

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPERBİLİRUBİNEMİLİ YENİDOĞAN WİSTAR ALBİNO RAT  
MODELİNDE ELEKTROFİZYOLOJİK İŞİTSEL YANITLARIN  
MORFOLOJİK BULGULARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

**Çağrı GÖKDOĞAN**

**Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Programı  
DOKTORA TEZİ**

**Ankara  
2013**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPERBİLİRUBİNEMİLİ YENİDOĞAN WİSTAR ALBİNO RAT  
MODELİNDE ELEKTROFİZYOLOJİK İŞİTSEL YANITLARIN  
MORFOLOJİK BULGULARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

**Çağrı GÖKDOĞAN**






**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Aydan GENÇ**

**Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Programı  
DOKTORA TEZİ**

**Ankara  
2013**

Anabilim Dalı :**Kulak Burun Boğaz**  
 Program :**Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları**  
 Tez Başlığı :**Hiperbilirubinemili Yenidoğan Wistar Albino Rat Modelinde  
 Elektrofizyolojik İşitsel Yanıtların Morfolojik Bulgularla  
 Karşılaştırılması**  
 Öğrenci Adı-Soyadı :**Çağrı GÖKDOĞAN**  
 Savunma Sınavı Tarihi :**08.02.2013**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<b>Prof. Dr. Erol BELGİN</b> (Hacettepe Üniversitesi)	
Tez danışmanı:	<b>Doç. Dr. Aydan GENÇ</b> (Hacettepe Üniversitesi)	
Üye:	<b>Prof. Dr. Yasemin ÖZDEMİR</b> (Hacettepe Üniversitesi)	
Üye:	<b>Prof. Dr. Yıldırım BEYAZIT</b> (Gazi Üniversitesi)	
Üye:	<b>Doç. Dr. Figen BAŞAR</b> (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)	

#### ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

  
 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince eğitimime ve yaşamıma olan tüm katkıları, sabrı ve sevgisinden dolayı değerli eşim Opr. Dr. Ozan GÖKDOĞAN'a teşekkür ederim. Yaşamımın yön bulmasında sonsuz emekleri olan annem Münevver SARIDOĞAN, babam Mehmet SARIDOĞAN ve ağabeyim Volkan SARIDOĞAN'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimime büyük katkıları olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Erol BELGİN'e, Prof. Dr. Soner ÖZKAN, Doç. Dr. Aydan GENÇ, Prof. Dr. Gonca SENNAROĞLU, Doç. Dr. Songül AKSOY, Doç. Dr. Bilgehan BÖKE, Doç. Dr. Ahmet ATAŞ, Doç. Dr. Maviş Emel Kulak KAYIKÇI, Yrd. Doç. Dr. Didem TÜRKYILMAZ, tezimin yön bulmasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yıldırım BEYAZIT, Prof. Dr. Yasemin ÖZDEMİR, Prof. Dr. Leyla MEMİŞ, Doç. Dr. Özlem GÜLBAHAR'a ve Tez Danışmanım Sayın Doç. Dr. Aydan GENÇ'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince hoşgörüsü, yardımları ve desteğinden dolayı Uzm. Ody. Banu MÜJDECİ'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf K. KEMALOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Vet. Hek. Dr. Şeyda DİKER, Vet. Hek. Dr. Elif ERGÜVEN KAYA, Vet. Hek. Dr. Elvan ANADOL, Dr. Ayşe HELVACI, Dr. Selin ÜSTÜN BEZGİN'e teşekkür ederim.

Çağıl GÖKDOĞAN

## ÖZET

**Gökdoğan Ç: Hiperbilirubinemili Yenidoğan Wistar Albino Rat Modelinde Elektrofizyolojik İşitsel Yanıtların Morfolojik Bulgularla Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Programı Doktora Tezi, Ankara, 2013.**

Hiperbilirubinemi yenidoğanlarda sıklıkla karşılaşılan bir sağlık problemidir. Bilirubin mekanizmasının herhangi bir basamağında meydana gelen bir bozukluk sonucu oluşan hiperbilirubineminin düzeyi ve maruziyet süresine bağlı olarak etkileri değişiklik göstermektedir. İşitme sistemi üzerine yüksek bilirubin düzeyinin toksik etkisi sensöri-nöral işitme kaybı (SNİK) ve işitsel nöropati spektrum bozukluğu (İNSB) olarak görülebilmektedir. Hiperbilirubineminin işitme sistemine etkisini daha iyi anlamak ve morfolojik değerlendirmeler için deney hayvanı modelleri kullanılabilen ve ulaşılabilirliğin kolay olması, düşük maliyet gibi nedenlerle ratlar tercih edilmektedir. İşitsel değerlendirmelerde İşitsel Beyinsapı Cevabı (İBC), Otoakustik Emisyon (OAE) kullanılmaktadır. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Doktora Programı tezi olarak yapılmıştır. Bu çalışmada, deney, plasebo, kontrol olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Her grupta 6'şar olmak üzere toplam 18 rat kullanılmıştır. Tüm ratlara elektrofizyolojik testler uygulanmış ve morfometrik inceleme yapılmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırılarak hiperbilirubineminin işitme sistemine etkileri elektrofizyolojik test yöntemleri ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Hiperbilirubinemili ratlardan oluşan deney grubunda sol kulakta İBC eşikleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Deney grubunda 4 ratta bilateral (%66,67), 2 ratta unilateral (%16,67) SNİK; 1 ratta unilateral İNSB (%8,33) ile uyumlu veriler elde edilmiştir. Morfolojik incelemeler ışık mikroskopisiyle yapılmış ve koklea kesitlerinde Dış Tüy Hücreleri (DTH), İç Tüy Hücreleri (İTH), beyinsapı kesitlerinde ise Koklear Nukleuslar (KN) değerlendirilmiştir. Fiksasyon sorunu nedeniyle tüm ratların kesitleri değerlendirmeye alınamamıştır. Histolojik değerlendirmede plasebo solüsyonu alan ve hiperbilirubinemili ratlarda DTH ve İTH yapısında apoptotik özellikte bozulmalar ve hücre sayısında azalma görülmüştür. Sonuç olarak, yenidoğan ratlarda hiperbilirubineminin SNİK ve/veya İNSB'ye neden olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Hiperbilirubinemi, yenidoğan rat, elektrofizyolojik değerlendirme, sensörinöral işitme kaybı, işitsel nöropati spektrum bozukluğu.

## ABSTRACT

**Gokdogan C.: Comparison of Electrophysiological Auditory Parameters and Morphological Results in Newborn Wistar Albino Rats Model with Hyperbilirubinemia, Hacettepe University Institute of Health Sciences Audiology and Speech Disorders PhD Thesis, Ankara,2013.**

Hyperbilirubinemia is a common health problem of newborns. Its effects can be different according to level of hyperbilirubinemia which can be a result of a failure in a certain pathway of the bilirubin metabolism and duration of the hyperbilirubinemia. The toxic effect of bilirubin on auditory system can be seen as sensorineural hearing loss (SNHL) and auditory neuropathy spectrum disorders (ANSD). The animal models used for more better understanding the effect of hyperbilirubinemia on hearing system and for morphologic assessment at the same time rats are preferred for the reasons of low cost and easy attainability. Auditory Brainstem Response (ABR) and Otoacoustic Emissions (OAE) are used for auditory assessment. This study has been made on Hacettepe University Institute of Health Sciences Audiology and Speech Disorders program expertise as a thesis of physical doctora. Three groups has been made for this study as experiment group, control group and placebo group. Totally 18 rats used as 6 in every group. Morphometric evaluation and electrophysiologic tests for the assessment of hearing have been made for every rat. The effect of hyperbilirubinemia on auditory system were evaluated by electrophysiologic test methods and morphological by comparing the results of tests. In the experiment group that consists rats with hyperbilirubinemia the ABR thresholds of left ear found high which is statistically significant( $p < 0.05$ ). In the experiment group SNHL found bilaterally in 4 rats(%66,67), unilaterally in 2 rats(%16,67) and ANSD found unilaterally in 1 rat (%8,33). Morphologic evaluation has been made by light microscope and outer hair cells (OHC) and inner hair cells (IHC) have been evaluated in cochlear cross-section and cochlear nucleuses (CN) have been evaluated in brainstem cross-sections. All cross-sections of rats couldn't have been evaluated due to problem in fixation. Deformation in the character of apoptosis and decrease in the account of cell was observed in the structure of inner and outer hair cells of groups that takes placebo solution and rats with hyperbilirubinemia in histologic evaluation. As a result the hyperbilirubinemia of the newborn may result SNHL and ANSD.

**Key words:** Hyperbilirubinemia, newborn rat, electrophysiologic assessment, sensorineural hearing loss, auditory neuropathy spectrum disorder.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
KABUL VE ONAY .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ .....	xii
GRAFİKLER DİZİNİ .....	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. HİPERBİLİRUBİNEMİ.....	3
2.1.1. Bilirubin Metabolizması.....	3
2.2. HİPERBİLİRUBİNEMİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	4
2.3. İŞİTME SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ .....	5
2.4. HİPERBİLİRUBİNEMİNİN İŞİTME SİSTEMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİ.....	8
2.4.1. İşitme Kaybı ve İşitsel Nöropati Spektrum Bozukluğu .....	9
2.5. ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER .....	14
2.5.1. Otoakustik Emisyon (OAE) .....	14
2.5.2. OAE ile Kontralateral Supresyon (KLS) .....	17
2.5.3. İşitsel Beyinsapı Cevabı (İBC).....	19
2.6. DENEY HAYVANLARI .....	21
2.6.1. Tarihçe.....	21
2.6.2. İlk Rat Standardizasyonu.....	22
2.6.3. Rat Kulağı Anatomisi ve İşitme Özellikleri.....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. ÖN ÇALIŞMA .....	26

3.2. GRUPLARININ OLUŞTURULMASI .....	27
3.2.1. Deney Grubu .....	27
3.2.2. Plasebo Grubu. ....	28
3.2.3. Kontrol Grubu .....	29
3.3. ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER .....	29
3.3.1. İşitsel Beyinsapı Cevabı (İBC) Testi .....	29
3.3.2. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) Testi .....	30
3.3.3. Kontralateral Supresyonun Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) ile Kaydı .....	32
3.4. TRANSKUTAN BİLİRUBİNOMETRİ (TkB) ÖLÇÜMÜ.....	32
3.5. SERUM TOTAL BİLİRUBİN (STB) ÖLÇÜMÜ .....	33
3.6. MORFOMETRİK DEĞERLENDİRME.....	33
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. TRANSKUTAN BİLİRUBİNOMETRİ VE SERUM TOTAL BİLİRUBİN DÜZEYLERİ.....	35
4.2. ELEKTROFİZYOLOJİK BULGULAR .....	38
4.2.1. İşitsel Beyinsapı Cevapları (İBC).....	38
4.2.1.1. Eşik Bulguları.....	38
4.2.1.2. Koklear Mikrofonik (KM) Varlığı ve Dalga Morfolojisine İlişkin Bulgular .....	39
4.2.2. Otoakustik Emisyon (OAE) ve Kontralateral Supresyon (KLS) Bulguları.....	42
4.3. MORFOLOJİK BULGULAR .....	42
5. TARTIŞMA .....	52
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	58
7. KAYNAKLAR .....	60
8. EK .....	73



## KISALTMALAR

<b>İN</b>	: İşitsel Nöropati
<b>DTH</b>	: Dış Tüy Hücreleri
<b>İTH</b>	: İç Tüy Hücreleri
<b>İBC</b>	: İşitsel Beyinsapı Cevabı
<b>OAE</b>	: Otoakustik Emisyon
<b>KM</b>	: Koklear Mikrofonik
<b>İNSB</b>	: İşitsel Nöropati Spektrum Bozukluğu
<b>SOAE</b>	: Spontan Otoakustik Emisyon
<b>SFOAE</b>	: Stimulus Frekans Otoakustik Emisyon
<b>TEOAE</b>	: <i>Transient Evoked</i> Otoakustik Emisyon
<b>DPOAE</b>	: Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon
<b>KLS</b>	: Kontralateral Supresyon
<b>SOC</b>	: <i>Superior Olivary Complex</i>
<b>MOC</b>	: <i>Medial Olivary Complex</i>
<b>TkB</b>	: Transkutan Bilirubinometri
<b>STBD</b>	: Serum Total Bilirubin Düzeyi
<b>LL</b>	: <i>Lateral Lemniscus</i>
<b>IC</b>	: <i>Inferior Colliculus</i>
<b>KN</b>	: Koklear Nukleus
<b>SNİK</b>	: Sensöri-nöral İşitme Kaybı
<b>dB</b>	: Desibel
<b>HL</b>	: <i>Hearing Level</i>
<b>mg/dL</b>	: Miligram / Desilitre
<b>Hz</b>	: <i>Hertz</i>
<b>nHL</b>	: <i>normal Hearing Level</i>
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mV</b>	: Microvolt
<b>ET</b>	: <i>Eustachian Tüpü</i>
<b>cc</b>	: <i>Cubic Centimetre</i>

