>	<i>Klik</i>		<i>6Khz</i>		<i>8Khz</i>	
	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>	<i>Sol</i>	<i>Sağ</i>
<i>1. sıçan</i>	<i>20</i>	<i>0</i>	<i>15</i>	<i>5</i>	<i>30</i>	<i>5</i>
<i>2. sıçan</i>	<i>35</i>	<i>0</i>	<i>30</i>	<i>0</i>	<i>25</i>	<i>0</i>
<i>3. sıçan</i>	<i>5</i>	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>0</i>
<i>4.sıçan</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>5</i>	<i>5</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>5.sıçan</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>6.sıçan</i>	<i>25</i>	<i>25</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>5</i>	<i>5</i>
<i>7.sıçan</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>0</i>
<i>8.sıçan</i>	<i>5</i>	<i>30</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

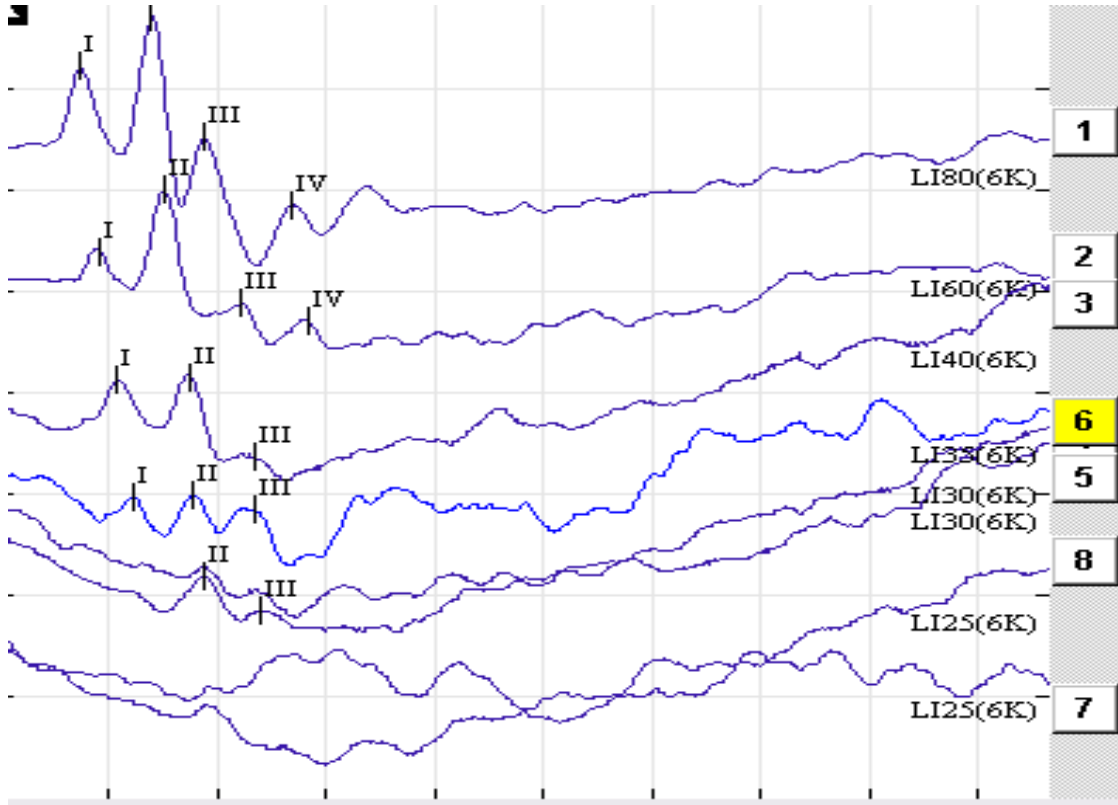
HİE grubunun sağ ve sol kulak ABR değerleri kendi içinde Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında, klik uyarı (p:0,462), 6 kHz uyarı (p:0,066) ve 8 kHz uyarı (p:0,066) ile elde edilen yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır.



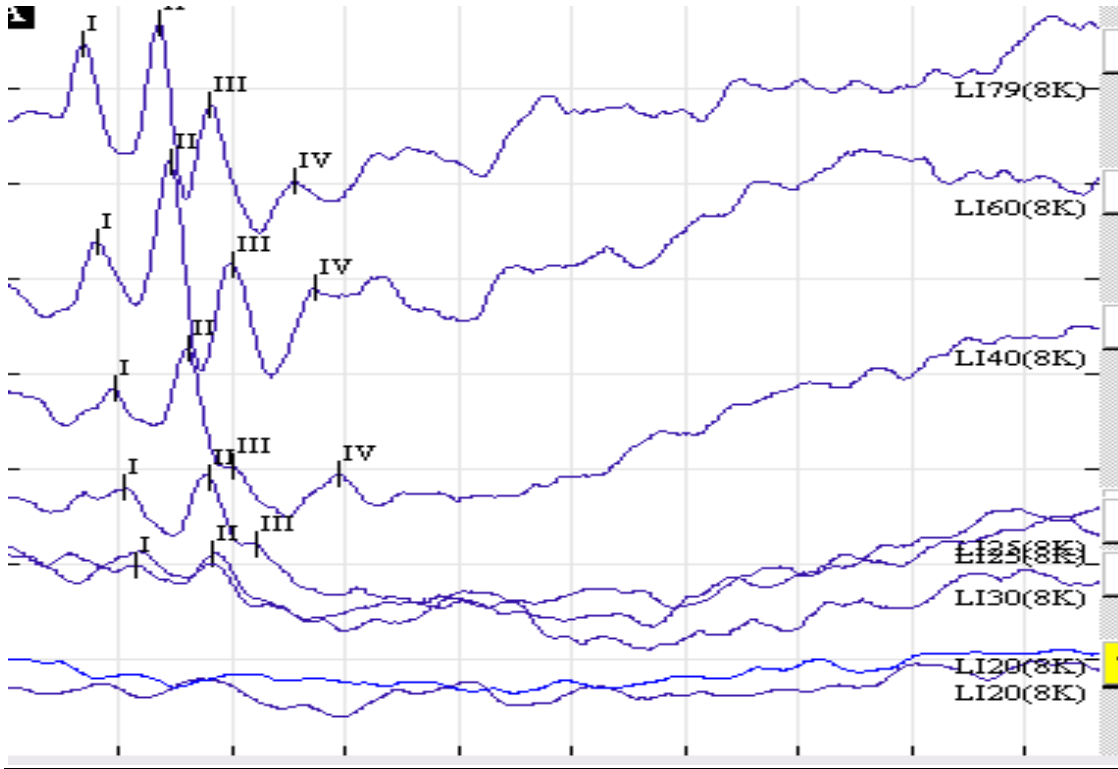
Şekil 17. HİE grubu sağ ve sol kulak klik ABR örneği (A sol, B sağ)



Şekil 18. HİE grubu sağ kulak 6 ve 8 kHz ABR örneği



Şekil 19. HİE grubu sol kulak 6 kHz ABR örneği

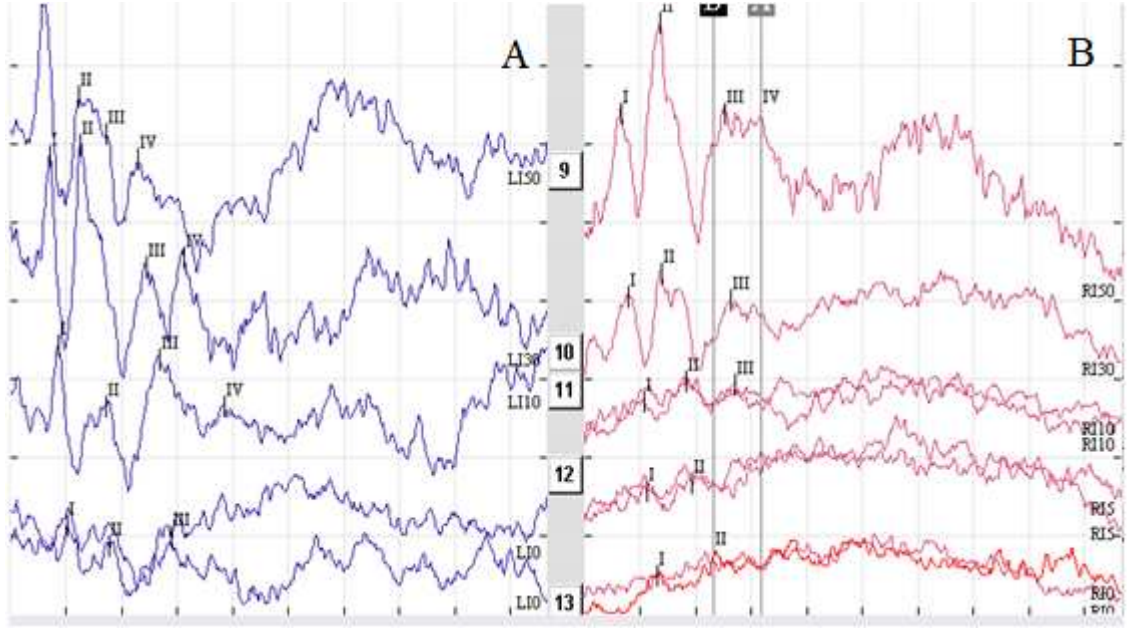


Şekil 20. HİE grubu 8 kHz sol kulak ABR örneği

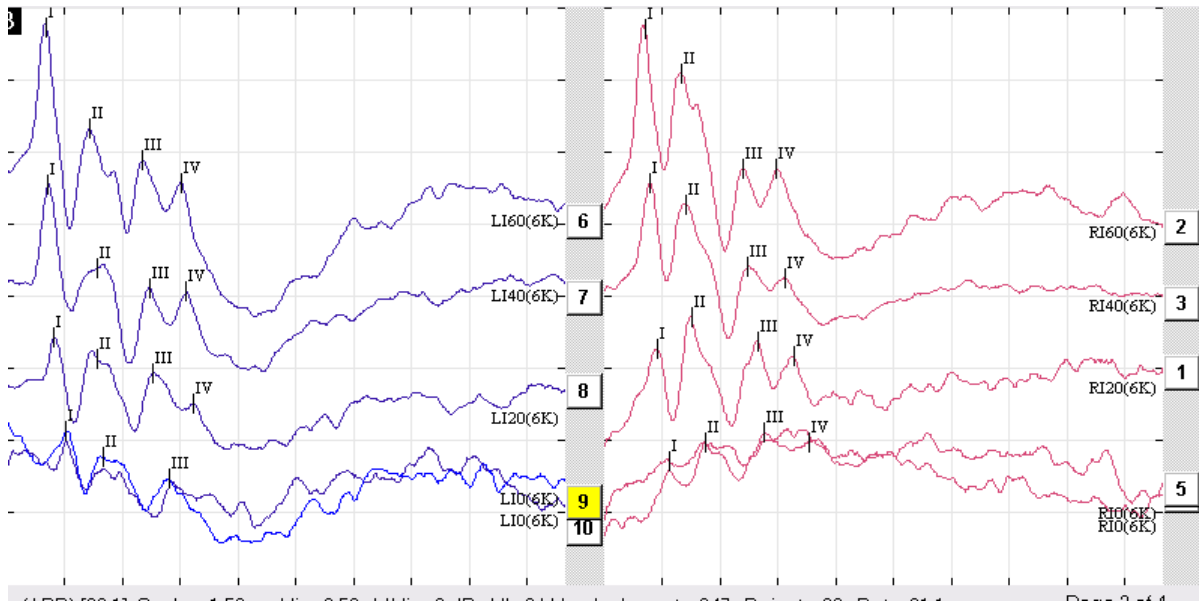
Tablo 7. HİE + EPO grubu ABR ölçüm değerleri

HİE +EPO	Klik		6Khz		8Khz	
	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ
1. sıçan	15	0	0	0	5	0
2. sıçan	0	0	0	0	0	0
3. sıçan	0	5	0	0	0	0
4.sıçan	0	0	0	0	0	0
5.sıçan	0	0	0	0	0	0
6.sıçan	0	0	0	0	0	0
7.sıçan	5	0	0	0	0	0

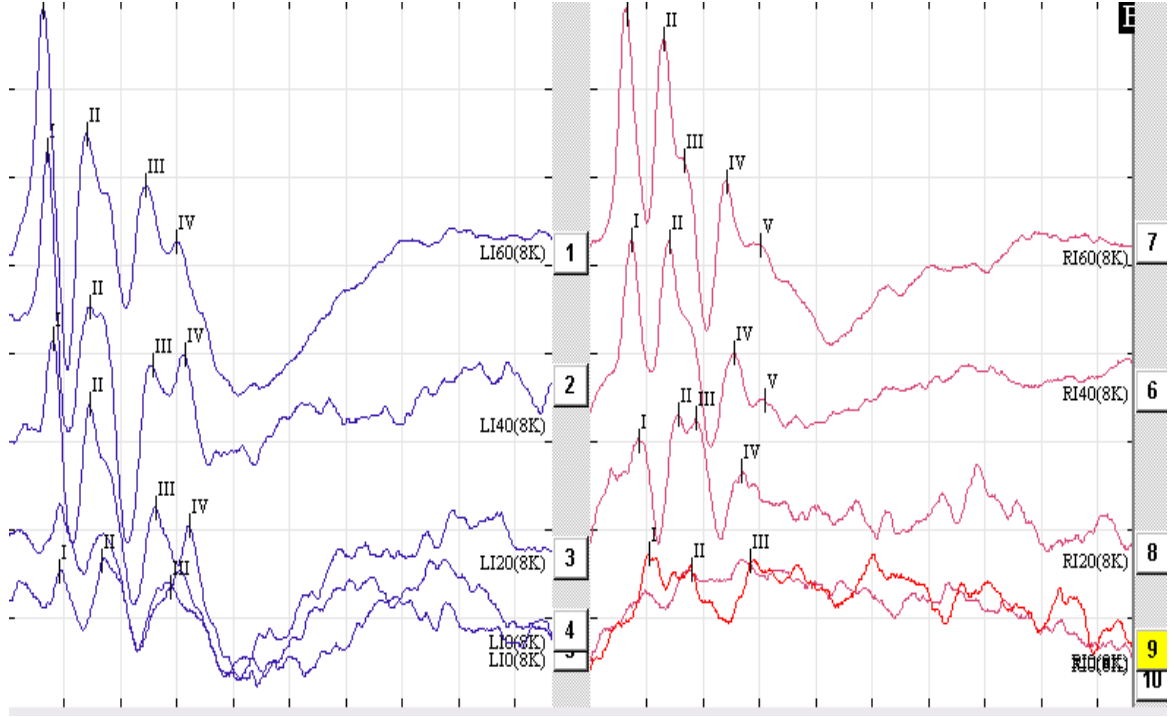
HİE+ EPO grubunun sağ ve sol kulak ABR değerleri kendi içinde Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında; klik uyaran (p:1,000), 6 kHz uyaran (p:1,000) ve 8 kHz uyaran (p:0,317) ile elde edilen yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır.