<b>gr</b>	:	Gram
<b>M</b>	:	Mol
<b>NaOH</b>	:	Sodyumhidroksit
<b>nm</b>	:	Nano
<b>pH</b>	:	<i>Power of Hydrogen</i>
<b>mg /ml</b>	:	Miligram / Mililitre
<b>°C</b>	:	Santigrad
<b>mg/ kg</b>	:	Miligram / Kilogram
<b>Kohm</b>	:	Kilo ohm
<b>msn</b>	:	Milisaniye
<b>SGO</b>	:	Sinyal Gürültü Oranı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b>	Ratlarda ve İnsanlardaki İBC'nin Dalga Morfolojisi ve Paternleri.....	20
<b>Şekil 2.2.</b>	Ratlarda İBC Eşik değerlendirmede kullanılan dalga paterni örnekleri .	21
<b>Şekil 2.3.</b>	Laboratuvar Hayvanlarının İşitme Aralıkları .....	25

## TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Çocuklarda SNİK Etiyolojik Faktörleri.....	10
<b>Tablo 2.2.</b> İNSB Prevelansı.....	13
<b>Tablo 2.3.</b> İNSB Etiyolojik Faktörleri.....	14
<b>Tablo 2.4.</b> TEOAE'nin İşitme Aralıklarına Göre Görülme Yüzdeleri.....	16
<b>Tablo 2.5.</b> Memeliler ve Ratlardaki İBC Dalgalarının Anatomik Lokalizasyonu .....	20
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplardaki ratların enjeksiyon öncesi ölçülen kiloları.....	35
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplararası Transkutan Bilirubinometri ve Kandaki Serum Total Bilirubin Düzeyi Değerleri .....	37
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplardaki Sakrifikasyon Öncesi TkB ile Kandaki STBD Değerlerinde Korelasyon Katsayısı ve İstatistiksel Anlamlılık Değerleri .....	37
<b>Tablo 4.4.</b> İşitsel Beyinsapı Cevapları (İBC) Sağ ve Sol Kulak Eşikleri Ortalamaları (dB nHL).....	38
<b>Tablo 4.5.</b> Gruplardaki Sağ ve Sol Kulak İBC Eşikleri ile STBD Arasındaki İlişki.....	39
<b>Tablo 4.6.</b> Koklear Mikrofonik Kategorilerinin Gruplara Göre Görülme Oranları .....	41
<b>Tablo 4.7.</b> Kontrol Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları .....	48
<b>Tablo 4.8.</b> Plasebo Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları .....	49
<b>Tablo 4.9.</b> Deney Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları.....	49

<b>Tablo 4.10.</b> Kontrol Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları .....	49
<b>Tablo 4.11.</b> Plasebo Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları .....	49
<b>Tablo 4.12.</b> Deney Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları .....	50
<b>Tablo 4.13.</b> Deney Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları .....	50
<b>Tablo 4.14.</b> Plasebo Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları .....	51
<b>Tablo 4.15.</b> Kontrol Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları .....	51

## GRAFİKLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Grafik 4.1.</b>	Gruplararası transkutan bilirubinometri sonuçları (ünit) .....	36
<b>Grafik 4.2.</b>	Grupların serum total bilirubin düzeyi (STBD) (mg/dL).....	36
<b>Grafik 4.3.</b>	Koklear Mikrofonik ve Benzeri Örüntü Formu Oranları.....	42
<b>Grafik 4.4.</b>	Gruplardaki Ratların Sağ ve Sol Kokleadaki DTH Morfometrik Bulguları .....	43
<b>Grafik 4.5.</b>	Gruplardaki Ratların Sağ ve Sol Kokleadaki İTH Morfometrik Bulguları.....	44
<b>Grafik 4.6.</b>	Gruplardaki Ratların KN Morfometrik Bulguları .....	45

## RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Resim 3.1.</b> Ratta İBC Ölçümü .....	30
<b>Resim 3.2.</b> Ratta OAE Ölçümü .....	31
<b>Resim 3.3.</b> Ratta Tkb Ölçümü.....	33
<b>Resim 4.1.</b> Kategori 1 Örneği.....	39
<b>Resim 4.2.</b> Kategori 2 Örneği.....	40
<b>Resim 4.3.</b> Kategori 3 Örneği.....	40
<b>Resim4.4.</b> Kategori 4 Örneği.....	41
<b>Resim 4.5.</b> Kontrol grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle normal koklea görüntüsü (x10 büyütme) .....	46
<b>Resim 4.6.</b> Kontrol grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle normal DTH,ITH görüntüsü (x10 büyütme).....	47
<b>Resim 4.7.</b> Deney grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle koklea görüntüsü (x10 büyütmede).....	47
<b>Resim 4.8.</b> Deney grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle DTH,ITH görüntüsü (x40 büyütme) .....	48

## 1. GİRİŞ

Hiperbilirubinemi, bilirubin metabolizmasının herhangi bir basamağında meydana gelen bozukluk sonucu bilirubin kanda yükselmesi ile ortaya çıkan, yenidoğanlarda sıklıkla görülen, fizyolojik ya da patolojik bir durumdur. Yenidoğan hiperbilirubinemisi 1900'lü yılların ortalarından bu yana, çocukluk çağı işitme kayıplarında ana risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (1). Hiperbilirubineminin işitme fonksiyonu üzerindeki etkilerinin kandaki düzeye bağlı ve progresif bir doğası olabileceği yönünde görüşler mevcuttur (2). Bilirubin yüksekliğinin Sensöri- Nöral İşitme Kaybı (SNİK) ve İşitsel Nöropati Spektrum Bozukluğu (İNSB) için risk faktörü olduğu bilinmektedir (3). SNİK, koklea, 8. sinir, beyin sapı veya korteks düzeyindeki bir patolojiye bağlı oluşmaktadır. Çocuklardaki SNİK'lerin %50 kadarı genetik olmakla birlikte prenatal, natal veya postnatal dönemlerdeki patolojilere bağlı olarak gelişmektedir (4). Yenidoğan ve infantlarda hiperbilirubinemiye bağlı SNİK prevalansı %12,8 olarak saptanmıştır (5). İNSB, bilinmeyen fazla ve üzerinde çok çalışılan bir konudur. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda ilk olarak 1996 yılında işitme kaybı olan bazı hastalarda "İşitsel Nöropati" tanımı yapılmış, bu konudaki çalışmaların ve deneyimlerin de artmasıyla 2008 yılında patofizyolojisindeki çeşitlilik nedeniyle '*Auditory Neuropathy Specturum Disorder*' (ANSD) (İşitsel Nöropati Spektrum Bozukluğu-İNSB) teriminin daha doğru olacağı yönünde fikir birliğine varılmıştır (6). İNSB'de bazı vakalarda sadece iç kulaktaki iç tüy hücreleri etkilenirken, bazı vakalarda ise sadece santral işitsel yol etkilenmektedir. Yapılan bir çalışmada, risk altındaki çocuklarda %0.23, işitme kayıplı çocuklarda ise %11 oranında İNSB görülme sıklığı bildirilmiştir. İNSB risk faktörleri arasında hiperbilirubinemi, prematüre doğum, genetik, perinatal mekanik ventilasyon yer almaktadır. Hiperbilirubinemi ile ilişkili İNSB, hiperbilirubinemili yenidoğanlarda %2,7 oranında görülmektedir (7). Bilirubin, işitsel-nöral yollar için spesifik bir eğilime sahiptir ve dolayısıyla hiperbilirubineminin neden olduğu iç tüy hücreleri, spiral ganglion veya 8.siniri kapsayan patofizyolojisini belirlemek amacıyla otoakustik emisyon (OAE) varlığı ve anormal işitsel beyinsapı cevabı (İBC) ile birlikte koklear mikrofonikler



kullanılmaktadır. Hiperbilirubinemi, İBC ve OAE ölçümündeki etkisini anormal yanıtlarıyla göstermektedir. Hiperbilirubinemisi olan yenidoğanlarda bilirubin tedavisi öncesinde elde edilen bozuk cevaplar, tedavi sonrasında normale döndüğü gibi, mevcut bilirubin düzeyine göre daha da patolojik bir hal alabilmektedir (8).

Çalışmamızın amacı, toksik dozda bilirubin seviyesi ile hiperbilirubinemili yenidoğan rat modeli oluşturarak, bilirubin yüksekliğinin işitme sistemi üzerine etkilerini elektrofizyolojik test bataryaları ve morfolojik değişikliklerle saptamaktır.

Çalışmanın hipotezi,

“Yenidoğan ratlara toksik dozlarda bilirubin verilmesi sonucunda kandaki bilirubin düzeyinin yükselmesi ile SNIK ve/veya İNSB oluşacaktır.”

## 2. GENEL BİLGİLER

### 1.1. HİPERBİLİRUBİNEMİ

Hiperbilirubinemi yenidoğan döneminin en sık karşılaşılan sorunlarından birisidir. Hemoglobinin hem parçasının yıkım ürünü olan bilirubin, erişkin serumunda 2 mg/dL, yenidoğanda 5-7 mg/dL'nin üzerine çıkıp, cilt ve skleranın sarıya boyanması ile oluşmaktadır. Sağlıklı term yenidoğanların %60'ında, pretermilerin ise %80'inde hiperbilirubinemi görülmektedir (9,10).

Yenidoğan hiperbilirubinemisi 1900'lü yılların ortalarından bu yana, çocukluk çağı işitme kayıplarında temel risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Sensörinöral işitme kaybı için risk faktörü olduğu bilinen yenidoğan dönemindeki hiperbilirubinemi, kendini zeka geriliği ile belli eden "kernikterus" olarak adlandırılan beyin hasarıyla da sonuçlanabilmektedir.

Kernikterus, bazal ganglion ve beyinsapı nükleusunda bilirubin çökmesine bağlı beyin hasarıdır. Yenidoğan döneminde bilirubin ensefalopatisi geçiren çocuklarda uzun dönemde ortaya çıkan nörolojik sekellere de kernikterus adı verilir. Bilirubin ensefalopatisi terimi ise akut dönemde ortaya çıkan ve genellikle geri dönüşü olan klinik bulguları tanımlamada kullanılır (1, 11).

#### 1.1.1. Bilirubin Metabolizması

Bilirubin mekanizmasının basamaklarını şu şekilde maddelemek mümkündür (12, 13, 14).

1. Bilirubin oluşumu: Yaklaşık günde 250-350 mg bilirubin oluşur. Bunun %70-80' i yaşlı eritrositlerin parçalanması sonucu ortaya çıkar. Geri kalan %20-25' lik bölümü kemik iliği ve karaciğer başta olmak üzere diğer başka hem proteinlerden kaynaklanır. Eritrosit hemolizinde artma bilirubin oluşumunda artmaya neden olan en önemli faktördür.

2. Plazmada taşınması: Bilirubin suda çözünmeyen bir maddedir. Konjuge olmayan bilirubin, albümine bağlı olarak plazmada taşınır.

3. Karaciğer tarafından alınması

4. Konjugasyon: Serbest bilirubin karaciğerde konsantre olduktan sonra, glukuronik asit ile konjuge (direkt reaksiyon veren) bilirubin oluşturur.

5. Safra yoluyla atılması: Konjuge bilirubin, safranın diğer yapı maddeleri ile birlikte safra kanaliküllerine atılır. Bunların çoğu dışkı ile atılır ve dışkıya rengini veren maddelerdir.

Bu basamakların herhangi birinde meydana gelebilen bir bozukluk hiperbilirubinemiye neden olmaktadır. Bilirubin oluşumunda artma, karaciğer tarafından alımında bozukluk veya konjugasyonun azalması, konjuge olmayan hiperbilirubinemiye yol açar. Safra ile atılımında bozukluk ise konjuge hiperbilirubinemiye neden olur.

Konjuge olmayan hiperbilirubinemiler *Hemoliz*, *Gilbert Sendromu* ve *Crigler-Najjar Sendromu* ile kendini göstermektedir.

## **1.2. HİPERBİLİRUBİNEMİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER**

Hiperbilirubineminin belirlenmesinde rutin olarak kullanılan 2 yöntem vardır. Bunlar, kanda total serum bilirubin düzeyinin belirlenmesi ile deri üzerinden non invaziv olarak Transkutan Bilirubinometri (TkB) cihazı aracılığıyla bilirubin düzeyinin belirlenmesidir.

Serum Total Bilirubin Düzeyi (STBD) insanlar ve kemirgenler arasında farklılık göstermektedir. İnsanlarda, STBD term infantlarda 12 mg/dL'yi, prematürelde 15 mg/dL'yi geçmişse, serum direkt bilirubin seviyesi >2 mg/dL ise veya term bebeklerde 1 haftadan, prematüre bebeklerde 10-14 günden fazla süren

sarılık varsa patolojik hiperbilirubinemi düşünülmektedir. Kemirgenlerde ise STBD  $0,2 \pm 0,2$  mg/dL olarak belirtilmektedir. Bu değerin üstü hiperbilirubinemi olarak kabul edilmektedir (15,16).

TkB yenidoğanda bilirubin düzeyini belirlemede kullanılan pratik ve non invaziv bir metoddur. Mavi (450 nm) ve yeşil (550 nm) dalga boyu bölgelerindeki ışık için optik yoğunluktaki farkı ölçerek infantın subkütanöz dokusunun sarılığını tespit eder. Ölçüm probunun iki optik yolu vardır. Bu metod, melanin pigmenti ile cilt maturitesinin etkilerini minimize ederek infantın subkütanöz dokusundaki sarılığın daha hassas ölçülmesine olanak sağlar.

Ölçüm probu infantın alınına veya göğsüne doğru bastırıldığı zaman, içerdeki xenon lamba yanar. Xenon lambadan çıkan ışık cam fiberden geçerek cildi aydınlatır. Işık yayılır ve deri ile subkütanöz dokuda sırasıyla emilerek daha sonra cam fiberin sensör tarafına geri döner. Geri dönen ışıktan, subkütanöz dokunun yüzeysel bölgesinden yayılan kısmı fiberin iç çekirdeğinden veya kısa-optik yoldan geçer.

Subkütanöz dokunun derin bölgelerinden yayılan kısım fiberin dış çekirdeğinden veya uzun-optik yoldan geçerek ilgili fotodiyoda ulaşır. Optik yoğunluklardaki farkı hesaplayarak, epidermis ile dermiste ortak olan kısımlar çıkarılır ve sonuç olarak iki dalga boyu alanı arasındaki optik yoğunluklar sadece subkütanöz doku için elde edilebilir. Optik yoğunluk farkı toplam serum bilirubin konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki gösterdiği için, tahmini bilirubin konsantrasyonuna çevirilir ve dijital olarak gösterilir (17).

### 1.3. İŞİTME SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ

İşitme; atmosferde meydana gelen ses dalgalarının kulağımız tarafından toplanıp beyindeki merkezlerde karakter ve anlam olarak algılanmasına kadar olan süreç olarak tanımlanmaktadır. Geniş bir bölgeyi kapsayan işitme sistemi içinde dış, orta ve iç kulak ile santral işitme yolları ve işitme merkezi bulunmaktadır. İşitme birbirini izleyen bir kaç fazda gerçekleşir. Bunlar;

1. Dönüşüm (*transduction*) fazı: İç kulakta frekansların periferik analizi yapılır ve korti organında ses enerjisi biyokimyasal olaylarla elektrik enerjisi haline dönüştürülür (12).

2. Ses dalgalarının perilenfe iletilmesi: 1960 yılında Bekesy kobaylarda stroboskopik aydınlatma ile ses dalgalarının baziller membranda meydana getirdiği değişiklikleri araştırmıştır. Ses dalgalarının perilenfe geçmesi ile perilenf hareketleri ve baziller membranda titreşimler meydana gelir. Bu titreşimler bazal turdan başlayarak apikal tura kadar uzanır. Bekesy bu harekete ilerleyen dalga (*travelling wave*) adını vermiştir.

Baziller membran, bazal turda dar (0.12 mm), apikal turda daha geniştir (0,5 mm). Bazal turda gergin olan baziller membranın genişliği arttıkça gerginliği giderek azalır. Bu fark nedeni ile ses dalgası, bazal turdan apikal tura kadar ilerleyen dalga şeklinde iletilmiş olur. Bekesy'nin ortaya koyduğu diğer bir nokta da baziller membran amplitüdlerinin her yerde aynı olmadığıdır. Baziller membran amplitüdü sesin frekansına göre değişiklik gösterir. Genellikle yüksek frekanslı seslerde baziller membran amplitüdüleri bazal turda en yüksektir.

Buna karşılık alçak frekanslı seslerde baziller membran amplitüdüleri apikal turda en yüksek seviyeye ulaşır.

Kokleada yaklaşık 3.500 iç tüy hücresi (İTH) ve 13.000 dış tüy hücresi (DTH) bulunmaktadır. Bu hücreler ses enerjisinin, yani mekanik enerjinin, sinir enerjisine dönüşümünde rol alırlar. En uzun DTH stereosiliası, tektorial membranın alt yüzüne bağlanır. Daha kısa silialar ve iç tüy hücre stereosiliasının tektorial membranın alt yüzüne bağlı olmadığı düşünülmektedir. Bazal membrandaki yer değişimi, tektorial membran ve retiküler lamina arasındaki DTH' lerini bükerek hareketlendirir. Tektorial membran ve retiküler lamina arasındaki sıvı kayma hareketi İTH' leri hareketlendirir. Böylece İTH hız, DTH yer değiştirme algılayıcısı olarak görev yapar. Her tüy hücresinin titreşim amplitüdünün en yüksek olduğu bir frekans vardır. Bu durum baziller membran amplitütleri için de geçerlidir (12).

Kokleada 4 tür elektrik potansiyeli vardır:

a- Endokoklear potansiyel: Stria vaskularis tarafından oluşturulur. Anoksiye ve oksidatif metabolizmayı bozan kimyasal ajanlara aşırı duyarlı olduğu için, varlığı stria vaskularisin aktif iyon pompalama sürecine bağlıdır (18).

b- Koklear mikrofonik (KM): Büyük ölçüde DTH ve bunların meydana getirdiği  $K^+$  iyonu akımına bağlıdır. Baziller membran hareketleri ve ses uyarılarıyla direkt ilişkilidir. DTH harabiyetinde kaybolur.

c- Sumasyon potansiyeli: İTH içindeki elektriksel potansiyelin yönlendirdiği bir akımdır. Ses uyarısına, frekansına ve şiddetine göre değişir (12).

d- İstirahat Potansiyeli: İstirahat konumundaki bir hücrede (- 80 mV), endolenfte ise (+ 80 mV) elektrikli potansiyel ölçülmüştür. Yukarıda bahsedilen diğer tüm potansiyeller ise kokleanın uyarılmasıyla elde edilmektedir.

3. Nöral şifre (*neural coding*) fazı: İç ve dış tüy hücrelerinde meydana gelen elektriksel akım, kendisi ile ilişkili sinir liflerini uyarır. Bu şekilde elektrik enerjisi, frekans ve şiddetine göre korti organında kodlanmış olur. İnsanlarda işitme siniri 30.000 liften yapılmıştır. Bu liflerin %90-95'i miyelinli, bipolar ve İTH'nde sonlanan, tip I nöron şeklindedir. Buna karşılık %5-10'u miyelinsiz, unipolar ve DTH'nde sonlanan, tip II nöron şeklindedir. Tıpkı tüy hücreleride olduğu gibi her sinir lifinin duyarlı olduğu bir frekans vardır (19).

4. Algı (cognition) – birleştirme (association) fazı: Tek tek gelen bu sinir iletimleri, işitme merkezinde birleştirilir ve çözülür. Böylece sesin karakteri ve anlamı anlaşılır hale getirilir. Spiral gangliondaki sinir hücrelerinin aksonları *n. cochlearis* adını alarak pontadaki koklear nukleuslara ulaşırlar. Koklear nukleuslar (KN), ventral ve dorsal olmak üzere iki gruptur. Alçak frekanslı seslerle oluşan uyarı ventral nukleusta, yüksek frekanslı seslerle oluşan uyarı dorsal KN'de sonlanır. Bu liflerin çoğu beyin sapının karşı tarafına geçerek *Superior Olivary Complex'e* (SOC) katılırlar. Lifler buradan *Lateral Lemniscus* (LL) ve *Inferior Colliculusa* (IC)

giderler. IC'den çıkan lifler medial geniculate nukleus aracılığı ile temporal loptaki *Sylvian fissure*'a yerleşmiş işitme merkezine gelirler (19).

#### **1.4. HİPERBİLİRUBİNEMİNİN İŞİTME SİSTEMİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİSİ**

Bilirubin hücrelerde, hücre membranı, lipozomlar, sinaptozomlar ve membraböz veziküllerdeki fosfolipidlere bağlanırlar. Nöronlarda ise önce distal aksonlara bağlanır, daha sonra hücre gövdesine ulaşır. Bilirubinün bazal ganglionlara etkisinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle klinik bulgulara yol açabilecek toksisitenin hangi düzeyde ne kadar süre kalması gerektiği de bilinmemektedir.

Bilirubin, *in vitro* ortamda birçok hücresel fonksiyonu bozar. Bilirubin hem ekstraselüler ortamda oturur hem de membrana bağlanır. Membrana bağlanan bilirubin, yüzey gerilimi ve membran polaritesini azaltır, membrandaki iyon transport kanallarını etkileyerek iyon değişimine yol açar. Su ve sodyum transportu inhibe olması sonucu kernikterusta görülen nöronal şişme ve piknosis görülür. Diğer yandan mitokondrial fonksiyonu bozar ve metabolik aktivitesini azaltır. Bilirubin nöronların arasındaki iletimi de etkiler. Bilirubin toksisitesinin akut dönemlerinde membran potansiyelinin azalması, hücreler arası iletiyi de azaltmaktadır.

Bilirubin düzeyindeki artışla oluşan hücresel metabolik aktivitelerin değişimi sonucu, farklı derecelerde işitme kaybı, atetoid serebral palsi, nöbetler ve kernikterusa bağlı ölümden, mental retardasyon, davranış problemleri, gecikmiş konuşma ve kognitif hasara kadar değişik yelpazede görülebilir. Kernikterus içinde ekstrapramidal anormallikler ve spastisite, bakış anormallikleri (özellikle yukarı bakış bozukluğu) ve dişlerde enamel hipoplazi görülür (20,21).

Hiperbilirubineminin işitme sistemi üzerine olan etkileri giderek daha çok dikkat çekmekte ve bu alanda yapılan çalışma sayısının artmasına sebep olmaktadır. Sıklıkla, bilateral ve simetrik yüksek frekans işitme kaybı, KN'lerin patolojik lezyonları bildirilmektedir. Prematürite veya düşük doğum ağırlığıyla birlikte

görülen kernikteruslu çocukların postmortem incelemelerinde santral işitsel patolojiler, özellikle beyinsapı düzeyinde dorsal, ventral KN, SOC, LL, IC hasarları belirlenmiştir. Bunlara işitme siniri ya da iç kulak sorunları da eşlik edebilmektedir. Çalışmalarda, kernikterus gelişmeksizin sadece bilirubin seviyesindeki artışla da orta-ileri derecede işitme kaybı veya santral işitsel disfonksiyon görülebileceği belirtilmiştir. Dolayısıyla hem bilirubin düzeyi hem de bilirubin yüksekliğiyle geçen süre işitmede patolojik sonuçların oluşmasında önemli risk faktörleri arasında olduğu belirtilmektedir (5,20, 21,22).

#### **1.4.1. İşitme Kaybı ve İşitsel Nöropati Spektrum Bozukluğu**

İşitme kaybı santral ve/ veya periferik işitsel sistemin herhangi bir kısmında oluşan hasar veya patoloji sonucu işitme duyarlılığının azalması ya da kaybolmasıdır (23). Yenidoğan ve infantlarda işitme kaybının prevalansı her 1000 canlı doğumda 1,5 ile 6,0 arasındadır (24, 25, 26). İşitme kayıpları konjenital veya akkiz olarak gelişebilir. Patolojinin lokalizasyonuna göre iletim tipi, sensorinöral ve mikst tip işitme kayıpları olarak sınıflandırılabilir. İletim tipi işitme kaybı, sesin iç kulağa iletimi aşamasında dış ve orta kulak düzeyinde bir patolojiye; sensorianöral tip işitme kaybı (SNİK) koklea, 8. sinir, beyin sapı veya korteks düzeyindeki bir patolojiye bağlı oluşur. Mikst tip işitme kaybı aynı anda hem iletim hemde sensorinöral komponenti olan işitme kaybıdır. İşitme kaybı konjenital veya geç başlangıçlı olabilir ve SNİK %20, iletim tipi %30 ve mikst tip %50 oranında olarak görülür (27).