Şekil 21. HİE+EPO grubu klik sağ ve sol kulak ABR ölçümü (A sol, B sağ)



Şekil 22. HİE +EPO grubu sağ ve sol kulak 6 kHz ABR örneği



Şekil 23. HİE +EPO grubu sağ ve sol kulak 8 kHz ABR örneği

Tablo 8.Sol kulaklar için ABR değerlerinin istatistiksel analizi

GRUP		Klik	6kHz Ton burst	8kHz Ton burst
Grup 1 Kontrol Sol kulak	Ortalama (±) standart hata	0,63 ± 0,625	0 ± 0	0 ± 0
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/5	0/0	0/0
Grup 2 Sham Sol kulak	Ortalama ± standart hata	1,00 ± 1,00	0 ± 0	0 ± 0
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/5	0/0	0/0
Grup 3 HİE Sol kulak	Ortalama ± standart hata	16,25 ± 4,09	10,63 ± 3,4	8,75 ± 4,1
	Median	15,00	10,00	5,00
	Minumum/maksimum değerler	5/35	0/30	0/30
Grup 4 HİE+EPO Sol kulak	Ortalama ± standart hata	2,86 ± 2,14	0 ± 0	0,71 ± 0,71
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/15	0/0	0/5
Kruskal-Wallis Testi (p)		0,001	0,000	0,009

Gruplar arasında sol kulak ABR sonuçları incelendiğinde klik, 6 kHz ve 8kHz ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Farkın HİE grubunun değerlerinin yüksek olmasından kaynaklandığı görülmüştür. HİE+EPO grubu ile kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır.

Tablo 9.Sağ kulaklar için ABR değerlerinin istatistiksel analizi

GRUP		Klik	6kHz Ton burst	8kHz Ton burst
Grup 1 Kontrol Sağ kulak	Ortalama ± standart hata	1,25 ± 1,25	0,63 ± 0,62	0,63 ± 0,62
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/10	0/5	0/5
Grup 2 Sham Sağ kulak	Ortalama ± standart hata	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/0	0/0	0/0
Grup 3 HİE Sağ kulak	Ortalama ± standart hata	10,63 ± 4,1	2,5 ± 1,3	1,25 ± 0,8
	Median	7,50	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/30	0/10	0/5
Grup4 HİE+EPO Sağ kulak	Ortalama ± standart hata	0,71 ± 0,71	0 ± 0	0 ± 0
	Median	0,00	0,00	0,00
	Minumum/maksimum değerler	0/5	0/0	0/0
Kruskal-Wallis Testi(p)		0,025	0,141	0,382

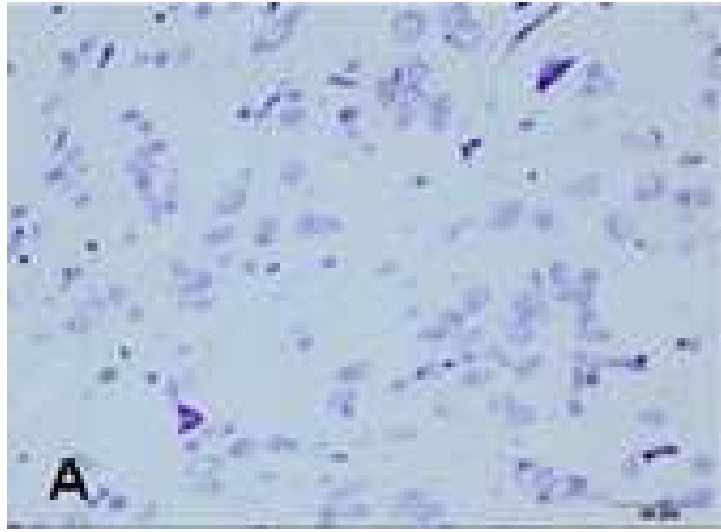
Gruplar arasında sağ kulak ABR ölçümleri incelendiğinde klik ABR ölçümlerinde anlamlı farklılık saptanmıştır. Farkın HİE grubunun değerlerinin yüksek olmasından kaynaklandığı görülmüştür. HİE+EPO grubu ile kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır.

4.2 Histolojik inceleme sonuçları

Işık mikroskopi sonuçları

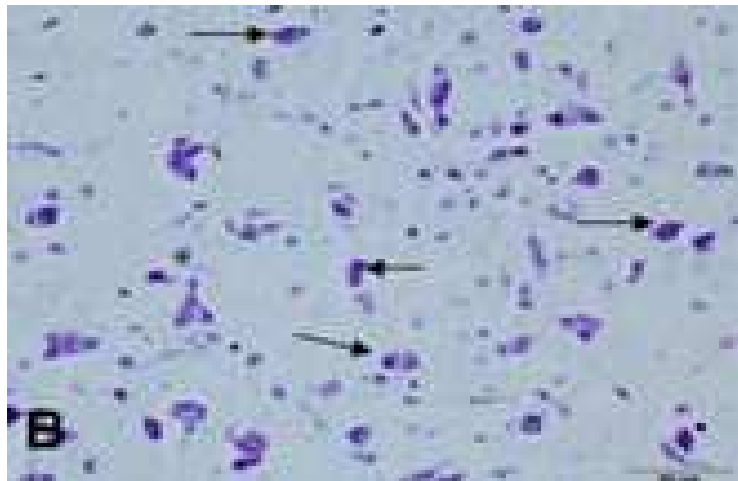
Beyinsapı krezil violet boyaması

Kontrol ve Sham grubu (Grup1, 2) örneklerinden alınan kesitlerde normal histolojik yapılar gözlemlendi; buna göre nöronlar normal görünümde, hücre sınırları belirgin, hücre zarı bütünlüğü korunmuştu (Resim 6).



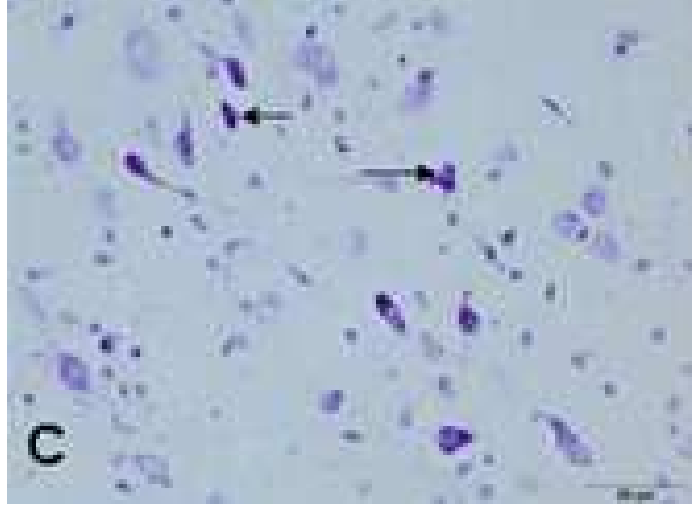
Resim 6. Beyin sapı kesiti; normal yapıda nöronlar

HİE grubu (Grup 3) örneklerinden alınan kesitlerde nöron boyutlarının küçüldüğü ve daha koyu boyanan piknotik nöronların yapıya hakim olduğu izlendi (Resim 7).



Resim 7. Beyin sapı kesiti; nöronlarda büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik, piknotik yapılanma (okla işaretli hücreler)

HİE+EPO grubu (Grup 4) örneklerinden alınan kesitlerde ise hücrelerin çoğunluğunu normal nöronlar oluşturmaktaydı, piknotik nöron sayısı çok azdı (Resim 8)



Resim 8. Beyin sapı kesiti; normal nöronların arasında az sayıda piknotik nöron (okla işaretli)

TUNEL tekniği ile beyinsapı hücrelerinde apoptoz değerlendirilmesi

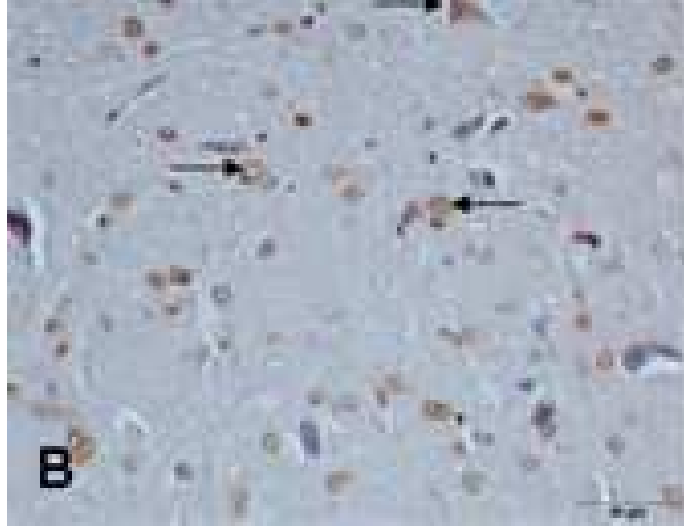
Apoptoz oranını belirlemek için TUNEL tekniği ile boyanan kesitlerde TUNEL-pozitif hücreler sayılarak değerlendirildi. Apoptotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı ve gruplar arasındaki fark analiz edildi.

Kontrol ve Sham grubu (Grup1, 2) örneklerinden alınan kesitlerde TUNEL tekniği ile boyama sonucunda normal histolojik yapı gözlemlendi (Resim 9).



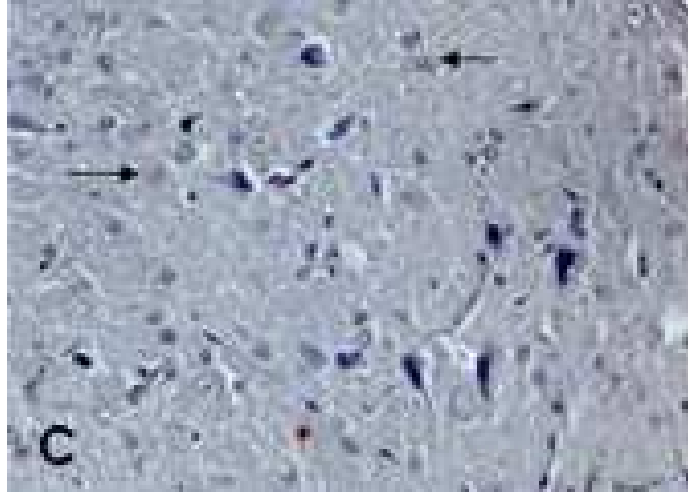
Resim 9.Beyinsapı; TUNEL negatif normal nöronlar

HİE grubu (Grup 3) örneklerinden TUNEL tekniği ile boyama yapılan kesitlerde TUNEL pozitif apoptotik hücreler gözlemlendi (Resim 10)



Resim 10. Beyinsapı kesiti; TUNEL pozitif hücreler (okla işaretli)

HİE+EPO grubu (Grup 4) örneklerinden TUNEL tekniği ile boyama yapılan kesitlerde Grup 3'e göre daha az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücreler gözlemlendi (Resim 11)