Çocuklardaki SNİK larının %50 kadarı genetik nedenlere bağlıdır. Genetik sebeplerle oluşan SNİK'larının %30 kadarı da bir sendromun parçasıdır (4). Genetik olmayan SNİK'ları prenatal, natal veya postnatal oluşan patolojilere sekonder gelişir. Çocuklarda SNİK etyolojik faktörleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir (28).



**Tablo 2.1.** Çocuklarda SNİK Etiyolojik Faktörleri (28)

GENETİK NEDENLER	GENETİK OLMAYAN NEDENLER
Otozomal Dominat Bozukluklar ( <i>Waardenburg, Stickler, Treacher Collins</i> )	Enfeksiyonlar ( <i>Kızamık, kızamıkçık, kabakulak, CMV,</i>
Otozomal Resesif Bozukluklar ( <i>Usher, Pendred, Javel-Lange-Neilsen</i> )	<i>İnfluenza, Varicella Zoster, Adenovirus</i> )
Sex-linked Bozukluklar ( <i>Wildenvaank, Alport</i> )	Ototoksik ilaç kullanımı ( <i>Antibiyotikler, diüretikler</i> )
Multifaktorial Genetik Bozukluk ( <i>Goldenhar</i> )	Anoski ve hipoksi <b>Hiperbilirubinemi</b>
Kromozom bozukluğuna bağlı sendromlar ( <i>Down, Turner</i> )	Prematürite Düşük doğum ağırlığı Kulak – kafa travmaları Gürültüye maruz kalma

İNSB, akustik uyarıların iç kulak, işitme siniri ve işitsel beyin sapında distorsiyonuna sebep olan bir hastalıktır. İNSB, kokleada normal DTH fonksiyonu mevcutken, işitme siniri fonksiyonun bozulmasıyla karakterizedir (29).

1970’lerde, işitsel beyinsapı cevaplarının (İBC) geliştirilmesiyle nörolojik bozuklukları olan hastalarda uygulamalar yapılmış, normal ve işitme kaybı olan olgulara göre farklılıklar gözlenmiştir (30).

1980’li yıllarda odyolojik testlerde karşılaşılan beklenmedik ve paradoksal bulgular ‘işitsel nöropati’ teriminin kullanılmasına sebep olmuştur. Elde edilen bu bulguları tanımlamada, tam olarak da doğru olmayan “nöropati” terimi ilk olarak nörologlar tarafından kullanılmıştır (31-36).

1990’lı yılların başında sıklıkla kullanılmaya başlanan otoakustik emisyonlar (OAE) nörolojik olarak risk altında olan bebek ve/veya çocukların işitmelerinin

değerlendirmesinde kullanılmıştır. Bu olgulardan elde edilen bulguların diğer testler ile kıyaslanması sonucunda anormal bulgulara daha sıklıkla rastlanmaya başlanmıştır.

Nörolog Arnold Starr ve diğ. (37) 1991 yılında, İBC olmamasına rağmen normal OAE yanıtların ve koklear mikrofoniklerin (KM) elde edilmesi gibi paradoksal bulgularla birlikte hafif derecede işitme kaybı olmasına rağmen ileri derecede konuşmayı anlama problemi olan 11 yaşında bir çocuğu tanımlamışlardır. Olguda, bu bulguların yanı sıra *gap detection* ve *binaural* maskeleye seviye farkını içeren psikoakustik test bulgularında da anormallik bulmuşlardır. Daha sonraki yıllarda ise Starr ve diğ. (38) benzer bulgular taşıyan bir grup olgu tanımladıklarını ve bu olgularda işitme kaybının yanı sıra herhangi bir nörolojik bulgu olmamasına rağmen, 10 olgunun 8'inde periferik nöropati olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen bu deneyimler doğrultusunda Starr ve diğ. işitme sınırı nöropatisi olan işitme kayıplı olguları tanımlayarak, ilk kez 1996 yılında 'İşitsel Nöropati (İN)' terimini literatüre yerleştirmiştir.

İN tanımıyla birlikte pediatrik odyolojinin değerlendirme ve tedavisinde farklı bir bakış açısı oluşmuştur.

Berlin ve diğ. (39) 2001 yılında '*Auditory Dys-Synchrony*' (İşitsel Dissenkroni) terimini kullanmaya başlamışlardır. Araştırmacılar, İN olgularının ortak odyolojik bulguları olmasına rağmen heterojen bir grup oluşturduklarına dikkati çekmiştir. İN olgularının bir kısmı pre/perinatal nedenlerle genetik mutasyon sonucu oluşan hastalıklara konjental olarak sahipken diğer bir kısmı periferik nöropatiye neden olan daha geç tutulumlu hastalıkların özelliklerini taşımaktadır (40,41).

Berlin ve diğ.'nin (39) İN sebebi olan spekülatif mekanizmalar, selektif iç tüy hücre (İTH) kaybı, snaptik veya myelizan hastalıklar veya periferik nöropatinin işitme sınırını etkilemesine ilişkin verileri bu konuya olan bakış açılarını geliştirmiştir. Bu gelişmelere paralel olarak 2004 yılında, Star ve diğ.(42), İN'yi Tip I (Proksimal) ve Tip II (Distal) olarak iki temel gruba ayırmıştır. Araştırmacılar, lokalizasyon bölgelerini Tip I İN'de spiral ganglion, akson ve dendirit'ler olarak

belirtirken Tip II İN'de ise terminal dendirit, İTH ve snaptik bağlantılar olarak belirtmişlerdir.

Rapin ve diğ.(43), 2006 yılında Primer demyelizan nöropati ve Primer aksonal nöropati olmak üzere iki yeni grup tanımlamış ve İşitsel Dissenkroni teriminin yetersiz olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalar, İN'ye olan ilginin artmasına sebep olmuş ve lokalizasyona ilişkin değişik görüşler ortaya atılmıştır. M.M. El-Badry, ve S.L. McFadden (44), İN'nin; İTH düzeyi, İTH ile işitme siniri arasındaki snapslar veya sadece işitme siniri düzeylerinden birinde lezyon veya anormallik sonucunda oluşabileceği belirtirken, Sutton ve diğ. (45) işitme sinirindeki ateşlemenin nöral yol boyunca transmisyonunda dissenkronizasyona yol açtığını ve bunun anormal İBC ile sonuçlandığını belirtmektedirler.

Bu görüşlere ek olarak, Ngo ve diğ. (46), bazı olgularda lezyon kombinasyonlarının da olabileceğini, lezyonun kokleadaki İTH'den işitsel kortekse kadar herhangi bir yerde görülebileceğini belirtirken, El- Badry ve McFadden(44) ise herhangi bir patolojik mekanizmanın temporal kodlama ve nöral senkronizasyona verebileceği hasar ile İN'nin oluşabileceğini belirtmişlerdir.

Heterojen bir gruba sahip olmasının yanı sıra çok yönlü özellikleri de olan İN olguları için 2008 yılında 'Auditory Neuropathy Specturum Disorder' (ANSĐ) (İşitsel Nöropati Senkronizasyon Bozukluğu – İNSB) teriminin kullanılması uygun görülmüştür (6).

Prevelansa ilişkin yapılan çalışmalar yıllara göre değerlendirildiğinde, ilk çalışmaların riskli gruplarda yoğun olduğu görülürken özellikle yenidoğan işitme taramalarının da yaygınlaşması ile günümüzde yenidoğan işitme taraması bebeklerine ait prevelans çalışmalarına da rastlanmaktadır. Prevelans çalışmalarında popülasyonun aynı olmasına rağmen farklı oranların elde edildiği görülmektedir (Tablo 2.2). Bunun muhtemel metod farklılıklarına bağlı olduğunun düşünüldüğü belirtilmektedir (51).

**Tablo 2.2.** İNSB Prevelansı (51)

Çalışma	Populasyon	Olgu Sayısı	İNSB'li Olgu Sayısı	Oran (%)
<b>Steinve ve diğ. (1996)</b>	Özel bakım ünitesi	100	4	4,00
<b>Psarommatis ve diğ. (1997)</b>	Yoğun bakım ünitesi	102	2	1,96
<b>Berg ve diğ.(2005)</b>	Yoğun bakım ünitesi	1194	115*	9,63
<b>Psarommatis ve diğ. (2006)</b>	Yoğun bakım ünitesi	1150	25**	2,17
<b>Vohr ve diğ. (1998)</b>	Yenidoğan Tarama	111	2	1,80
<b>Cone–Wesson ve diğ. (2000)</b>	Yenidoğan Tarama	56	3	5,36
<b>Kırkım ve diğ. (2008)</b>	Yenidoğan Tarama	65	10	15,38
<b>Rance ve ark (1999)</b>	Riskli bebekler	109	12	11,01
<b>Rance ve ark (2005)</b>	Riskli bebekler	290	19	6,55
<b>Kraus ve ark (1984)</b>	İşitme engelli çocuklar	48	7	14,58
<b>Park&amp;Lee (1998)</b>	İşitme engelli çocuklar	139	7	5,04
<b>Lee ve ark (2001)</b>	İşitme engelli çocuklar	67	2	2,98
<b>Madden ve ark (2002)</b>	İşitme engelli çocuklar	428	22	5,14
<b>Tang ve ark (2004)</b>	İşitme engelli çocuklar	56	1	1,78

\*Çalışmada kullanılan İBC sadece tarama düzeyinde kullanılmıştır (35 dBnHL), \*\*25 olgunun 12'sinde nöral senkronizasyon daha sonradan düzelme göstermiştir.

Heterojen bir özellik gösteren İNSB'nin etiyolojik faktörleri de çok geniş bir aralığa sahiptir. İNSB'nin etiyolojik faktörleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir (47).

**Tablo 2.3.** İNSB Etiyolojik Faktörleri (47)

GENETİK		DİĞER
<b>Sendromik Olanlar</b>	<b>Sendromik Olmayanlar</b>	
Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hastalığı	Otozomal Dominant ( <i>AUNAI</i> )	Hipoksi
	Otozomal Resesif ( <i>OTOF, PJVK</i> )	İskemi
Otozomal Dominant	X-Linked	Prematurite
Optik Atrofi		<b>Hiperbilirubinemi</b>
Leber'in Herediter Optik Nöropatisi		Hidrocefali
Friedreich Ataksisi		İmmün hastalıklar ( <i>Gullian Barre Send vb.</i> )
		İnflamatuar nöropati
		İleri derecede gelişimsel gerilik

## 1.5. ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER

### 1.5.1. Otoakustik Emisyon (OAE)

OAE'ler, insanların ve hayvanların dış kulak yolundan tespit edilebilen, koklear kaynaklı, hafif şiddette akustik enerji yayılımlarıdır. Bu akustik enerjinin, DTH'nin mekanik aktivitesi ile olduğu düşünülmektedir. OAE'da cevaplar, spontane olarak kaydedilebilmesinin yanı sıra farklı uyaran tipleri verilerek de kaydedilebilmektedir. İşitme eşiğini belirlemede kullanılmayan OAE'lar sadece işitme fonksiyonunun belirlenmesine yardımcı olmaktadır (48,49).

Akustik uyaran şiddetindeki artışlar, orta kulak sisteminde lineer özellik gösterirken bazal membran titreşimlerinde nonlineer özellik göstermektedir. Buna göre orta veya yüksek şiddetteki akustik uyarılar, OAE amplitüdlerinde çok kısıtlı

miktarda nonlinear özellikte amplifikasyona yol açarlar. Kulağa verilen düşük şiddetli uyarana karşı OAE amplitüdüleri lineer artış gösterirken uyarın şiddetinde artma oldukça nonlinear artış gösterir. Bu durum da OAE'ların koklear orjinli olduğunu desteklemektedir (4,50).

Uyarılmış OAE ölçümlerinin İNSB olgularında yapılmasının en önemli nedeni bu olguları SNİK olan olgulardan ayırabilmektir. Pozitif OAE bulguları ile anormal İBC bulgularının uyumsuzluk göstermesi bu olguları SNİK olgulardan ayıran en önemli özelliklerdendir. Bununla birlikte bazı İNSB olgularında negatif OAE cevapları da görülebilmektedir. Bu olgulardaki negatif OAE cevabının, değişik tip ve derecelerde işitme kaybı olarak yorumlanmasına paralel olarak hatalı amplifikasyon uygulamalarının sonucunda meydana gelmiş olabileceği de belirtilmektedir (51). OAE'lar spontan ve uyarılmış otoakustik emisyonlar olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Bu iki grubu birbirinden ayıran temel özellik spontan OAE ların oluşmasında bir akustik uyarana ihtiyaç yokken uyarılmış OAE ların oluşması için mutlaka akustik uyarın olması gerekliliğidir (52).