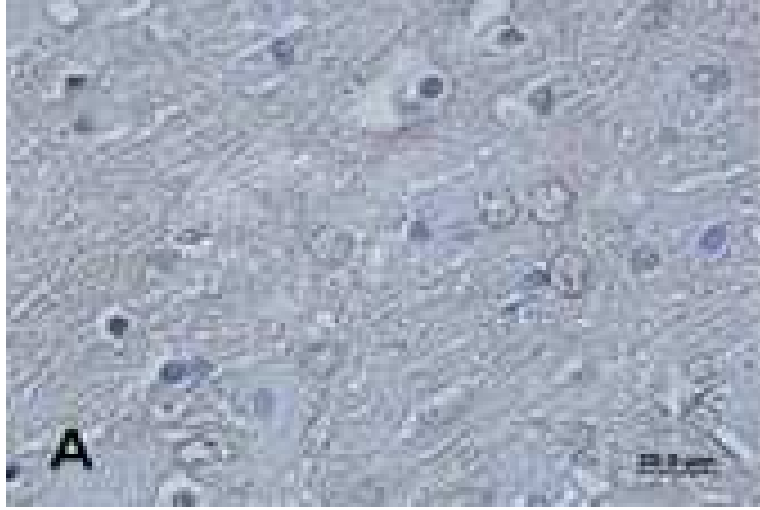


Resim11. Beyinsapı kesiti; normal nöronların arasında az sayıda TUNEL pozitif hücreler (okla işaretli)

Beyinsapı kesitlerinde Kaspaz-3 immunhistokimyasal boyama sonuçları

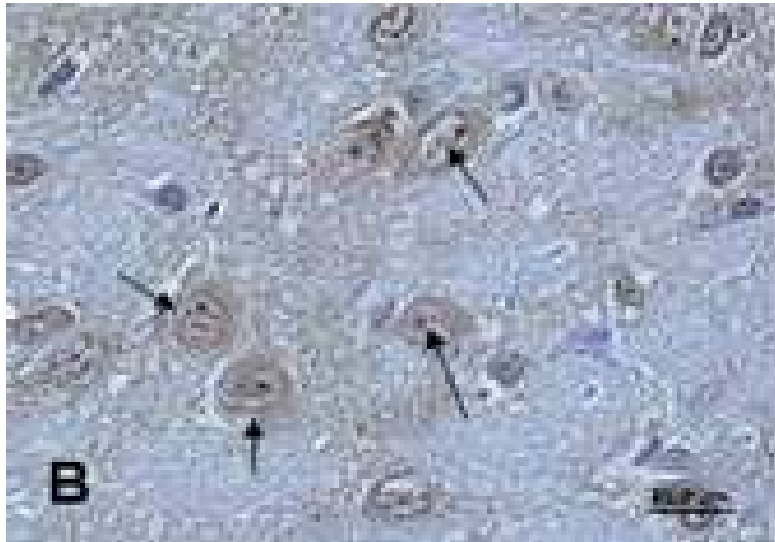
TUNEL boyama ile belirlenen apoptozu desteklemek için kesitlere Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama uygulandı.

Kontrol ve Sham grubu (Grup1,2) örneklerinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 immunhistokimyasal boyama sonucunda normal nöron yapısı gözlemlendi (Resim 12).



Resim 12. Beyin sapı kesit; Kaspaz-3 boyama ile normal nöronlar

HİE grubu (Grup 3) örneklerinden alınan kesitlerde Kaspaz -3 immunhistokimyasal boyama sonucunda apoptotik Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Resim 13)



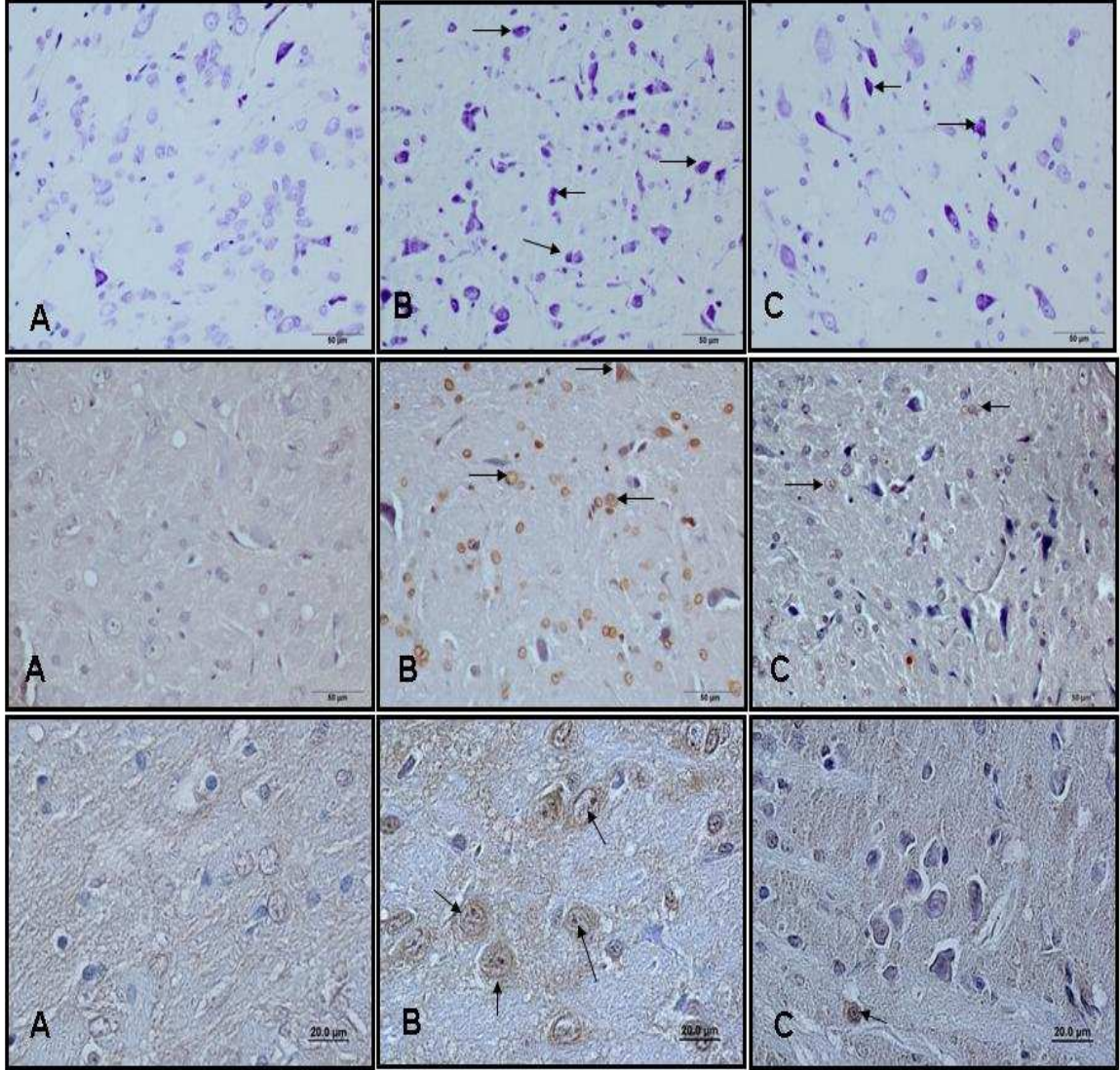
Resim 13. Beyinsapı kesit; Kaspaz-3 pozitif apoptotik nöronlar (okla işaretli)

HİE+EPO grubu (Grup 4) örneklerinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 immunhistokimyasal boyama sonucunda normal nöronların arasında çok daha az sayıda apoptotik Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Resim 14).



Resim 14.Beyinsapı kesiti; Normal nöron yapıları arasında az sayıda Kaspaz-3 pozitif hücre (okla işaretli)

Resim 15 'te tüm grupların krezil violet, TUNEL ve Kaspaz-3 boyama görüntüleri bir arada verilmiştir.

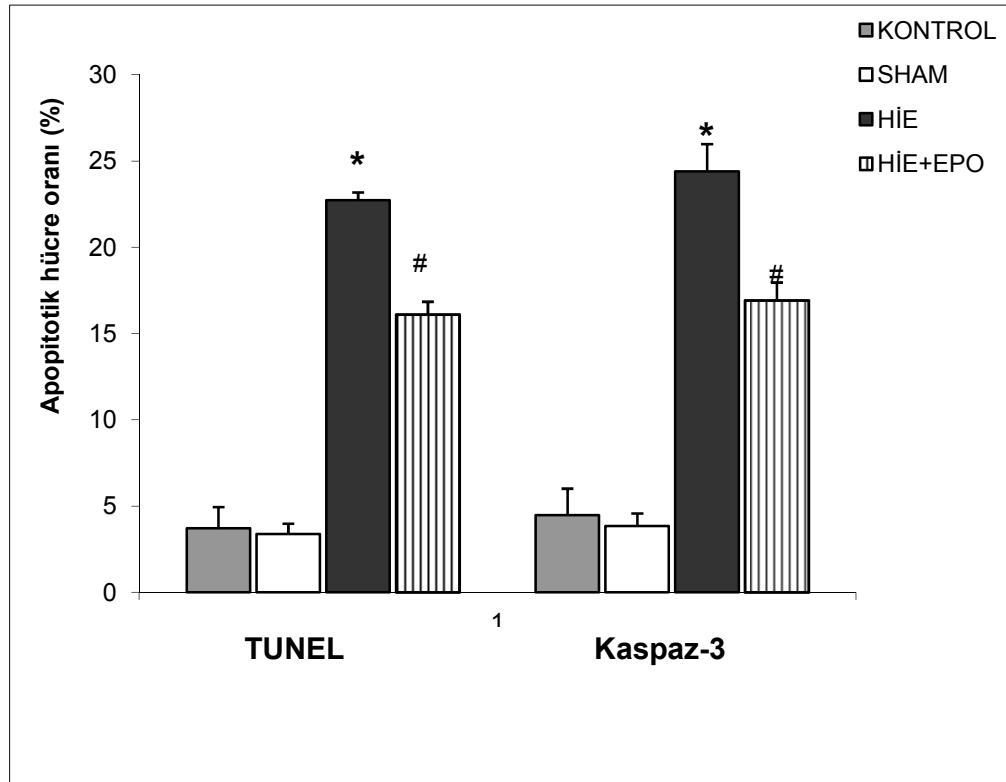


Resim 15.Beyin sapı histolojik görüntüleri. A; kontrol grubu, B; HİE grubu, C; EPO grubu. Üst sıra; krezil violet boyama, oklar küçülmüş ve koyu boyanan piknotik nöronları göstermektedir. Orta sıra TUNEL boyama, oklar TUNEL-pozitif hücreleri göstermektedir. Alt sıra Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama, oklar Kaspaz-3 pozitif hücreleri göstermektedir.

Apoptotik hücre oranları arasındaki farklılık

Apoptoz oranını belirlemek için TUNEL tekniği ile boyanan kesitlerde TUNEL pozitif hücreler sayılarak değerlendirildi. Apoptotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı ve gruplar arasındaki fark analiz edildi. Yapılan değerlendirme sonucunda, HİE grubunda apoptotik hücre oranı kontrol, sham ve HİE+EPO gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). Kontrol ve sham grupları arasında ise anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). HİE+EPO grubunda ise apoptotik hücre oranı HİE grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 24).

TUNEL boyama ile belirlenen apoptozu desteklemek için kesitlere Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama uygulandı. TUNEL boyamada değerlendirilen şekilde hücre sayımları yapılarak yüzde oran cinsinden Kaspaz-3 pozitif hücre sayıları belirlendi ve analiz edildi. Değerlendirme sonucunda, HİE grubunda Kaspaz-3 pozitif hücre oranı kontrol, sham ve HİE+EPO gruplarına oranla anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Kontrol ve sham grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). HİE+EPO grubunda kaspaz-3 pozitif hücre oranı HİE grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 24).



Şekil 24. Apoptotik hücre oranları

* $p<0.05$, kontrol, Sham ve Epo grubuna göre anlamlı olarak farklı.

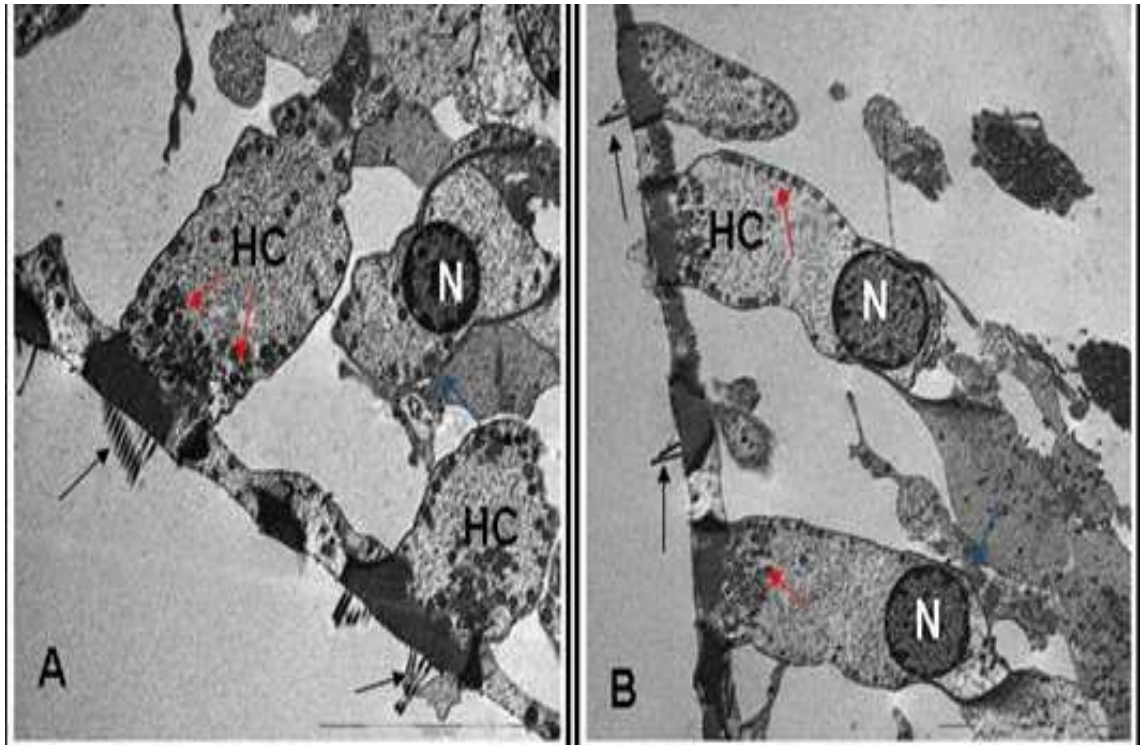
$p>0.05$, HİE grubuna göre anlamlı olarak farklı.

Elektron mikroskopik bulgular

Sağ ve sol koklea, spiral ganglion ve temporal lob örnekleri elektron mikroskopik olarak incelenmiş, incelenen materyellerde sağ ve sol taraftaki bulgular morfolojik olarak benzerlik göstermektedir.

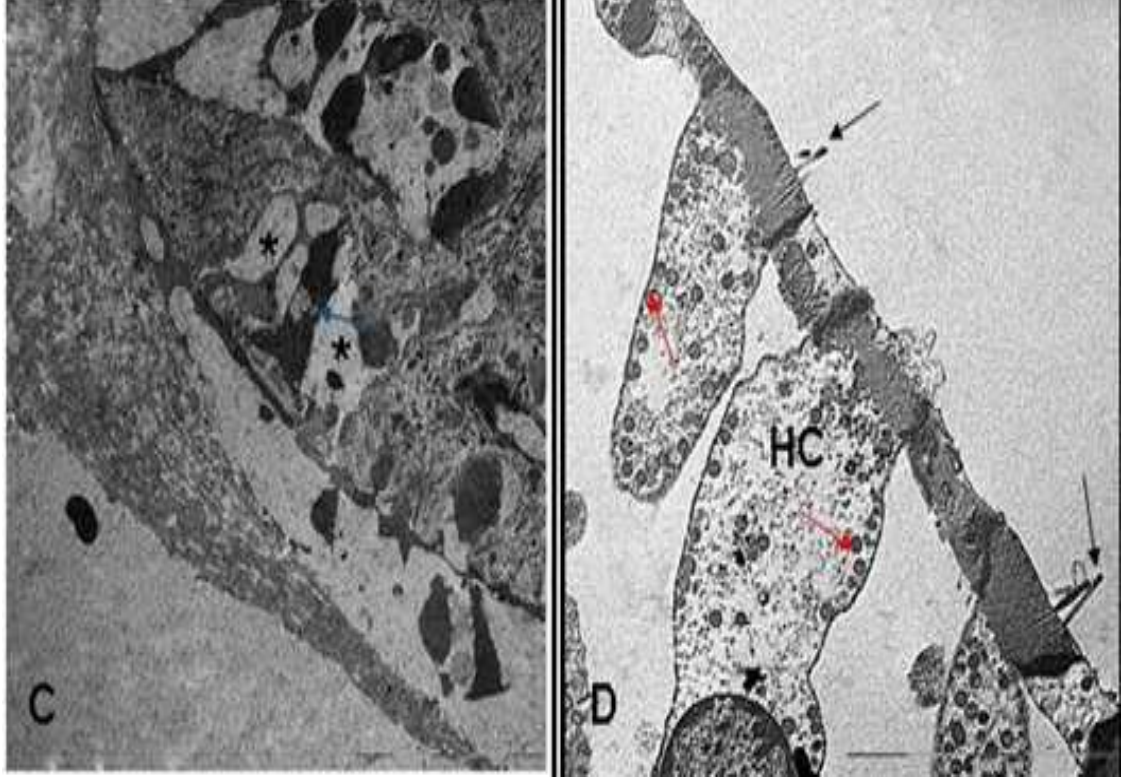
Koklea örneklerinin elektron mikroskopik inceleme bulguları

Kontrol ve Sham gruplarında (Grup 1, 2) elektronmikroskopik inceleme sonucunda tüysü hücrelerin normal morfolojik özelliklere sahip oldukları görüldü. Hücre membranı ve çekirdek sınırlarının düzgün olduğu, kromatin dağılımının normal, sitoplazmanın homojen özellikte ve mitokondri yapılarının normal özellikte olduğu izlendi (Resim 16).



Resim 16. Tüylü hücrelerin elektron mikroskopik görüntüleri. **A;** Kontrol, **B;** Sham. Kontrol ve sham gruplarında, normal tüylü hücreler (HC), çekirdek sınırları düzgün (N), hücre membranı ve hücresel bağlantılar normal (mavi oklar), silia (siyah oklar) ve mitokondriler (kırmızı oklar) normal, Bar= 10000 nm.

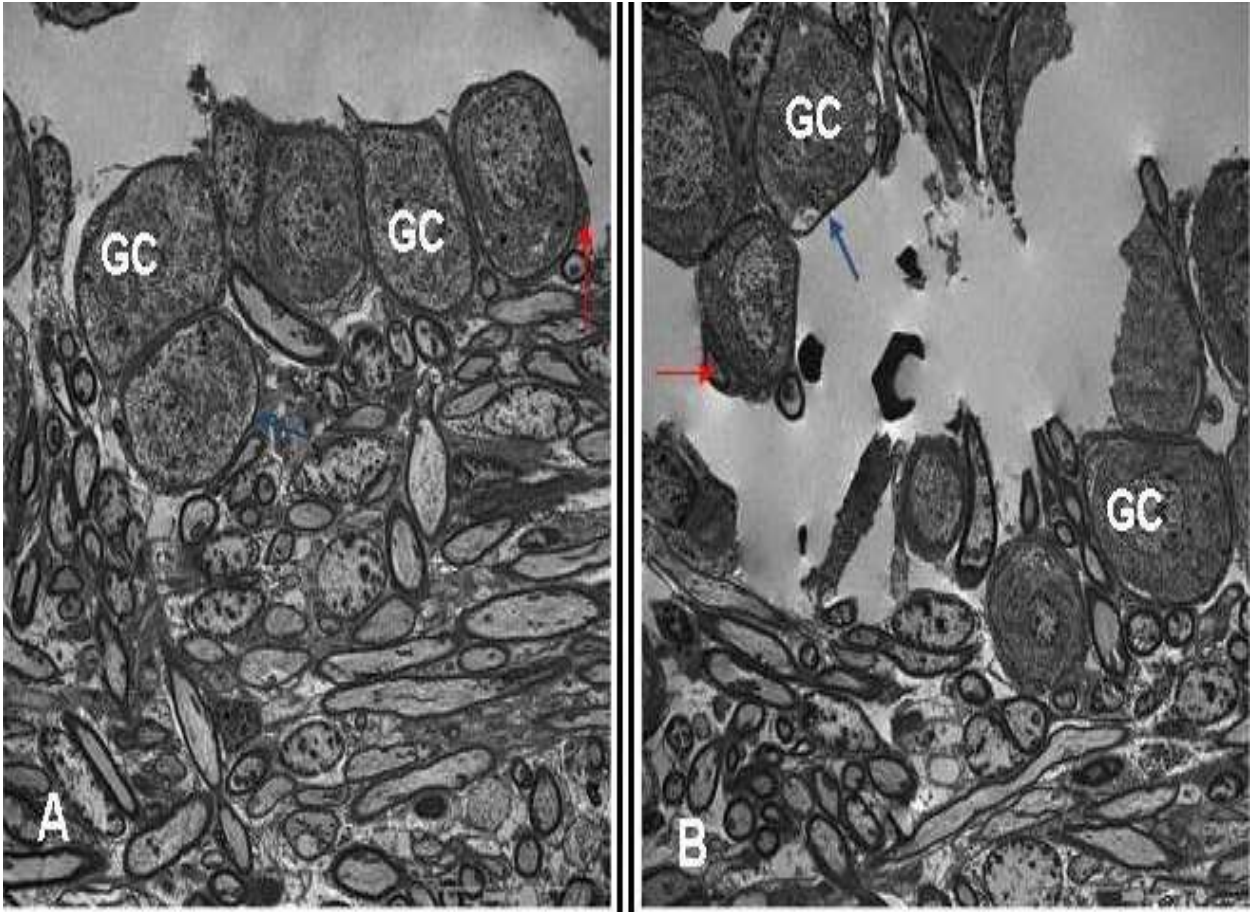
HİE grubunda (Grup 3) ise elektron mikroskopik incelemede tüysü hücre yapılarının bozulduğu gözlemlendi. Hücre sınırlarının bozulduğu ve hücrelerde dejenerasyon olduğu izlendi. HİE+EPO grubunda (Grup 4) ise hücresel yapıların korunduğu, bulguların kontrol ve sham grupları ile benzer özelliklerde olduğu gözlemlendi (Resim 17).



Resim 17. C; HİE, D; HİE+EPO grubu. HİE grubunda hücre sınırlarının bozulduğu (mavi ok), hücrelerde dejeneratif boşluklar (yıldızlar) ve silia kaybı izleniyor. **EPO grubunda** hücreler (HC), mitokondri yapıları (kırmızı oklar) ve silialar (siyah oklar) kontrol ve sham gruplarında olduğu gibi normal yapıda izleniyor. Bar= 10000 nm.

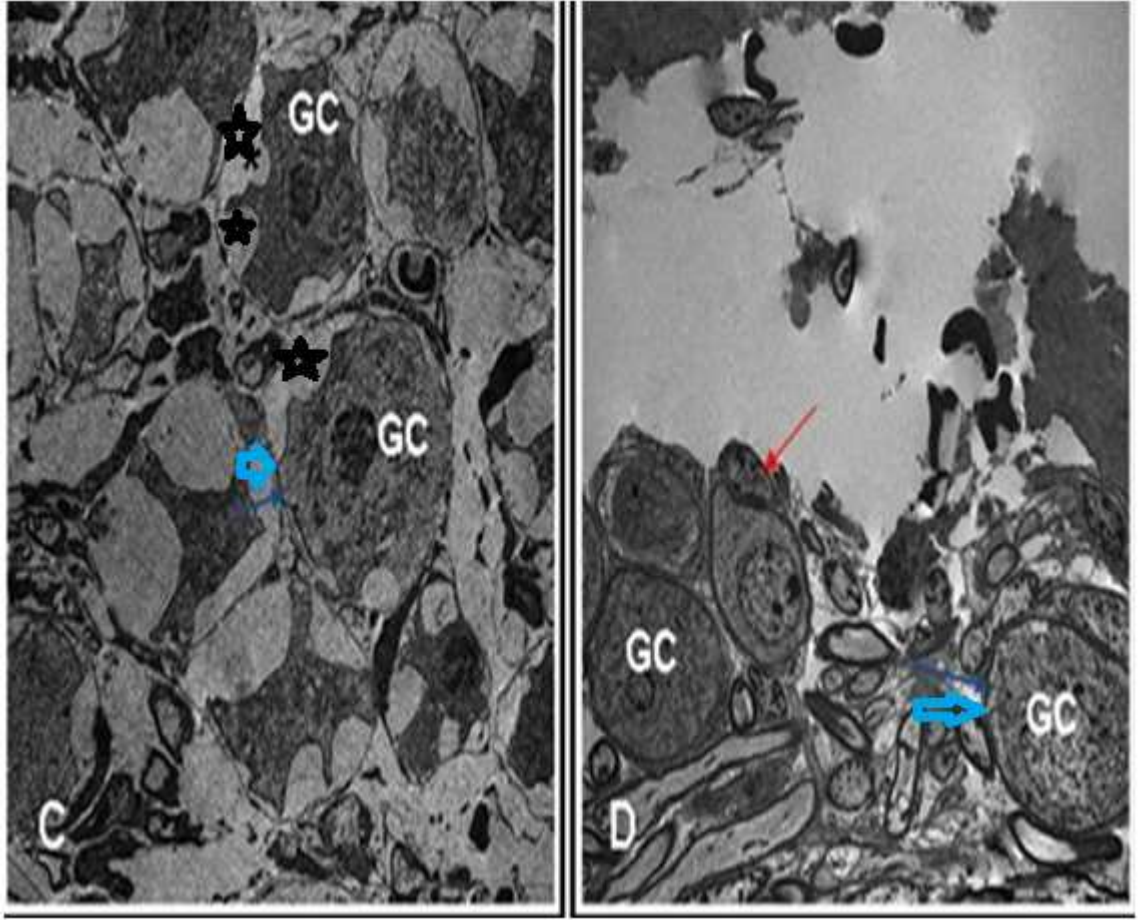
Spiral ganglion hücrelerinin elektron mikroskopik inceleme bulguları

Kontrol ve Sham gruplarının (Grup 1, 2) spiral ganglion hücrelerinin elektron mikroskopik incelenmesi sonucunda benzer özelliklerde olduğu görüldü. Bu gruplarda ganglion hücre yapılarının normal olduğu, hücre şekli ve sınırlarının düzgün olduğu, satellit hücrelerin normal olduğu izlendi (Resim 18).