Spontan otoakustik emisyonlar (SOAE) uyarın olmadan dış kulak yolundan kayıt edilen dar bantlı düşük yoğunluklu akustik sinyallerdir. Normal işitmesi olan tüm popülasyonun %40-70'inde bulunurlar (53, 54, 55). Yaşla birlikte prevalansları ve amplitüdüleri azalmaktadır (56, 57, 58). SOAE'lar uyarılmış emisyonlara göre daha duyarlıdır. Ototoksik ilaçlarla ve çevre gürültüsü ile prevalans ve amplitüdüleri azalabilir. SOAE varlığında bireyin işitmesinin normale yakın olduğu söylenebilmekle birlikte olmaması da işitmenin olmadığı anlamına gelmemektedir.

Uyarılmış OAE ları da 3 temel grupta incelemek mümkündür. Bunlar;

a) SFOAE (Stimulus frekans OAE) Stimulus frekans otoakustik emisyonlarda saf ses uyarınlar verilerek koklea uyarılır ve cevaplar alınır. Cevaplar uyarının sürekli olarak verildiği sırada kaydedildiği için elde edilen cevabı uyarından ayırmak için özel düzenek gerektirmektedir. Teknik zorluklar ve ayrıntılar, klinik uygulamalarına geçilmesinde en önemli engeldir (59).

b) TEOAE (*Transient Evoked OAE*): Kısa süreli klik ya da tonal akustik uyararı takiben 4-20 ms içinde kaydedilen bu emisyonlar “Kemp Echoes “ olarak ta adlandırılmaktadırlar (60). Klinik kullanımı çok yaygındır. Normal koklear fonksiyonlara sahip tüm kulaklarda elde edilme olasılığı çok yüksek olan bu emisyon cevabında bireyler arasında amplitüd ve frekans farklılıkları bulunur. En sık 700-4000 Hz frekans aralığında izlenen TEOAE ölçümlerinde dikkate alınması gereken bir nokta da sensörinöral işitme kayıplarından etkilenmesidir. Literatürde 30 dB’den daha fazla olan kayıplarda tespit edilemediği bildirilen TEOAE’un ortalama işitme eşiği aralıklarına göre görülme yüzdeleri şu şekildedir (Tablo 2.4) (56,60).

**Tablo 2.4.** TEOAE’nin İşitme Aralıklarına Göre Görülme Yüzdeleri (56)

Saf Ses Ortalaması	TEOAE Cevabı Görülme Oranı
0-10 dB	%100
10-20 dB	%99
20-30 dB	%11
30-35 dB	%8
40 dB üstü	%0

Dış tüy hücre fonksiyonlarını değerlendirmede elektrokokleografi (ECohG), İBC ve konvansiyonel odyometrik ölçüme göre daha değerli olan TEOAE cevaplarında göz önüne alınması gereken önemli nokta 3500 Hz den sonra emisyon cevabının azalmaya başlamasıdır (61).

Sensitivitesi %90’ların üzerinde olan ve ölçüm süresi kısa olan TEOAE, objektif ve kolay uygulanan olarak koklear fonksiyonların genel monitörizasyonu için uygun bir metod olmakla birlikte laboratuvar hayvanlarında TEOAE kaydı kısa latans süresi nedeniyle çok zordur (22).

c) DPOAE (Distorsiyon Ürünü OAE): Bitonal uyarılar ve intermodülasyon ürünleri olarak da tanımlanabilen ek frekanslar tarafından uyarılan sağlıklı koklea, pek çok farklı distorsiyon ürünleri oluşturur. Bu distorsiyon ürünlerini oluşturmada en etkili frekans  $2f_1-f_2$  dir. Bunda DPOAE’ların bazal membranda oluşma yeri rol

oyunmaktadır (63,64). Oluşan DPOAE'nun amplitüdü, uyarıların şiddeti ile yakın ilişki gösterir. Uyarı tonlarının f2 şiddetleri düşürülerek DPOAE amplitüdündeki değişiklikler kaydedilir. Bu durum bize cevapların non-lineer olduğunu yani kokleadan kaynaklandığını, enstrumantasyon artefaktı olmadığını kanıtlar.

DPOAE'ların yüksek hassasiyeti ve iyi frekans özelliği, normal işitme fonksiyonuna sahip olgularla, DTH'nin ciddi lezyonu olan olguları birbirinden ayırmaya olanak sağlar.

DPOAE lar 50 dB den daha fazla işitme kaybına sebep olan ciddi DTH lezyonları olan olguları belirlemede etkili olarak kullanılmakla birlikte saf ses işitme eşiklerini değerlendirmek için uygun değildir. Çünkü DPOAE'lar normal ve normale yakın orta kulak ve koklear fonksiyonu göstermekle birlikte kesin işitme eşiklerini yansıtmazlar (65,66).

Kemirgenlerde de (ratlar gibi) iki tonla uyarı verilmesi sırasında yüksek seviyeli distorsiyon oluşur. Bu bulgu kemirgenlerde gözlenen DPOAE bulgularının insanlardakine benzer olduğunu göstermektedir (67).

### **1.5.2. OAE ile Kontralateral Supresyon (KLS)**

*Olivary cochlear* sistem, *superior olivary komplex'ten* (SOC) köken alan ve kokleaya uzanan medial ve lateral olmak üzere iki alt sistemden oluşur (68,69). Medial ve lateral *olivary cochlear* daldan sadece medial dalın fonksiyonu biraz anlaşılmıştır. Nöronların hücre gövdeleri medial superior oliveri nukleus yakınında yerleşir ve oradan çaprazlaşarak karşı kulağın DTH'de sonlanırlar. Hem afferent hem de efferent lifler korti organı ve *habenula perforata* da miyelin kılıflarından ayrılırlar (71). Beyin sapında SOC'tan köken alan efferent sinir lifleri koklear mekanikleri etkiler (70).

Negatif geri dönüşüm yaparak fonksiyon gören *medial olivary cochlear* (MOC) lifleri, işitme fizyolojisinde büyük önem taşımaktadır. Bu fonksiyon, işitme sisteminin akustik travmadan korunmasının yanı sıra, iletim için basilar membranın optimum statik pozisyonunu da sağlar. Gürültülü ortamlarda konuşmanın daha iyi



ayırt edilmesini sağlayan *antimasking* fonksiyon gören MOC lifleri ayrıca selektif dikkatte görevli olup, akustik uyarın girişini baskılayarak santral işlemeğe izin verir ve daha hayattın ilk yıllarında kokleanın frekans seçiciliğinin gelişimine katkıda bulunur (71-77).

1946 yılında keşfedilen efferent *olivary cochlear* sistem matürasyonu, post konsepsiyonel 30-35 haftadan sonra gerçekleşir (77). *Olivary cochlear* efferentlerin stimülasyonu, basiler membranın frekansa bağımlı vibrasyon hareketinin azalması ile OAE amplitüdlerinin azalmasına neden olmaktadır (71,72). Bu durum MOC aktivasyonun, DTH'nin iletim potansiyelini azaltarak koklear amplifikasyonu ve baziler membran vibrasyonunu azalttığını düşündürmektedir (71).

MOC efferentlerinin işitmenin dinamik dizilimini değıştirdiğı, maskelemeyi azalttığı, akustik travmadan koruduğı, seçici dikkate yardımcı olmasının yanı sıra MOC fonksiyonunun, gürültülü bir ortamda kısa süreli seslerin diskriminasyonunu da arttırdığına dair hipotez ortaya konulmuştur. *Olivary cochlear* lifleri kesilen kediler üzerinde yapılan bir hayvan çalışması bu hipotezi desteklerken insanda böyle olmadığı iddia edilmektedir (78). Hayvan çalışmaları MOC efferentlerinin yüksek şiddetli seslerin sebep olduğu iç kulak hasarına karşı koruyucu olduğunu da göstermiştir. Bu koruyuculukta yavaş MOC etkileri, hızlı MOC etkilerine göre daha önemlidir (79). İnsanlarda MOC efferentlerinin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, performans ve MOC aktivasyonu arasındaki korelasyona bakılmış ve sağlam kulağın karşısındaki kulağa gürültü vererek MOC aktivasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, güçlü MOC refleksi olanların gürültüde sinyali tespit etmede daha yetenekli oldukları anlaşılmış ve bu durumun, gürültüde sesi tespit etmede MOC efferentlerinin rolü olduğu hipotezini desteklediğı belirtilmiştir (72). Anatomik çalışmalar, MOC nöronlarına santralden periferik gelen uyarıların üst merkezlerden geldiğini ve bu şekilde kontrol edildiğini göstermektedir (80,81).

Konuyla ilgili bir hayvan çalışmasında prospektif OAE ölçümleri ile ratlar; akustik travma maruziyetlerine göre zayıf, orta ve güçlü MOC refleksleri olanlar şeklinde sınıflandırılmıştır. Akustik travmaya maruz bırakılmış ve zayıf MOC refleksi olanlar en fazla zararı görürken, en güçlü MOC refleksi olanlar en az zararı

görmüşlerdir. Çalışmada, MOC efferentlerinin akustik travmadan koruma etkisinin yanında, OAE testlerinin hassas ve dayanıklı kulakların ayırtedilmesinde kullanılabileceği de belirtilmiştir (80).

### 1.5.3. İşitsel Beyinsapı Cevabı (İBC)

İBC, normal ya da patolojik işitsel fonksiyonu değerlendirmede kullanılan, kafa yüzeyine yerleştirilmiş elektrotlardan kaydedilen nöronal yanıtlardır. Kullanım kolaylığı ve non invaziv bir yöntem olması nedeniyle klinikte ve deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İBC’ında farklı anatomik bölgelerden köken alan dalgaların, latans, amplitüd ve morfoloji değerlendirilmesi esastır. (82)

SNİK’de İBC eşikleri kullanılan uyaran tipi (tonal, klik vb.) ve değerlendirilen frekans bölgesindeki işitme fonksiyonuna göre yükselbilmektedir (83).

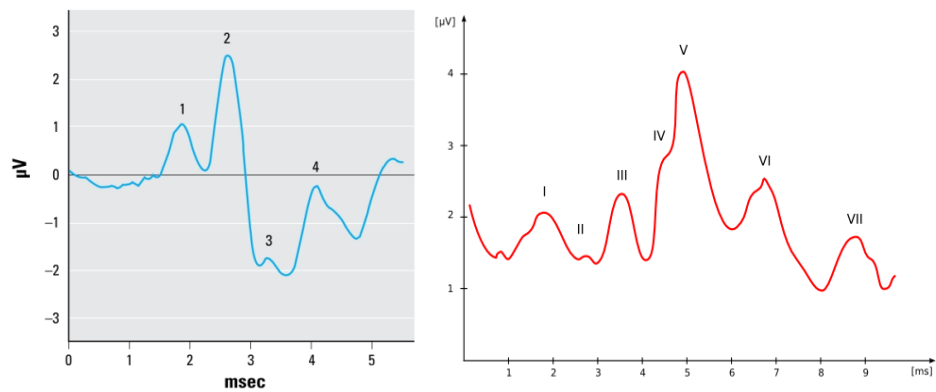
İNSB olan olgularda bu temel parametrelerde farklılık gözlenmesi, tanı konulmasında İBC’nin rolünü oldukça önemli hale getirmektedir. En önemli bulguları İBC kaydında klik uyaranda polarite değişikliğiyle koklear mikrofoniklerin (KM) gözlenmesi ve İBC dalgalarının olmaması ve / veya anormal olmasıdır (35,51).

KM’ler, kokleadaki tüy hücrelerinin polarizasyonu ve depolarizasyonu ile üretilen potansiyellerdir. Bu potansiyeller prenöral yanıtlardır, nöral aktivite üretimine benzememektedir. İBC’da olduğu gibi akustik dalga formuyla ilişkili bir faz gibi görünür. KM’lerin, klik uyararla kaydedilen İBC testinde yüksek uyaran seviyesinde (80 dB nHL) görülebildiği ve 5-6 msn’ye kadar ölçülebildiği belirtilmiştir. Bu koklear potansiyeller 60 dB nHL uyaran seviyesinin altında ortaya çıkmamaktadır. Ayrıca KM’lerin latansı uyaran seviyesiyle değişmemektedir (122). Berlin ve diğ. (41), 2003 yılında yayınladığı çalışmada, İNSB’li 2 aylık bir bebekte KM’ler 80 dB nHL uyaran seviyesinde maksimum 2 msn’yede gözlenmiştir. Wilson ve diğ. nin (84) çalışmasında, I. dalganın saptanmasıyla ilgili hataları önlemek için, belirgin KM aktivitesinin ortaya çıkış süresi uyarandan sonra 0,4-0,7 msn olarak tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kemirgenlerdeki İBC ile insanlar arasında önemli farklılıklar olduğu belirtilmiştir. Bu farklılıkları dalgaların anatomik lokalizasyonu (Tablo 2.5), dalga morfolojisi ve paterni (Şekil 2.1) ile eşik değerlendirmede kullanılan dalga (Şekil 2.2) olarak sıralamak mümkündür. İnsanlarda III. ve V. dalgalar en yüksek amplitüdü olandır ve İBC'yi belirlemede kullanılmaktadır. Oysa ratlarda, II. Dalga en yüksek amplitüdü, III. dalga ise en düşük amplitüdü olandır. En önemli farklılıklardan biri de V.dalganın ratlarda İBC eşik değerlendirilmesinde kullanılmayacağıdır (85-87).