Resim 18. Spiral ganglion elektron mikroskopik görüntüleri. A; kontrol, B; Sham, Kontrol ve Sham gruplarında, normal ganglion hücreleri (GC), hücre membranları düzgün (mavi oklar), satellit hücre yapıları normal (kırmızı oklar) olarak izleniyor. Bar= 20000 nm.

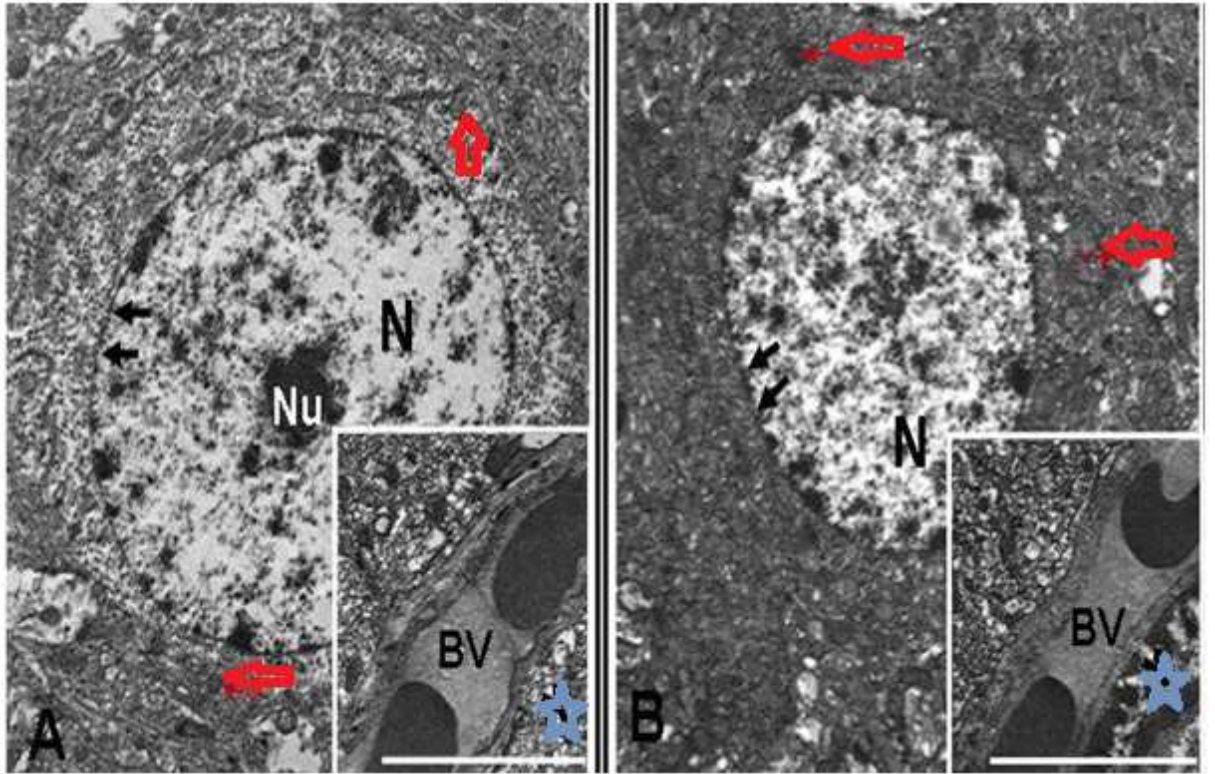
HİE grubunda (Grup 3) ganglion yapısının bozulduğu görüldü. Bu grupta, ganglion hücrelerinin şekli ve hücre membranlarında düzensizlik olduğu, hücrelerin içinde dejeneratif boşluklar olduğu ve satellit hücre kaybının bulunduğu izlendi. HİE+EPO grubunda (Grup 4) ise ganglion hücre yapılarının korunduğu, bulguların Kontrol ve Sham grupları ile benzerlik gösterdiği gözlemlendi (Resim 19).



Resim 19. Spiral ganglion hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri C; HİE, D; HİE+EPO grubu. **HİE grubunda** dejeneratif ganglion hücreleri (GC), hücre membranlarında düzensizlik (mavi ok), hücre içinde dejeneratif boşluklar (yıldızlar) izleniyor. **HİE+EPO grubunda** ganglion hücre yapıları (GC) normal, hücre sınırları düzgün (mavi ok), satellit hücre yapıları korunmuş (kırmızı ok) olarak izleniyor. Bar= 20000 nm.

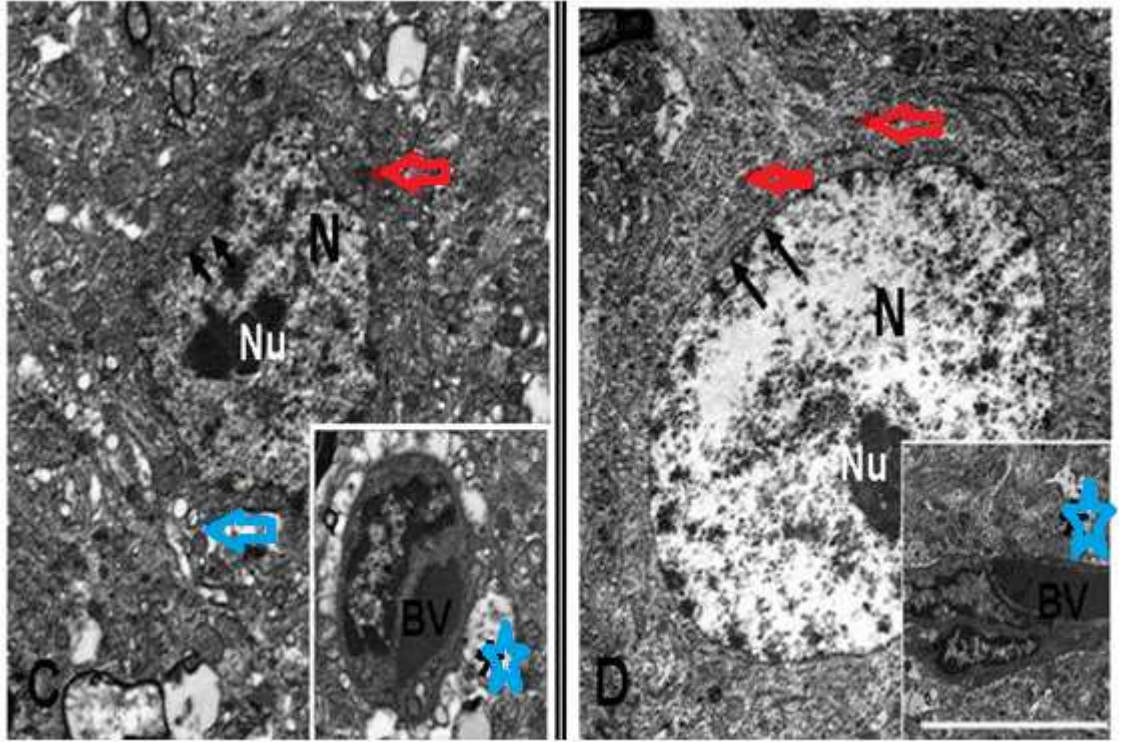
Temporal lob elektronmikroskopik inceleme bulguları.

Kontrol ve Sham gruplarında (Grup 1, 2) temporal lob örneklerinin elektron mikroskopik olarak incelenmesi sonucunda, nöronların normal morfolojik özelliklere sahip oldukları görüldü. Hücrelerin büyük ve ökromatik çekirdeğe sahip, çekirdek sınırlarının düzgün, çekirdekçiğin belirgin olduğu gözlemlendi. Mitokondrilerin normal yapıda olduğu ve perivasküler çevrenin korunduğu izlendi (Resim 20).



Resim 20. Temporal lob elektron mikroskopik görüntüleri. A; Kontrol, B; Sham. Kontrol ve sham gruplarında, belirgin çekirdekçiğin (Nu) ökromatik nükleus (N), çekirdek sınırları düzgün (siyah oklar), mitokondri yapıları normal (kırmızı oklar) olarak izleniyor. Küçük resimlerde perivasküler çevre (mavi yıldız) normal olarak izleniyor. BV; kan damarı.

HİE grubunda (Grup 3), hücrelerin heterokromatik çekirdekli olduğu, çekirdek sınırlarının düzensizleştiği görüldü. Mitokondrilerin şekil ve büyüklüklerinin değişken olduğu ve krista kaybı gözlemlendi. Pervasküler alanda astrositik ayak şişmesi (perivasküler ödem) izlendi. HİE+EPO grubunda (Grup 4) nöron ve perivasküler yapıların korunduğu, bulguların Kontrol ve Sham gruplarına benzer özellikte olduğu görüldü (Resim 21).



Resim 21. Temporal lob elektron mikroskopik görüntüleri. **C;** HİE, **D;** HİE +EPO grubu. **HİE grubunda** çekirdek sınırlarının bozulduğu (siyah oklar), normal mitokondrilere oranla (kırmızı ok) kristasız mitokondrilerin (mavi ok) daha fazla olduğu izleniyor. Küçük resimde perivasküler ödem (mavi yıldız) görülmekte. **HİE +EPO grubunda;** düzgün sınırlı (siyah oklar) normal çekirdek (N), çekirdekçik (Nu), kristalı mitokondriler (kırmızı oklar), küçük resimde korunmuş perivasküler çevre (yıldız) izlenmekte. Bar= 5000 nm.

5. TARTIŞMA

Günümüzde ani işitme kaybı, presbiakuzi, gürültüye bağlı işitme kaybı, ototoksiste gibi sensorinöral işitme kayıplarının ortaya çıkmasına yol açan etkenlerin ortak bir fizyopatolojik sonuç olarak iç kulak düzeyinde hipoksi ve iskemiye neden olduğuna ilişkin veriler giderek artmaktadır. Matür kokleada hipoksi ve iskemik koşullarda, hücrel ve moleküler düzeyde ortaya çıkan değişiklikler *invivo* hayvan çalışmaları yanı sıra, organotipik koklea eksplant kültürlerinde gerçekleştirilen immünohistokimyasal *invitro* araştırmaların ve genetik çalışmaların da konusu olmaktadır (54-56). Gürültü, vasküler oklüzyon, mekanik travma gibi pek çok değişik etkenin hücrel düzeyde oksijen teminini bozarak ROS'ların aşırı artması, anormal kalsiyum homeostazı ve apoptotik proteinlerin salınımı sürecini başlattığı düşünülmektedir (22). Apoptoz, genetik kontrol altında programlanmış bir hücre ölümü olarak kabul edilmekte ve bu süreçte hasarlanmış hücrenin doku ya da organın bütünlüğüne yönelecek hasarı önlemek üzere intihara yönlendiği kabul edilmektedir (26, 56, 57).

Yenidoğan döneminin herediter ya da edinsel işitme kayıpları, erken tanınarak uygun yöntemlerle rehabilitasyon uygulanmaması halinde ciddi dil ve konuşma bozukluklarına yol açabileceğinden özel bir ilgiyi hak etmektedir. Bu dönemin edinsel işitme kayıplarının önemli bir nedeni perinatal hipoksi ve iskemidir. Bu nedenle yapılan araştırmada HİE'nin neden olduğu işitme kaybının araştırılması ve nöroprotektif bir ajan olarak klinik uygulama alanı bulunan rhEPO'nun bu işitme kayıplarını önlemedeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Perinatal hipoksi ve iskemi klinikte çok da az rastlanan bir süreç değildir ve prematürite başta olmak üzere prenatal maternal enfeksiyonlar, plasental yetmezlik, uzamış doğum, hiperbilürubinemi gibi yenidoğan dönemi sorunlarına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir (25,58). Hipoksi ve iskeminin süresi ve patolojinin ciddiyeti ile bağlantılı olarak nöral dokularda değişik derecelerde hasar oluşabilmekte ve sonuçta yenidoğanların %20-50'si yaşamını yitirirken, % 25inde nöral gelişim bozukluklarından serebral palsiye dek değişen ağırlıkta nörolojik sekeller ortaya çıkmaktadır (2, 55). Bu sekeller epilepsi, motor ve mental retardasyon gibi ağır klinik tabloların yanı sıra işitsel işleme bozuklukları, görme

bozuklukları, tanıma ve algılama bozuklukları gibi çocuğun iletişim becerilerini ilgilendiren daha hafif klinik tablolarla da karşımıza çıkabilmektedir (7, 58, 60). Perinatal HİE geçiren olgulardan nöral gelişim bozukluğu olanlarda işitme kaybı % 17.1'e kadar çıkarken bu oran sekel görülmeyenelerde % 6.3 olmakta, buna karşılık postnatal dönemde uzamış hipoksi ve iskemi ile karşılaşan bebeklerde ciddi bir kalıcı işitme kaybı görülmemekte, bu durum insan periferik işitme organının gelişiminde hipoksi ve iskemiye hassas kritik bir dönem olduğunu düşündürmektedir (3, 27). Bunun dışında hipoksi ve iskemi düzelip dolaşım ve oksijenizasyon başladıktan sonraki birkaç saat içinde de nöral yapılarda doku hasarının devam ettiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (12).

HİE ile işitme kaybının birlikteliği 1950'li yıllardan başlayarak dikkat çekmiş ve Sano ve arkadaşlarının (8) bildirdiği üzere, objektif odyolojik yöntemlerin klinikte uygulanmaya başlanmasından önceki dönemde Carhart ve Goodhill gibi yazarlar işitmenin kokleer çekirdekler seviyesinde etkilendiğini öne sürerken, 1970'li yıllarda Schuknecht postmortem çalışmalarda kokleanın da patolojiye katıldığını göstermişlerdir (8). Objektif odyolojik testler HİE'nin işitmeye etkisinin anlaşılmasında klinikte ve deneysel çalışmalarda önemli katkılar sağlamıştır. Jiang, prenatal asfiksi geçiren ve nörolojik sekeli olmayan 48 bebek, nörolojik sekeli olan 41 bebek ve 3 ay-1 yaş arasında ciddi asfiksi geçiren 14 bebekte asfikside en az 6 ay sonra aldığı ABR kayıtlarını karşılaştırmış ve sekelsiz prenatal asfiksi geçirenlerin % 6,3'ünde, nörolojik sekeli olanların ise %17,1'inde işitme kaybı olduğunu saptamış buna karşılık postnatal asfiksi geçirenlerin hiçbirinde işitme kaybı olmadığını belirtmiştir (3). Sano ve ark. hiperbilüribinemi ve asfiksi geçiren infantlarda Distorsion Product Otoacoustic Emission (DPTOAE) ölçümlerinde 6 bebeğin 5'inde yanıt alınmadığını belirtmiş ve kokleada temelde dış tüylü hücrelerin etkilendiğini öne sürmüşlerdir (8). Elektrofizyolojik testler yenidoğan döneminde de geniş uygulama alanı bulmuştur; Kırkım ve ark. yenidoğan işitme taraması programı uygulamasına geçildikten sonra otomatik ABR ve otoakustik emisyon ölçümlerinin kombine kullanımı ile işitsel nöropati-dissenkroni olgularının görülme sıklığının odyoloji bölümüne başvuranlar içinde % 1,16'dan % 4,13'e çıktığını ve tanı koyma yaşının da 24 aydan 5,7 aya indiğini saptamışlardır (61).

Terminde doğan bebeklerde perinatal asfiksinin hayatın ilk dönemlerinde ABR kayıtları üzerine etkisini inceleyen bir araştırmada 108 bebekte doğumdan sonraki 1, 3, 5, 7, 10, 15 ve 30. günlerde alınan kayıtlar normal bebeklerin kayıtları ile karşılaştırılmış ve asfiksik

bebeklerde resüstasyondan 3 gün sonrasına kadar latans ve interpik intervallerin bozulmaya devam ettiği ve bunun bazı bebeklerde klinik tablonun birkaç gün boyunca daha da ağırlaştığına işaret eden klinik gözlemlerle uyumlu olduğunu saptamıştır (11).

Perinatal asfiksiden kurtulmuş olan ve yaşları 4-12 arasında değişen 78 çocuk üzerinde ABR kayıtları ve nöral gelişim parametrelerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, nöral gelişim bozuklukları gösteren 37 çocuğun 15'inde (% 40,59) işitme kaybı saptanırken, herhangi bir defekti olmayan 41 çocuğun yalnızca 5'inde (%12,2) işitme kaybı olduğu belirlenmiş ve ABR yanıtları ile klinik olarak gözlemlenebilen nöral gelişimsel problemler arasında orta derecede bir korelasyon olduğu ve ABR'nin işitsel ve nörolojik gelişimi öngörmede kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (62, 63).

ABR ve ototakustikemiyon (OAE) gibi objektif odyolojik testlerin anestezi altında yapılabilmesi ve hayvanlarda uygulanabilmesi pek çok deneysel çalışmanın yolunu açmıştır. Bu bağlamda ABR ve OAE farklı türlerdeki hayvanlarda ve değişik patolojilerde sıklıkla kullanılmıştır (37-39, 64, 65). İskeminin erişkin ratlarda ve kobaylarda koklea üzerine olan etkisini değerlendirmeye yönelik çalışmalar da daha çok ani işitme kaybı modeli kullanılmıştır (54,55). Takeda ve ark. 8 kHz deki ABR kayıplarına dayanarak, subletal koklear iskemiden sonraki iki gün içinde belirgin düzelme başladığını ve bu düzelmenin 7. güne dek devam ettiğini göstererek yalnızca arteriyel okluzyonun kokleada hasar oluşturmayabileceğini, tekrarlayan iskemik ataklara karşı hem lezyon tarafında hem de karşı kokleada tolerans gelişebileceğini göstermiş ve kalıcı koklear hasarda iskemi dışında etkenlerin de rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (55). Buna karşılık ratlarda perinatal anoksinin işitme sistemi üzerine etkisinin ABR, kortikal yanıtlar ve davranışsal yöntemlerle değerlendirilmiş ve ABR'de yine interpik intervallerin uzadığı ve eşik yükselmesi olduğu saptanmıştır, ABR bulguları davranışsal testler ve kortikal yanıtlarla birlikte değerlendirildiğinde insanlardaki disleksi ve otizm benzeri azalmış performansı işaret eden bulgular elde edilmiştir (66).

Çalışmamızda da kullanılan yöntemle yenidoğan sıçanlarda oluşturulan HİE modelinde unilateral ve bilateral HİE'nin işitsel işleme bozukluklarına yol açtığı ortaya konulmuştur (67). Takiben yenidoğan sıçanların 1. ve 7. günlerinde oluşturulan HİE'nin hızlı işitsel işleme ve öğrenme işlevlerinde defektlere neden olduğu ve bu defektin 7. gündeki sıçanlarda belirgin olduğu saptanmış, bu sonuç termdeki sıçanların preterm sıçanlara göre HİE'ye daha hassas olduğunu düşündürmüştür (7). Bu durum çalışmada HİE oluşturmak için

yedi günlük sıçanların seçilmiş olmasının doğru bir işlem olduğunu göstermektedir. Nörosensoryel sistem gelişim basamakları dikkate alındığında, yenidoğanın fizyolojik özelliklerine en yakın dönem bu dönemdir. Bir diğer deyişle insan yenidoğanlarına göre sıçanlar prematür doğarlar ve 7. günde matür yenidoğan özelliklerine ulaşırlar (2, 7, 12). Yenidoğan HİE modelinde hipoksi ve iskemi birlikteliğinin nöral yapılarda tek başına iskemi veya hipoksiye göre daha uzun süreli ve daha ciddi etkilenme oluşturduğu bilinmektedir (12). Çalışmamızda da bu verilere dayanılarak yapılan ABR değerlendirmeleri, sıçanların erişkin döneme girmeden önceki juvenil dönemlerinde yani 7. haftada gerçekleştirilmiştir. Tablo 6' da görüldüğü gibi HİE grubunda tüm sıçanların karotis oklüzyonunun uygulandığı sol tarafta klik ABR eşik değerlerinin yükseldiği, üç hayvanda karşı tarafta yanıtların etkilenmediği buna karşılık beş hayvanda karşı tarafta da ABR yanıtlarının bozulduğu görülmüştür. Ton burst kullanılarak yapılan ABR kayıtlarında 6 kHz'de iki sıçanda her iki tarafta da etkilenme izlenmezken, üç hayvan bilateral, üç hayvansa lezyon tarafında etkilenmiştir. Sekiz kHz değerlerine bakıldığında ise, bulguların 6 kHz bulguları ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ton burst 6 kHz ve 8 kHz uyaranla patoloji gözlenmeyen iki hayvanda klik ABR değerleri özellikle karşı tarafta daha yüksek bulunmuştur.

İstatistiksel olarak HİE grup içi karşılaştırma yapıldığında, sağ ve sol taraf ABR değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Wilcoxon test sonuçları sırasıyla: Sağ sol klik ABR için p:0.462, sağ sol 6 kHz için p:0.066, sağ sol 8 kHz için p:0.066 bulunmuştur.

Bulgular HİE modelinde etkilenmenin yalnızca a.carotis communisin bağlandığı tarafta değil karşı tarafta da görüldüğünü ortaya koymaktadır. Benzer şekilde orta serebellar arterin tek yanlı bağlanması ile oluşturulan iskemi modelinde beyin hasarının yalnız oklüzyon yapılan tarafta değil karşı tarafta da olduğu Teknezyum işaretli annexin- V tutulumunun Single Photon Emission Computerised Tomography (SPECT) ile her iki hemisferde saptanması ile gösterilmiş; bu durum hasarın yalnızca fokal zararlanma olan alanda değil nöronal strese bağlı olarak bu alan dışında da oluşabileceğini düşündürmüştür. (68). Bunun dışında koklea ve işitme yollarında oluşan hasarın yalnızca iskemiye bağlı olmadığı, hemen ardından uygulanan hipoksik koşulların etkisiyle etkilenmenin daha yaygın olabileceği sonucunu getirebileceği düşünülmüştür. Sıçanlarda vasküler anatomi ve kan akımı çalışmaları da bireysel anatomik farklılıkları işaret etmektedir (69, 70). Koklear fonksiyonların homeostatik koşullar gerektirdiği ve bunun da büyük ölçüde koklear kan akımına bağlı olduğu

bildirilmiştir. Düzenli bir oksijenasyonun büyük ölçüde kan akımındaki otoregülasyonla ilintili olduğu ve sempatik, peptiderjik ve hemodinamik mekanizmaların bu otoregülasyonda rol oynadığı bilinmektedir (69). Bu durumun da deneklerde gözlenen bireysel farklılıklarda etken olabileceği kanısına varılmıştır.

Çalışmada HİE grubunda ulaşılan ABR değerleri her iki kokleanın ve beyin sapının birlikte etkilendiğini düşündürmektedir. Nitekim daha sonra da vurgulanacağı üzere bu etkilenme hem beyin sapı hem de kokleada histolojik olarak doğrulanmıştır,

HİE'nin santral sinir sistemi üzerinde oluşturduğu değişiklikleri gösteren invivo çalışma sayısı sınırlıdır (6, 12, 13, 19, 21, 24, 45). Ayrıca HİE sonucunda kokleada oluşan değişikliklere ilişkin az sayıda postmortem çalışmada asfiksini derecesine bağlı olarak hasarlanma olduğu bildirilmektedir(1, 9, 10, 71). Ağır hipoksiik iskemi koşullarında kokleasakkuler atrofi,iç kulakta hasarlanma, Corti organının dış tüylü hücrelerinde kayıp ve stria vaskulariste ödem saptanmıştır (9, 10). Orita ve ark. yenidoğan temporal kemiklerini histopatolojik olarak ışık mikroskopi düzeyinde değerlendirmiş ve sol temporal kemikte korti organında ağır etkilenme spiral ganglion hücrelerinde özellikle bazal kısımda hücre kaybı ve sakkuler makulada orta derecede atrofi göstermişlerdir. Yanısıra sağ temporal kemikte de sola göre daha az olmakla birlikte orta derecede etkilenme izlenmiştir (9). Schumutzhard ve ark. HİE'li 6 yenidoğanın 8 temporal kemiğini postmortem immunohistokimyasal yöntemlerle ve elektronmikroskopik olarak incelemişler, iç ve dış tüylü hücreler, spiral ganglion hücreleri ve stria vaskularisin marginal hücrelerinde Kaspaz-3'ün belirgin pozitifliğini göstermişlerdir. Buna karşılık olguların tümünde beyinde apoptoz bulgularına rastlanmamış ve iç kulak etkilenmesinin temelde kokleadaki apoptoza bağlı olduğu ve bunun beyin dokusundaki apoptozdan daha önce ortaya çıktığı sonucuna varmışlardır (1).

Kokleada hipoksi ve iskemiye bağlı olarak değişiklikler daha sonra sıçan koklealarının organotipik hücre kültürlerinde incelenmiş ve hipoksi olmaksızın iskemi koşullarında tüylü hücrelerde belirgin kayba rastlanmazken, hipoksi ve iskemi birlikteliğinin iç tüylü hücrelerde daha fazla olmak üzere tüylü hücre zararlanmasına yol açtığı göstermişlerdir (14). Bir diğer organotipik sıçan hücre kültüründe hipoksi ve iskemi birlikteliğinin inflamatuvar sitokinleri arttırıp, iç kulak hasarlanmasına neden olduğu saptanmıştır (72). Buna karşılık invivo yenidoğan HİE modellerinde iç kulak değişikliklerini hispatolojik olarak inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak yenidoğan sıçanlarda hiperbarik oksijenin koklea üzerine etkisini inceleyen elektron mikroskopik bir çalışmada, hiperbarik oksijen uygulamasının Corti

organı üzerindeki etkisi araştırılmış ve hiperbarik oksijenin yenidoğan retinopatisi bulgularına benzeri şekilde dış tüylü hücrelerde yükseklik artışına neden olduğu gösterilmiştir (73).