**Tablo 2.5.** İnsanlarda ve Ratlardaki İBC Dalgalarının Anatomik Lokalizasyonu (87).

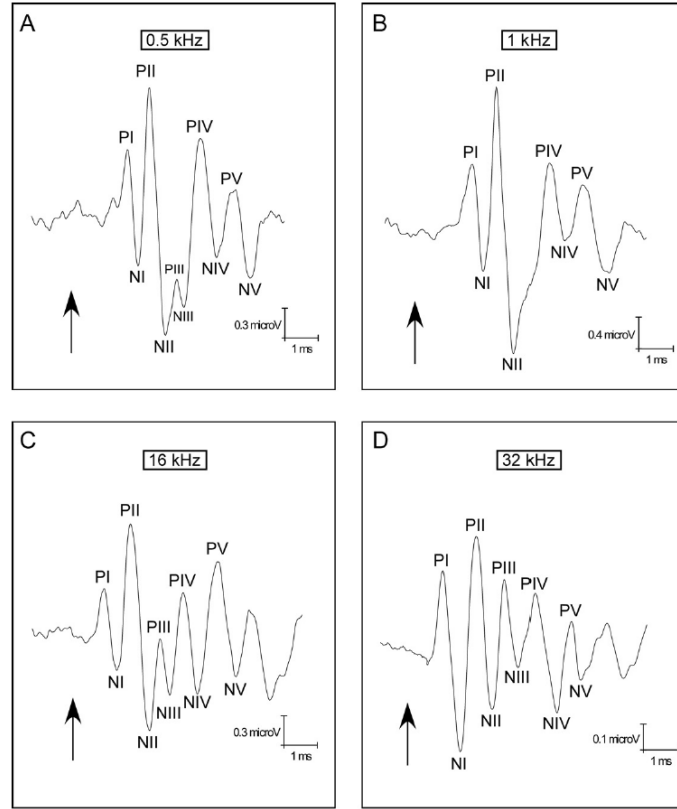
	İnsanlarda	Ratlarda
<b>I. Dalga</b>	VIII. sinirin distali	Posterior ventral KN
<b>II. Dalga</b>	VIII. sinirin proksimali	Anterior ventral KN ve trapezoid cisim
<b>III. Dalga</b>	KN primer nöronlar	SOC
<b>IV. Dalga</b>	SOC nöronlar, muhtemelen KN ve LL	LL ve IC
<b>V. Dalga</b>	LL ve IC	
<b>VI. Dalga</b>	IC	



Ratlarda Klik İBC görüntüsü

İnsanlarda Klik İBC görüntüsü

**Şekil 2.1.** Ratlarda ve İnsanlardaki İBC'nin Dalga Morfolojisi ve Paternleri (119,120).



**Şekil 2.2.** Ratlarda İBC Eşik değerlendirmede kullanılan dalga paterni örnekleri (87)

(A:0,5 kHz Tone- burst uyaranda, B: 1kHz Tone- burst uyaranda, C: 16 kHz Tone- burst uyaranda, D: 32 kHz Tone- burst uyaranda)

## 1.6. DENEY HAYVANLARI

Deney hayvanları, hipotezi bilimsel kuramlara göre kurulmuş, araştırmalarda ve biyolojik testlerde kullanılan hayvanlardır. Hayvan deneyleri, ilgili etik kurul kurallarına uygun olarak her türlü hayvan üzerinde bilimsel çalışma yapılabilmesine olanak sunmaktadır.

### 1.6.1. Tarihçe

Deney hayvanı kullanıldığını bildiren ilk kitap olan '*Corpus Hippocraticum*' (M.Ö. 400) hayvanlar üzerinde anatomik yapıyı belirlemeye yönelik yapılan incelemeler hakkında bilgi vermektedir. 17. yüzyılda insanlar hayvanların mekanik prensiplerle anlaşılabilceğini savunmuşlar ve etik dışı yaklaşımlarda bulunmuşlardır. Birçok araştırmacı, araştırmalarında canlı tavşan, yılan balığı, balık,

inek gibi hayvanlarda deneyleri yapan Descartes'ı takip etmiştir. Darwin'in türlerin kökenini ortaya koyması sonucu hayvanlardan elde edilen bilginin insanlar için de geçerli olduğunu göstermiştir. "Fransız Araştırma Okulu"nun kurulmasından sonra 19. yy.da Claude Bernard'ın çalışmaları ile deneysel tıp hız kazanmış, fizyolojik deneyler için canlı hayvan kullanımının gerekliliği anlatmıştır. 19. yüzyılda yapılan birçok çalışma sonucu canlı hayvanlarda yapılan deney sonuçlarının insanlarda uygulanması ile hastalıkların başarıyla tedavi edildiği görülmüştür. Standart koşullarda yetiştirilmeyen evcil hayvanların deneylerde kullanımı yerine bir bilim dalı haline gelen laboratuvar hayvanlarının oluşturulması farklı türlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Böylelikle, araştırmalarda verilerin aydınlatıcı yönlerinin hiçbir ön yargı olmadan tekrarlanabilmesi ve istenen koşullarda yeniden elde edilmesi sağlanmıştır (88, 89, 90).

### **2.6.2. İlk Rat Standardizasyonu**

Kayıtlara göre ratlar 1877'den günümüze laboratuvarlarda yetiştirilmektedir. İlk albino rat 1906 yılında koloni standardizasyonu yapılmaya çalışılırken bulunmuştur. Daha sonra bu sıçanların Amerika'da Wistar Enstitüsü üretimlerinde melezleri ortaya çıkmış ve oluşan bu tür '*Wistar Albino*' adını almıştır (91).

### **2.6.3. Rat Kulağı Anatomisi ve İşitme Özellikleri**

Rat orta kulağı insan orta kulağındaki tüm anatomik yapıları içerir. Tahmin edileceği üzere, ratlardaki kemikçikler insandakilere göre çok daha küçük olup yaklaşık çeyrek boydadır (92).

Rat orta kulak morfolojisi, Fleischer tarafından (1978) mikro tip organizasyon ortaya konularak tanımlanmıştır.

Rat orta kulağının iki ayırt edici özelliği vardır:

- 1) Malleus, gonial bone bölgesinde timpanik anulusa yapışıktır.
- 2) Malleus bası üzerinde orbiküler apofiz olarak adlandırılan geniş bir kütle vardır.

İnsanlarla, ratlar arasındaki farklılıklar:

1. İnsanlarda, timpanik membran alanı  $\sim 66 \text{ mm}^2$ 'dir. Oysa ratlarda yalnızca  $\sim 11 \text{ mm}^2$ 'dir (93).
2. Pars tensa ve pars flaksidanın rölatif boyutları da tamamen farklıdır. İnsanlar, timpanik membranın total büyüklüğü ile kıyaslandığında çok küçük bir pars flaksidaya sahip iken, ratlarda pars flaksida timpanik membranın 1/4 ila 1/3'ünü oluşturur.
3. Rat orta kulağının küçük bullası ve genellikle kapalı olan, horizontale yakın *Eustachian* tüpü (ET) vardır. ET mukozası, büyük yoğunlukta goblet hücreleri, daha az miktarda da muköz glandlar içerir (94).
4. Rat ET açılma basıncı insandakine benzerdir. ET iki ayrı silyalı ve sekretuar kanal yoluyla epitimpaniuma bağlıdır.
5. Rat ve insan mukozası mukosilyer transport sistemi dağılımında benzerlik gösterir (95).
6. Rat orta kulağı temporal kemikte yerleşmiş ve iyi korunmuştur.

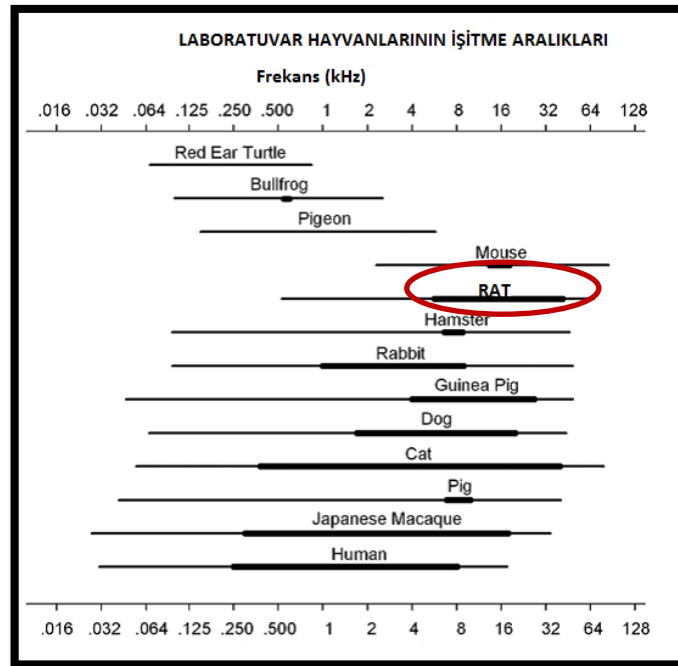
Timpanik membrana muayene için sıradan bir otomikroskop ile kolayca ulaşılabilir. Rat orta kulağının üç boyutlu yapısı insaninkine benzer. Ancak mastoid hücreler yerine kavite tabanından çıkıntı yapan timpanik bulla mevcuttur. Pars tensa ve geniş pars flaksidası ile timpanik membran, lateral duvarın büyük kısmını oluşturur. Medial duvarda promontoryum, yuvarlak pencere, stapes ile birlikte oval pencere ve ET'nün timpanik ağzı yerleşmiştir. Silyalı ve sekretuar iki kanal dışında timpanik kavite, basit, skuamöz-küboidal, silyasız epitel ile döşelidir. Patolojik koşullar esnasında bu basit epitel değişip, silyalı ve sekretuar hücreler kanallar dışında yüksek sayıda görülür.

İnsanlarda, malleus-inkus kompleksi genellikle, en azından düşük frekanslarda, iki asıcı ligaman doğrultusunda olan rotasyonel aksa sahiptir. Bu iki ligaman; anterior malleolar ve posterior inkudal ligamanlardır. Fleischer'a (1978)

göre, mikrotip kulakta, malleusun timpanik anulusa belirgin fiksasyonuna ragmen kompleks hala rotasyon yapabilir. Bu ilişki ve inkus kısa kolunun bağlantısı insandakine benzer rotasyonel aks oluşturur. Ratlar ile insanlar arasındaki farklardan bir tanesi, ratlarda manubriumun, rotasyon aksına paralele yakın yerleşmesidir. Fleischer (1978), genişletilmiş model üzerinde yaptığı çalışmalarda orbiküler apofizin meydana getirdiği ek kitlenin, malleus-inkus kompleksinin yerini değiştirdiğini bulmuştur. Bu da yüksek frekanslarda malleusun transvers bölümü doğrultusunda ikinci bir rotasyon aksı oluşturmaktadır. Bunlara dayanarak, mikrotip kulakların iki tane rotasyon aksı olduğu ve malleusların iki adet net olarak tanımlanmış vibrasyon modu olduğu sonucuna varmıştır.

Kokleanın ekseni daire tam olarak sagittal ve horizontal düzlemde yerleşmiştir. Kokleanın dönüş sayısı  $21/4$  veya  $21/2$  olarak belirlenmiştir. Koklear kanalın uzunluğu 12,16 mm'dir. Membranöz kokleanın yapısı diğer memeliler gibidir (96).