Güncel olarak apoptozun belirleyicisi olarak kullanılan yöntemler TUNEL boyama yöntemi ve dokuda Kaspaz-3'ün gösterilmesidir. Programlanmış ölüm basamaklarında son ürün olan Kaspaz-3'ün dokuda belirlenmesi apoptotik sürecin işlediğinin en önemli belirtisidir.

İmmunohistokimyasal yöntemler dışında elektron mikroskobu ile hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik ve dejeneratif boşlukların gösterilmesi apoptoz sürecini işaret eden önemli bulgulardır (1,6). Bu nedenle çalışmamızda da ışık mikroskopik incelemede krezil violet ile boyama yanı sıra TUNEL tekniği ile TUNEL pozitif hücreler ve Kaspaz-3 boyama tekniği ile Kaspaz-3 pozitif hücreler araştırılmıştır. Elektron mikroskobu ile de ayrıca hücre morfolojisindeki değişiklikler incelenmiştir.

HİE grubunda beyinsapı örnekleri krezil violet ile boyandığında apoptotik hücreyi tanımlayan piknotik nöronların yapıya hakim olduğu dikkati çekmiştir. TUNEL tekniği ile boyamada TUNEL pozitif hücreler, Kaspaz-3 boyamasında ise Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlenmiştir. Bulgular beyin sapı seviyesinde etkilenmeyi ve bu etkilenme nedeni olarak da apoptozu işaret etmektedir.

Her iki taraf koklea, spiral ganglion ve temporal lob örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde etkilenme sadece oklüzyon tarafında değil karşı tarafta da görülmüştür.

Kokleanın elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, tüylü hücrelerde hücre sınırları bozulmuş, dejeneratif boşluklar oluşmuş ve hücrelerin siliaları kaybolmuştur. Spiral ganglionun elektron mikroskopik incelemesinde, hücre membranında düzensizlik, hücre içinde dejeneratif boşluklar gibi dejeneratif hücre değişiklikleri gözlenmiştir. Temporal lobun elektron mikroskopik değerlendirmesinde, perivasküler ödem, normal mitokondrilere oranla kristasız mitokondriler artmış ve çekirdek sınırları bozulmuştur.

Verilerin irdelenmesinde yenidoğan sıçan HİE modelinde yalnızca beyin sapı ve temporal lob gibi nöronal yapılarda değil, koklea seviyesinde de etkilenmenin olduğu ve ortaya çıkan hasardan programlanmış hücre ölümünün ön planda sorumlu olduğu kanısına varılmıştır. Bu durum HİE'den kurtulabilen infantlarda işitmenin yalnızca santral yollarının etkilenmediğini, zararlanmanın periferik işitme organı düzeyinde de olduğuna işaret etmektedir. Sonuçlarımız otoprotektif stratejilerin işitme kaybının önlenmesinde yeri olabileceğini ve kalıcı hasar gelişmişse işitmenin rehabilitasyonunda periferik organa yönelik işitme cihazı ve/veya koklear implantasyon gibi yöntemlerin kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Hipoksik iskeminin beyinde oluşturduğu etkilenmenin mekanizmaları ve hasarlanmayı önlemeye yönelik çalışmalar 2000’li yıllardan başlayarak ivme kazanmıştır. Özellikle EPO-R’lerin önce kobay daha sonra da sıçan beyin hücrelerinde tespit edilmesi ve EPO’nun endojen salınan bir madde olmasına rağmen eksojen yolla verilen rhEPO’nun erişkin hastalar ve özellikle yenidoğan bebeklerde etkinlik ve güvenilirliğinin klinikte gösterilmesi nedeni ile gözler EPO’ya çevrilmiştir (42, 43, 73). Nitekim rhEPO’nun HİE’nin yarattığı hasarı önlemeye yönelik invitro çalışmalarda rhEPO’nun glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini arttırdığı, Bax genlerinin ekspresyonunu ve DP5 proapoptotik gen ekspresyonlarını azaltarak korucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür (24,44). Eritropoetin aynı zamanda kemik iliğinde progenitor eritroid hücreleri uyarak matürleştirmekte ve oksijen taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca endotel hücrelerinden NO salgılatarak vazodilatasyona neden olmakta ve beyin hasarını bu yollarla da engelleyebilmektedir (42). (Şekil 10)

EPO’nun klinikte kullanımı ile ilgili yapılan bir çalışmada son dönem böbrek yetmezliği olan ve anemisi nedeni ile 120 Ü/kg/hafta 5-8 ay boyunca EPO verilen hastalarda işitmenin düzelme gösterdiği ve bu etkinin aneminin düzelmesine ya da EPO’nun direkt olarak iç kulak üzerine olan etkisine bağlı olabileceği belirtilmiştir (47).

Bu çalışmalar sürerken 2005 yılında kobay iç kulağında ilk kez EPO ve EPO-R’leri tanımlanmıştır (46). Takiben yenidoğan ve erişkin sıçanların Corti organı tüylü hücrelerinde de EPO-R gösterilmiştir (47). Gross ve ark. yenidoğan sıçanların organotipik koklea hücre kültürlerinde hipoksik şartların EPO-R’yi aktive ettiğini ve endojen EPO üretimini arttırdığını saptamışlardır (67). Bu çalışmalar EPO’nun endojen olarak üretildiğini ve eksojen rhEPO’nun kullanılması halinde EPO-R’lerine kolayca bağlanabileceğini ve aktive olabileceğini desteklemekte ve bu özellikleri ile koruyucu stratejilerde avantajlı olabileceklerini düşündürmüştür.

Ancak rekombinan EPO’nun koklea patolojileri üzerine otoprotektif etkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. Sıçan koklea hücre kültürlerinde oluşturulan invivo gentamisin ototoksitesinde EPO’nun rolünü araştıran bir çalışmada, EPO’nun aminoglikozidlerin neden olduğu apoptozu önlemede etkin olabileceği sonucuna varılmıştır (48). Aynı konudaki bir başka çalışmada yenidoğan sıçan Corti hücre kültürlerinde gentamisin ototoksitesini önlemede EPO ile ‘vascular endothelial growth factor’ü (VEGF) karşılaştırmışlar ve EPO’nun tüylü hücre hasarında koruyucu etkisini gösterirken, VEGF’nin böyle bir etkisinin olmadığını saptamışlardır (47). Bir diğer sıçan Corti organ hücre

kültür çalışmasında, iskemiye bağlı apoptozun ve nekrozun önlenmesinde rhEPO'nun etkin olduğu ve bu etkinin hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla da gösterilmesinin gerekli olduğu vurgulanmıştır (15).

Bu nedenlerle yenidoğan sıçan HİE modelinde koruyucu ajan olarak EPO seçilmiş ve rhEPO'nun etkisi araştırılmıştır. Öncelikle deneklerde ABR ölçümleri gerçekleştirilmiş ve Tablo 7' de görüldüğü üzere HİE oluşturulan sıçanlarda eşzamanlı rhEPO uygulamasının ABR yanıtlarının bozulmasını önemli ölçüde engellediği, normal ve normale yakın değerler elde edildiği görülmüştür ve bu etkinin istatistiksel olarak da anlamlı derecede farklı olduğu ortaya konmuştur.

Histolojik değerlendirmede ise, beyin sapı kesitlerinin krezil violet boyaması sonucunda hücrelerin çoğunun normal nöronlardan oluştuğu, apoptoz göstergesi olan piknotik nöron sayısının HİE grubuna göre çok daha az olduğu görülmüştür. Beyinsapı örneklerinin TUNEL tekniği ile boyamasında, HİE grubuna göre çok daha az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücreler bulunduğu izlenmiş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Beyinsapı nöronlarının Kaspaz-3 immunohistokimyasal değerlendirmelerinde ise HİE grubuna göre çok daha az sayıda Kaspaz-3 pozitif hücreye rastlanmıştır. İki grup arasında istatistiksel farklılık olarak anlamlı farklılık olduğu ortaya konmuştur ($p<0.05$).

Elektron mikroskopik incelemelerde ise HİE+EPO grubu koklea tüylü hücrelerinin, mitokondrial yapıların, siliaların Kontrol ve Sham gruplarındaki gibi normal olduğu gözlenmiştir. Spiral ganglion yapılarının elektron mikroskopik değerlendirilmesinde; ganglion hücre yapıları normal hücre sınırları düzgün ve satellit hücre yapıları korunmuştur; bu bulgular Kontrol ve Sham bulguları ile benzerlik göstermektedir. Temporal lob elektron mikroskopik değerlendirmesinde, nöronların düzgün sınırlı olup, normal çekirdek ve çekirdekçik yapılarına sahip olduğu, mitokondrial yapıların kristalli olduğu ve perivasküler çevrenin korunduğu saptanmıştır; bu bulgular Kontrol ve Sham bulguları ile benzerdir.

Elde edilen tüm veriler literatürdeki az sayıdaki invivo çalışma sonuçları ile uyum içindedir. Bu çalışma ile HİE işitmenin santral ve periferik yollarını etkilediği, rhEPO uygulamasının sıçan HİE modelinde hipoksik iskeminin yarattığı işitme hasarını önlemede etkin olduğunu ABR ölçümleri ile ve histopatolojik olarak gösterilmiştir. Programlanmış hücre ölümünün karmaşık mekanizmaları göz önüne alındığında bu mekanizmaları

aydınlatmaya yönelik daha fazla invivo/invitro çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır. Ayrıca EPO'nun işitsel patolojilerdeki etkinliğinin klinik çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

6.SONUÇLAR

- 1.**Yenidoğan sıçanlarda hipoksik iskemik ensefalopati modeli oluşturulmuştur.
- 2.**Oluşturulan modelde; ABR kayıtlarında işitmenin etkilendiği gösterilmiştir.
- 3.**Hipoksik iskemik ensefalopatinin koklea tüylü hücreleri, spiral ganglion hücreleri, beyin sapı ve temporal lobta apoptoza neden olduğu histopatolojik olarak kanıtlanmıştır.
- 4.**Hipoksik iskemik ensefalopati ile eşzamanlı uygulanan rhEPO'nun işitmeyi korumada etkin olduğu saptanmış ve ABR kayıtları ile bu etkinlik gösterilmiştir.
- 5.**Rekombinant eritropoetinin koklea tüylü hücreleri, spiral ganglion hücreleri, beyin sapı ve temporal lobta HİE ile oluşan apoptotik değişiklikleri önlediği histopatolojik olarak kanıtlanmıştır.
- 6.**Bulgular rhEPO'nun klinikte HİE'nin yarattığı işitme kaybında koruyucu etkisi olduğunu ve çalışmaların kliniğe taşınmasının gerekliliğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1.Schumutzhard J, Glueckert R, Sergi C, Schwentner I, Abraham I, Schrot FA . Does perinatal asphyxia induce apoptosis in the inner ear? Hearing Research 2009; 250:1-9.
- 2.Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Ann NY Acad Science1997; 835: 234-49.
- 3.Jiang ZD. Long-term of perinatal and postnatal asphyxia on developing human auditory brainstem responses: peripheral hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngology 1995; 33: 225-38.
- 4.Jiang ZD, Brosi DM, Wilkinson A. Depressed brainstem auditory electrophysiology in preterm infants after perinatal hypoxia-ischemia. J Neurological Science 2009; 281: 28-33.
- 5.Lee SD, Park HJ, Park ES, Oh MK, Park B, Rha DW, Cho SR, Kim CH, Kim DG, Park C. Motor pathway injury in patients with periventricular leucomalacia and spastic disoplegia. Brain 2011; 134: 1199-210.
- 6.Hargitai B, Szabo V, Cziniel M, Hajdu J, Papp Z, Szende B, Sergi C. Human brain of preterm infants after hypoxic-ischaemic injuries: no evidence of a substantial role for apoptosis by using a fine-tuned ultrasound-guided neuropathological analysis. Brain&Development 2003; 26: 30-6.
- 7.McClure MM, Threlkeld SW, Rosen GD, Fitch RH: Rapid auditory learning deficits in rats P1 versus P7 neonatal hypoxic-ischemic injury. Behav Brain Research 2006; 172: 114-21.
- 8.Sano M, Kaga K, Kitazumi E, Kodama K. Sensorineural hearing loss in patients with cerebral palsy after asphyxia and hyperbilirubinemia. Int J Pediatr Otorhinolaryngology 2005; 69: 1211-17.
- 9.Orita Y, Sando I, Miura M,Haginomori SI, Hirsch BE. Cochleosaccular pathology after perinatal and postnatal asphyxia: Histopathologic findings . Otology Neurotology 2002; 23: 34-8.
- 10.Koyama S, Kaga K, Sakata H, Ino Y, Kodere K. Pathological findings in the temporal bone of newborn infants with neonatal asphyxia. Acta Otolaryngologica 2005; 125: 1028-32.
- 11.Jiang ZD, Brosi DM, Shao XM, Wilkinson AR . Sustained depression of brainstem auditory electrophysiology during the first months in term infants after perinatal asphyxia. Clinical Neurophysiology 2008; 119: 1496-505.
- 12.Kumral A,Özer E,Yılmaz O, Akhisaroğlu M, Gökmen N, Duman N, Ulukuş C, Genc S, Ozkan H. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biology of the Neonate 2003; 83: 224-28.