Ratların işitme duyuları iyi gelişmiştir. Ratlarda işitme aralığı 70 dB'de 250-80.000 Hz aralığında değişmekle birlikte seslere en duyarlı aralık 8.000 ve 32.000 Hz'dir. Her ne kadar genç ve yaşlılarda işitme aralığı aynı olsa da 5 haftadan genç ratlar seslere karşı çok daha fazla duyarlıdır. Alçak frekanslı sesleri insandan daha az duyarken yüksek frekanslı sesleri ratlar daha iyi duymaktadır. Yavru ratlar soğuk ve açlık gibi stres durumlarında ultrasonik sesler çıkarırlar. Ergin ratlar kısa ve uzun dalgalı sesler üretir (97). Laboratuvar hayvanlarının işitme aralıkları şekil 2. 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** Laboratuvar Hayvanlarının İşitme Aralıkları (121)



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Doktora Programı tezi olarak yapılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilen çalışma için etik kurul izni alınmıştır (karar tarihi: 17.01.2012; sayı: B. 30.2.GÜN.0.5.06.00/4-983) (Ek 1).

Çalışma modelinin detaylandırılması, farklı yoğunluktaki bilirubin solüsyon dozlarının ve etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla ön çalışma yapılmıştır.

#### 3.1. ÖN ÇALIŞMA

Bilirubin enjeksiyonu ile kandaki bilirubin düzeyinin artıp artmadığını ve ne düzeyde attığını belirlemek amacıyla bir dizi işlemde oluşan ön çalışma yapılmıştır. Ön çalışma için de gerekli izinler alınmıştır. İlk enjeksiyon sonrasında, ilk yarım saat içindeki kan değerleri incelenmiş ve enjeksiyon uygulaması yapılmayan diğer yenidoğan rattaki kan değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Farklı iki yenidoğan rata farklı yoğunluk ve dozlarda bilirubin enjeksiyonu yapılmış ve literatüre paralel olarak olarak 1., 2. ve 3. günlerde TkB ile bilirubin düzeyine ilişkin ölçümler yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Farklı yoğunlukta ve dozlarda enjeksiyon uygulanan iki yenidoğan rat, yaşamlarının 21. gününe kadar izlenmiş TkB cihazı ile son ölçümleri yapılmış ve sonrasında genel anestezi altında intrakardiak kan alımı ile ötenazi uygulanmıştır. Yenidoğan ratların kan- beyin bariyerleri oluşmadan önce bilirubin enjeksiyonlarının yapılması, erişkin oluncaya kadar anne bakımına ihtiyaç duymaları ve yavrunun anneden uzaklaştırılmasında ya da anestezi sırasında mortalite risklerinin artması, yaşamlarının ilk üç haftasında dış kulak kanallarının çok dar olması sebepleriyle erişkin sayıldıkları yaşamlarının 21.gününe kadar beklenmiştir ve total kan

miktarının 1 cc'den az olması nedeniyle ötenazi uygulanmıştır. Ratlardan elde edilen kanlar, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında total serum bilirubin değerleri yönünden incelenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

### **3.2.GRUPLARININ OLUŞTURULMASI**

Deney hayvanlarında aynı koşullarda üretiminin yapılması, beslenme ve bakım koşullarının sabit olması nedeniyle varyasyonlar görülmemektedir. Bu nedenle Deney Hayvanları Etik Kurulu, çalışma gruplarında 6'dan fazla hayvan kullanılmasına izin vermemektedir. Çalışmanın, ölüm oranının yüksek olması vb. fazla riskli durumlara sahip olup olmadığı ve çalışılan hayvanın özelliklerine göre sayı, kurul kararlarına göre arttırılabilmektedir.

Her bir grup için 6 hayvana izin verilen çalışmaya deney, plasebo ve kontrol olmak üzere 3 grup dahil edilmiştir. Tüm ratların kulak muayeneleri KBB hekimi tarafından yapılmıştır. Muayenede ameliyat mikroskobu kullanılmış ve dış kulak yolunda buşon varsa temizlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm ratların dış kulak yolu ve kulak zarını normal görünümde olmasına dikkat edilmiştir.

#### **3.2.1. Deney Grubu**

Deney grubu, ağırlıkları 18-20 gr (ort: 18,33 gr) arasında olan hipebilirubinemi 6 tane yenidoğan Wistar Albino tür erkek rattan oluşmaktadır. Deney grubunda Hiperbilirubinemi Yenidoğan Rat Modeli oluşturulmuştur. Model oluşturulması için Bilirubin solüsyonu hazırlanmıştır.

Bilirubin solüsyonunun hazırlanmasında, Sigma Aldrich B4126 ürün kodlu toz bilirubin kullanılmıştır. Bilirubin, Hansen ve diğ.'nin (98) uygulamasında olduğu gibi %0,1 M NaOH'da çözdürülerek, BSA ile stabilize edilmiştir ve *Krebs- Ringer buffer* ile sulandırılmıştır (pH: 7,4). Bilirubin konsantrasyonu 3 mg/ml olarak belirlenmiştir ve hazırlanan solüsyon, + 4<sup>0</sup>C'de, ışıktan korunacak şekilde muhafaza edilmiştir.

**Hiperbilirubinemili Yenidoğan Rat Modeli:** Hiperbilirubinemili yenidoğan rat modelinin oluşturulmasında Mesner ve ark'nin (99) uygulamaları esas alınmıştır. Yapılan ön çalışma ile de güvenilirliği teyid edilen bilirubin dozu (50 mg/kg bilirubin) intraabdominal olarak postnatal 7. ve 10. günlerde enjekte edilmiştir. İlk enjeksiyon öncesi ve 1., 2. bilirubin enjeksiyonundan 24 saat sonra deri üstünden bilirubin seviyesini belirlemek amacıyla TkB ile ölçümler yapılmıştır. Bilirubin enjeksiyonu yapılan ratlara postnatal 21. günde intramusküler enjeksiyonla anestezi (50 ml/kg ketamin ve 10 ml/kg xylazine) uygulanmış ve elektrofizyolojik işitme testleri yapılmıştır.

Testleri tamamlanan ratlara ötenazi öncesi son TkB ölçümleri yapılarak, derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sırasında intrakardiyak yolla alınan kanlar serum bilirubin düzeyinin belirlenmesi amacıyla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Ötenazi sonrası veteriner hekim ve KBB uzmanı eşliğinde temporal kemik ve beyin-beyinsapı diseksiyonu yapılarak paraformaldehit içinde + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Plasebo Grubu.

Plasebo grubu, ağırlıkları 18-20 gr (ort: 18,83 gr) arasında olan 6 tane yenidoğan Wistar Albino tür erkek rattan oluşmaktadır. Plasebo solüsyonu olarak BSA ile 24 mg/ml *Krebs- Ringer buffer* (pH:7.5) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon, + 4°C'de, ışıktan korunacak şekilde muhafaza edilmiştir. Ratların işitsel sistemine etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla bilirubin olmaksızın hazırlanan solüsyon deney grubuna uygulanan dozla birebir olacak şekilde uygulanmıştır Plasebo solüsyonu, deney grubunda olduğu gibi intraabdominal olarak postnatal 7. ve 10. günlerde enjekte edilmiştir. İlk enjeksiyon öncesi ve 1., 2. bilirubin enjeksiyonundan 24 saat sonra deri üstünden bilirubin seviyesini belirlemek amacıyla TkB ile ölçümler yapılmıştır. Plasebo solüsyonu enjeksiyonu yapılan ratlara postnatal 21. günde intramusküler enjeksiyonla anestezi (50 ml/kg ketamin ve 10 ml/kg xylazine) uygulanmış ve elektrofizyolojik işitme testleri yapılmıştır.

Testleri tamamlanan ratlara ötenazi öncesi son TkB ölçümleri yapılarak, derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sonrası veteriner hekim ve KBB uzmanı eşliğinde temporal kemik ve beyin-beyinsapı diseksiyonu yapılarak paraformaldehit içinde + 4<sup>0</sup>C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3. Kontrol Grubu**

Kontrol grubu, ağırlıkları 18-20 gr (ort: 19 gr) arasında olan 6 tane yenidoğan Wistar Albino tür erkek ratlardan oluşmaktadır. Kontrol grubundaki ratlara deney ve plasebo grubunun aksine herhangi bir enjeksiyon yapılmamıştır. Ancak bilirubin düzeylerini belirlemek amacıyla deney ve kontrol grubunda belirlenen zaman dilimleriyle eş güdümlü ölçümler yapılmıştır. Kontrol grubundaki ratlara postnatal 21. günde intramusküler enjeksiyonla anestezi (50 ml/kg ketamin ve 10 ml/kg xylazine) uygulanmış ve elektrofizyolojik işitme testleri yapılmıştır.

Testleri tamamlanan ratlara ötenazi öncesi son TkB ölçümleri yapılarak, derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sonrası veteriner hekim ve KBB uzmanı eşliğinde temporal kemik ve beyin-beyinsapı diseksiyonu yapılarak paraformaldehit içinde + 4<sup>0</sup>C’de muhafaza edilmiştir.

## **3.3. ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER**

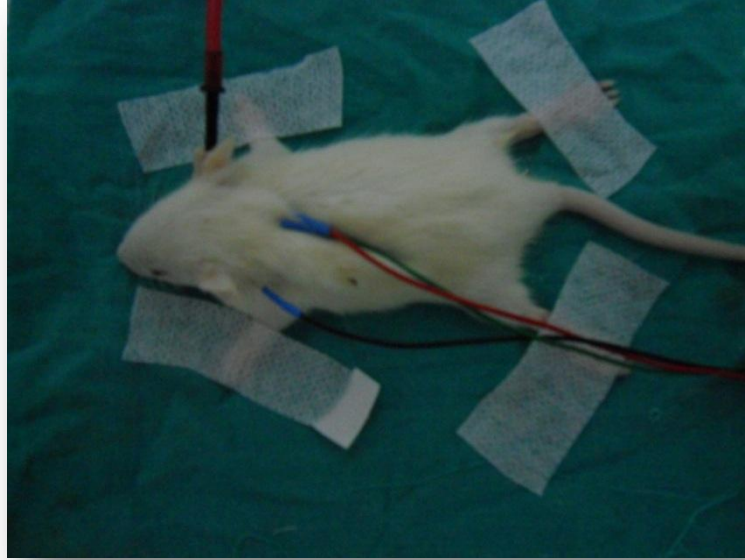
Testler İBC, OAE ve kontralateral supresyon ile OAE ölçümlerini kapsamaktadır.

### **3.3.1. İşitsel Beyinsapı Cevabı (İBC) Testi**

Çalışmaya alınan ratların İBC ölçümleri Bio-Logic Systems Corp. Marka Navigator Pro Model (2.2.0 versiyonu) cihaz ile gerçekleştirilmiştir. İBC ölçümlerine başlamadan önce, ratlara anestezi uygulanmış, paslanmaz çelikten 20x0,30 mm’lik iğne elektrotlar kullanılmış, toprak elektrot sol mastoid bölgesi cilt altına, referans elektrot sağ mastoid bölgesi cilt altına ve aktif elektrot vertekste cilt altına yerleştirilmiştir. Elektrotlar birbirine değdirildiğinde elektrot impedansının “0”

Kohm, ratlara yerleştirildikten sonra ise impedansın 5 Kohm' un altında olmasına dikkat edilmiştir. Bebeklerde kullanılan sünger uçlar yenidoğan ratın dış kulak kanalının dar olması nedeniyle küçültülerek insert kulaklıklar aracılığı ile ratların kulağına yerleştirilmiştir.

İBC ölçümünde 13.00 *rate* klik uyararı, 10 msn analiz zamanı, averajlamada 1000 *sweep*, 100-1500 Hz filtreleme kullanılmıştır. 70 dB nHL şiddet seviyesinde kayda başlanmış alınan yanıtlara göre şiddette değişiklik yapılmıştır. KM varlığını belirlemek amacıyla *condensation* (+), *rarefaction* (-) polarite değişikliği aynı şiddette her iki kulak için de uygulanmıştır. Eşik taraması için klik uyararıda önerildiği üzere *rarefaction* polarite ile devam edilmiştir.



**Resim 3.1.** Ratta İBC Ölçümü

### 3.3.2. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) Testi

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyonların ölçümünde Otodynamics® Ltd. ILOv6 cihazı kullanılmıştır. Tüm ölçümler ratların kafası yere yatay pozisyonda iken yapılmıştır. Yenidoğan probu kullanılarak yapılan ölçümlerde ratların dış kulak kanallarının dar olması sebebiyle probun yerleştirilmesinde plastik adaptör kullanılmıştır. Prob yerleşimi ve uyararı uygunluğuna ilişkin göstergenin kontrolü sonrasında ölçüme başlanmıştır.