- 13.Kumral A,Uysal N,Tugyan K, Sonmez A, Yılmaz O, Gökmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behavioural Brain Research* 2004; 153: 77-86.
- 14.Mazurek B, Winter E, Fuchs J, Haupt H, Gross J. Susceptibility of the hair cells of the newborn rat cochlea to hypoxia and ischemia. *Hearing Research* 2003; 182: 2-8.
- 15.Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, Gross J,Mazurek B. Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti *Neuroscience Letters* 2006; 396: 86-90.
- 16.Katar S, Devecioğlu C,Ayrancı-Sucaklı T, Taşkesen M. Hipoksik iskemik ansefalopatili term yenidoğan hastanın değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi* 2007; 1: 38-41.
- 17.Hachem A, Ralph N.The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otprotective strategies. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2010; 5(2): 147-63.
- 18.Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, Dunn RS, Vorhess CV, Karp MW, Degen JL, Davis RJ, Mizushima N, Rakic P, Dardzinski B, Holland SK, Sharp FR, Kuan CY. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *American Journal of Pathology* 2006; 169: 566-83.
19. Kumral A,Gönenç S,Açıkgöz O, Sonmez A, Genc K, Yılmaz O, Gökmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic –ischemic brain injury in neonatal rats. *Biology of the Neonate* 2005; 87: 15-18.
- 20.Hagberg H. Mitochondrial impairment in the developing brain after hypoxia-ischemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2004; 36(4): 369-73
- 21.Kumral A, Baskın H, Gokmen N, Yılmaz O, Genc K, Genc S, Tatlı MM, Duman N, Ozer E, Ozkan H. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic ischemic brain model in newborn rats Is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biology of the Neonate* 2004; 85: 51-54
- 22.Clarkson AN, Clarkson J,Jackson DM, Sammut IA. Mitochondrial involvement in transhemispheric diaschisis following hypoxia-ischemia: Chlomethiazole-mediated amelioration. *Neuroscience* 2002; 144: 547-61
- 23.Knauer SK, Heinrich U-R,Bier C, Habtemichael N, Docter D, Helling K, Mann WJ, Stauber RH. An otoprotective role for the apoptosis inhibitor protein survivin. *Cell Death Disease* 2010; 1: 1-9

- 24.Kumral A, Genc S, Ozer E, Gokmen N, Koroglu TF, Duman N, Genc K, Ozkan H. Erythropoietin downregulates Bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biology of the Neonate* 2006; 89: 205-10
- 25.Mazurek B, Amarjargal N, Haupt H, Fuchs J, Olze H, Machulik A, Gross J. Expression of genes implicated in oxidative stress in the cochlea of newborn rats. *Hearing Research* 2011; 277: 54-60
- 26.Lefebvre PP, Malgrange B, Lallemend F, Staecker H, Moonen G, Van De Water T. Mechanism of the cell death in the injured auditory system: otoprotective strategies. *Audiology and Neurotology* 2002; 7: 165-70
- 27.Strata F, Stoianov IP, de Villiers-Sidani E, Bonham B, Martone T, Kenet T, Chang EF, Vincenti V, Merzenich MM. Perinatal asphyxia affects rat auditory processing: Implications for auditory perceptual impairments in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* 2010; 5(12): 1-12
- 28.Taniguchi M, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Hyodo J, Gyo K. Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroreport* 2002; 13(18): 2459-62
- 29.Gulya AJ. Anatomy of the temporal bone and skull base. In: Gulya AJ, Minor LB, Poe DS. *Surgery of the Ear* (6th edition) Shelton-Connecticut. People's Medical Publishing House – USA 2010: 29-48.
- 30.Gacek RR. Anatomy of the auditory and vestibular systems. In: Snow JB, Wackym PA. *Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery* (17th edition) Shelton-Connecticut. People's Medical publishing House –USA 2009: 1-15.
- 31.Akyıldız N. İçkulak anatomisi. Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara 1998; 1: 49-61.
32. Runge-Samuelson CL, Friedland DR. Anatomy of the auditory system. In Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, Thomas JR. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery* volume 2. Fifth edition. Mosby Elsevier. 2010 Philadelphia pp 1831-37
- 33.Hall JW, Johnston KN. Diagnostic audiology hearing instruments and aural habilitation In: Snow JB, Wackym PA. *Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery* (17th edition) Shelton-Connecticut. People's Medical publishing House –USA 2009: 115-30.
- 34.Hall JW. ABR parameters, protocols and procedures. In: *New handbook of auditory evoked responses*, Pearson Education Inc. USA 2007: 171-211.
- 35.Hall JW. ABR analyses and interpretation. In: *New handbook of auditory evoked responses*, Pearson Education Inc. USA 2007: 212-55.

36. Brown CJ, Johnson TA. Electrophysiologic assesment of Hearing. In Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, Thomas JR. Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery volume 2.Fifth edition. Mosby Elseiver.2010 Philadelphia pp 1904 –15.
37. Güneş D, Kırkım G, Kolatan E, Guneri EA, Ozogul C, Altun Z, Serbetcioglu B, Yılmaz O, Aktas S, Mutafoğlu K, Tufekci O, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl-L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. Chemotherapy 2011; 57(3): 186-94.
- 38.İkiz AO, Serbetcioglu B, Guneri EA, Sutay S, Ceryan K. Investigation of topical ciprofloxacin ototoxicity in guinea pigs. Acta Otolaryngologica 1998; 118(6): 808-12.
- 39.Gökçe NA. (Uzmanlık tezi, 2004, Tez danışmanı; Güneri EA). Kobaylarda iki farklı konsantrasyonda ve iki farklı süreçte yapılan intratimpanik gentamisin uygulamasının iç kulağa ototoksik etkilerinin beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyelleri ile değerlendirilmesi.
40. Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C and Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. Am J of Otol 2000; 21: 513-20
41. Popelar J, Groh D, Pelanova J, Canlon B, Syka J. Age- related changes in cochlear and brainstem auditory functions in Fischer 344 rats. Neurobiology of Aging. 2006, 27: 490-500
- 42.Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2007; 64: 159-71.
- 43.Mc Pherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin –mediated neuroprotection. Int J Dev Neurosci 2008; 26(1): 103-11.
- 44.Yamada M, Burke C, Colditz P, Johnson DW, Gobe GC. Erythropoietin protects against apoptosis and increases expression of non-neuronal cell markers in the hypoxia-injured developing brain. J Pathol 2011; 224: 101-9.
- 45.Kumral A, Baskın H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yılmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. Neonatology 2007; 92: 269-78
- 46.Cayé-Thomasen P, Wagner N, Frederiksen BL, Asal K, Thomsen J. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in the guinea pig inner ear. Hearing Research 2005; 203: 21-27
- 47.Naldi AM, Gassman M, Bodmer D. Erythropoietin but not VEGF has a protective effect on auditory hair cells in the inner ear. Cell.Mol. Life.Sci 2009; 66: 3593-99

48. Monge A, Nagy I, Bonaby S, Schmid S, Gassman M, Bodmer D. The effect of erythropoietin on gentamicin –induced auditory hair cell loss. *Laryngoscope* 2006; 116: 312-16
49. Frederiksen BL, Cayé-Thomasen P, Lund SP, Wagner N, Asal K, Olsen NV, Thomsen J. Does erythropoietin augment noise induced hearing loss? *Hearing Research* 2007; 223:129-37
50. Kiray M, Bağrıyanık HA, Pekçetin Ç, Ergür BU and Uysal N. Protective effects of deprenyl in transient cerebral ischemia in rats. *Chinese J of Physiol* 2008; 51(5): 275-81.
51. Zhang C, Chopp M, Cui Y, Wang L, Zhang R, Zhang L, Szaland A, Doppler E, Hitzl M, Zhang ZG. Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke. *Journal of Neuroscience Research* 2010; 88: 3275-81.
52. Charkpour M, Nayebi ARM, Doustar Y and Hassanzadeh K. 8-OH-DPAT prevents morphine-induced apoptosis in rats dorsal raphe nucleus: A possible mechanism for attenuating morphine tolerance. *Pain Mechanisms* 2010; 111(5); 1316-21.
53. Paxinos, G., Watson, C., 1998. *Atlas: The rat brain in stereotaxic coordinates*, Fourth Edition, Academic Press.
54. Tabuchi K, Oikawa K, Uematomari I, Tsuji S, Wada T, Hara A. Glucocorticoids and dehydroepiandrosterone sulfate ameliorate ischemia-induced injury of the cochlea. *Hearing Research* 2003; 180: 51-56
55. Takeda S, Hata R, Cao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N, Gyo K. Ischemic tolerance of the cochlea. *Neuroscience Letters*; 2009: 263-66
56. Scarpidis U, Madnani D, Shoemaker C, Fletcher CH, Kojima K, Eshraghi AA, Staeker H, Lefebvre P, Malgrange B, Balkany TJ, Water TRW. Arrest of apoptosis in auditory neurons: Implications for sensorineural preservation in cochlear implantation. *Otol Neurotol* 2003; 24: 409-17
57. Cheng AG, Cunningham LL, Rube EW. Mechanism of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck* 2005; 13(6): 343-48
58. Carlsson Y, Schwendiman L, Vontell R, Rousset CI, Wang X, Lebon S, Marlangue CC, Supramaniam V, Hagberg H, Gressens P, Jacaotot E. Genetic inhibition of caspase-2 reduces hypoxic-ischemic and excitotoxic neonatal brain injury. *Annals of Neurology* 2011; 28: 1-9 (Epub ahead of print)
59. Threlkeld SW, Hill CA, Rosen GD, Fitch RH. Early acoustic discrimination experience ameliorates auditory processing deficits in male rats with cortical development disruption. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2009; 27: 321-8.

60. Marlow N, Rose AS, Rands CE, Draper ES. Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90: 380-87.
61. Kırkım G, Serbetcioglu B, Erdağ TK, Ceryan K. The frequency of auditory neuropathy detected by universal newborn hearing screening program. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2008; 72(10): 1461-9.
62. Jiang ZD, Liu XY, Shi BP, Lin L, Bu CF, Wilkinson AR. Brainstem auditory outcomes and correlation with neurodevelopment after perinatal asphyxia. *Pediatric Neurology* 2008; 39(3): 189-95.
63. Ogun B, Serbetcioglu B, Duman N, Özkan H, Kırkım G. Longterm outcome of neonatal hyperbilirubinemia; subjective and objective measures. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 2003; 28(6): 507-13.
64. Guneri EA, Serbetcioglu B, İkiz AO, Guneri EA, Ceryan K. TEOAE monitoring of cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs; The protective effect vitamin B treatment. *Auris Nasus Larynx* 2001; 28(1): 9-14.
65. Daldal A, Odabası O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 137(5): 747-52.
66. Strata S, Delpolyi AR, Bonham BH, Chang EF, Liu RC, Nakahara H, Merzenich MM. Perinatal anoxia degrades auditory system function in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 19156-61.
67. McClure MM, Threlkeld SW, Rosen GD, Fitch RH. Auditory processing deficits in unilaterally and bilaterally injured hypoxic-ischemic rats. *Neuroreport* 2005; 16: 1309-12.
68. Mori C, Karabıyıkoglu M, Goris ML, Tait JF, Yenari MA, Blankenberg FC. Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rat model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2004; 31(5): 733-9.
69. Seidman MD, Kirk WS. The anterior inferior cerebellar arterial network supplying the rat cochlea and its role in autoregulation of cochlear blood flow. *European Archives of Otorhinolaryngology* 1992; 249: 332-35.
70. Lyon MJ, Payman RN. Comparison of vascular innervation of the rat cochlea and vestibular system. *Hearing Research* 2000; 141: 189-98.
71. Amatuozzi M, Northrop C, Liberman C, Thornton A, Halpin C, Herrman B, Pinto LE, Saenz A, Carranza A, Eavey RD. Selective inner hair cell loss in premature infants and

cochlea pathological patterns from neonatal intensive care unit autopsies. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery 2001; 127: 629-36.

72.Khan M, Szczpek AJ, Haupt H, Olze H,Mazurek B. Expression of the proinflammatory cytokines in cochlear explant cultures: Influence of normoxia and hypoxia. Neuroscience Letters 2010; 479: 249-52.

73.Picciotti PM, Agostino SE, Nardo W, Scarano E. Scanning electron microscopy of cochlea in new-born rats exposed to hyperbaric oxygen: preliminary report. Acta Otorhinolaryngologica Italy 2005; 25: 267-70.

74.Gross J, Moller R,Amarjagal N, Machulik A, Fuchs J, Ungethun U, Kuban RJ, Henke H, Mazurek B. Expression of erythropoietin and angiogenic growth factors following inner ear injury of newborn rats. Prague Med Rep 2009; 110: 310-31.