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon ölçümleri ( $2f_1$ - $f_2$  kübik distorsiyon ürünü bileşenleri) *General Diagnostic* modunda yapılmıştır. DPOAE'ler dış kulak kanalındaki mikrofon ile  $2f_1$ - $f_2$  frekansında ölçülmüş ve  $f_1$  ve  $f_2$ 'nin geometrik ortalamalarında 1001, 1501, 2002, 3003, 4004, 6006 ve 7996 frekanslarında kaydedilmiştir. DPOAE amplitüdlerinin gürültü eşiğinin 3 dB üstündeki değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Ölçümde  $f_2$  ve  $f_1$  frekansları arasındaki oran ( $f_2/f_1$ ) 1.22 olarak uygulanmıştır. Uyarın şiddeti  $f_1$  frekansı için L1, ve  $f_2$  frekansı için L2 olarak alınmış ve L1-L2 10 dB SPL (L1=65, L2=55) düzeyinde ölçümler tamamlanmıştır.

Sonuçlar birincil tonların ( $f_1$  ve  $f_2$ ) geometrik ortalamasında gösterilmiştir. DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen  $2f_1$ - $f_2$  kübik distorsiyon ürünleri  $f_1$  ve  $f_2$ 'nin geometrik ortalamasında yani 1001, 1501, 2002, 3003, 4004, 6006 ve 7996 Hz frekans bantlarında oluşan sinyalin gürültüye oranı (SGO) esas alınmıştır.



**Resim 3.2.** Ratta OAE Ölçümü

### 3.3.3. Kontralateral Supresyonun Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) ile Kaydı

Kontralateral supresyonun DPOAE testi ile ölçümü için DPOAE test parametreleri kullanılmıştır. Dış kulak kanalındaki mikrofon ile 2f1-f2 frekansında ölçülmüş, f1 ve f2'nin geometrik ortalamalarında 1001, 1501, 2002, 3003, 4004, 6006 ve 7996 frekanslarında kaydedilmiştir. DPOAE amplitüdlerinin gürültü eşliğinin 3 dB üstündeki değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Ölçümde f2 ve f1 frekansları arasındaki oran ( $f2/f1$ ) 1.22 olarak uygulanmıştır. Uyarın şiddeti f1 frekansı için L1, ve f2 frekansı için L2 olarak alınmış ve L1-L2 10 dB SPL (L1=65, L2=55) düzeyinde ölçümler tamamlanmıştır.

Sonuçlar birincil tonların (f1 ve f2) geometrik ortalamasında gösterilmiştir. DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen 2f1-f2 kübik distorsiyon ürünleri f1 ve f2'nin geometrik ortalamasında yani 1001, 1501, 2002, 3003, 4004, 6006 ve 7996 Hz frekans bantlarında oluşan sinyalin gürültüye oranı (SGO) esas alınmıştır.

Bilateral olarak yapılan ölçümlerde bir kulağa DPOAE uyarını verilirken, kontralateral kulağa ise linear stimulus modunda 60 dB şiddetinde beyaz gürültü verilmiş ve DPOAE yanıtları ile kontralateral supresyon yanıtları karşılaştırılmıştır. Supresyon yanıtları, gürültü verilmeden önceki DPOAE yanıtlarından çıkarılarak SGO supresyon amplitüdü hesaplanmıştır. Supresyon amplitüdüleri, pozitif olanlar 'supresyon var' negatif olanlar 'supresyon yok' şeklinde sınıflandırılmıştır.

Supresyon varlığı için en az 3 frekansta  $\geq 3$  dB SGO amplitüdünün gürültü öncesindeki SGO amplitüdüne göre düşmesi kabul edilmiştir.

### 3.4. TRANSKUTAN BİLİRUBİNOMETRİ (TKB) ÖLÇÜMÜ

Transkutan bilirubinometri (TKB) Minolta/ Air- Shields Jaundice Meter (JM, mode 101, Minolte Corero Co, Osaka, Japan) ile yapılmıştır. TKB ölçümü ratların sırt bölgesinden yapılmıştır. Ölçüm öncesi cihazın teknik bakımı ve

kalibrasyonu yapılmıştır. Ölçümler sırasında probun uyguladığı basınç nedeniyle ratların zarar görmesini engellemek amacıyla akrilik bir plak yapılmıştır.



**Resim 3.3.** Ratta Tkb Ölçümü

### **3.5. SERUM TOTAL BİLİRUBİN (STB) ÖLÇÜMÜ**

Serum total bilirubin düzeyleri otoanalizör (Roche / Integra-800) sistemlerde hazır kitler (Roche) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu kitin total bilirubin ölçüm prensibi, bilirubin ve diazotize sülfonilik asit reaksiyonu sonucu oluşan azobilirubin miktarının ölçümüne dayalı Diazo yöntemidir (100).

### **3.6. MORFOMETRİK DEĞERLENDİRME**

Temporal kemiklerin yumuşatılarak kesitlerinin alınması amacıyla dokular Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Bölümü'ne gönderilmiştir. Bu



amaçla tri-natriumsitrat 2 hidrat kullanılmış ve kontrol grubundaki bir rattada ön çalışması için çıkarılan temporal kemik ile beyin sapı dokusu parafine gömülmüş ve 3-5 mikro metre kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler hemotoksilen ile boyanıp, koklear bölgeden geçip geçmediği mikroskopi altında değerlendirilmiştir. Bu şekilde örnek hazırlamanın uygunluğu belirlendikten sonra işlem gruplara uygulanmıştır. Beyin saplarının da kesitleri alınarak hemotoksilen ile boyanmıştır. Beyin dokuları çalışmada incelenmemiştir. Boyanan kesitlere, Hacettepe Üniversitesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarında ışık mikroskopisi ile bakılmış ve DTH, İTH, KN yapıları değerlendirilmiştir. DTH ve İTH tabakasının genel morfolojik özelliği, bu bölgede yer alan hücrelerin yapısında meydana gelen değişiklikler (nekrotik veya apoptotik hücre hasarlanması lehine bulgular) incelenmiştir. Nekrotik hücre değişikliği hücrelerin şişmesi ve yırtılması, apoptotik değişiklikler ise hücrenin özellikle sitoplazmasında büzülme, çekirdekte kondansasyon ve tomurcuklanma olarak kabul edilmiştir. Kesitlerin değerlendirilmesi Nikon marka Eclipse 600 model ışık mikroskobuyla x10, x20, x40 büyütme kullanılarak yapılmıştır.

### **3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

İstatistiksel analizler SPSS for Windows Version 16.0 paket programında yapılmıştır. Sayısal değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma ile kategorik değişkenler ise sayı ile özetlenmiştir. Gruplarda bilirubin düzeyini belirlemek için kullanılan TKB sonuçları, TSBD, işitme değerlendirmesi için yapılan İBC, OAE, KLS bulguları ve ışık mikroskobisi ile değerlendirilen DTH, İTH, KN sonuçları gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında farklılık için Kruskal-Wallis Varyans analizi uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak alınmıştır. Gruplardaki değişkenler arasındaki ilişkiler için korelasyon katsayısı ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

Çalışmayı oluşturan deney, plasebo ve kontrol gruplarından elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

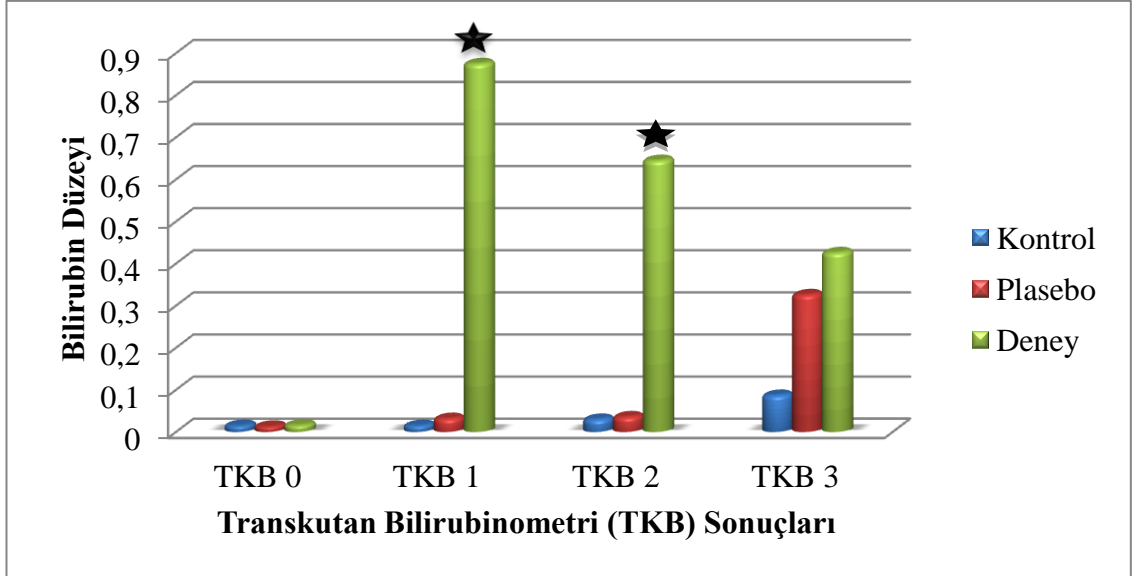
### 4.1. TRANSKUTAN BİLİRUBİNOMETRİ VE SERUM TOTAL BİLİRUBİN DÜZEYLERİ

Gruplardaki ratların yaşamlarının 7.ve 10.günlerinde enjeksiyon öncesi doz ayarlaması için saptanan ağırlıklarının ortalamaları Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.1.** Gruplardaki ratların enjeksiyon öncesi ölçülen kiloları

	N	7 günlük ortalama ağırlığı (gr)	SS	10 günlük ortalama ağırlığı (gr)	SS
<b>Deney Grubu</b>	<b>6</b>	<b>18,33</b>	<b>0,98</b>	<b>19,16</b>	<b>0,75</b>
<b>Plasebo Grubu</b>	<b>6</b>	<b>19</b>	<b>0,89</b>	<b>18,83</b>	<b>0,75</b>
<b>Kontrol Grubu</b>	<b>6</b>	<b>18,83</b>	<b>0,98</b>	<b>19</b>	<b>0,89</b>

Gruplar bilirubin enjeksiyonu öncesi TkB sonuçları yönünden karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ( $p>0,05$ ), 1. ve 2. bilirubin enjeksiyonundan 24 saat sonra yapılan TkB sonuçlarında deney grubundaki ratlarda plasebo ve kontrol grubundaki ratlara göre istatistiki olarak daha yüksek bilirubin düzeyi elde edilmiştir ( $p<0,05$ ). Deney, plasebo ve kontrol grupları arasında TkB sakrifikasyon öncesi değerlerde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ) (Grafik 4.1).

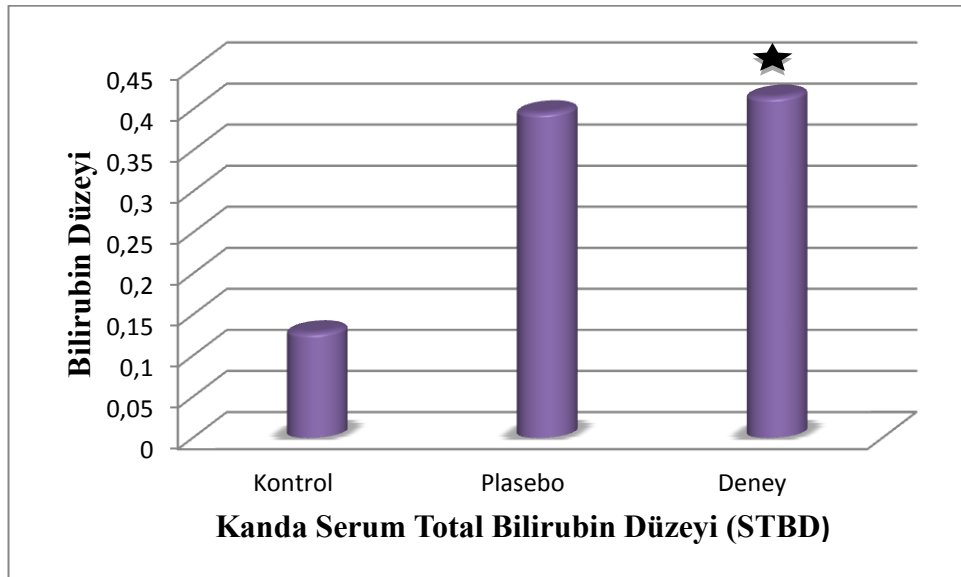


**Grafik 4.1** Gruplararası transkutan bilirubinometri sonuçları (mg/dL)

\*TKB 0; Bilirubin Enjeksiyonu Öncesi, \*TKB 1; Bilirubin Enjeksiyonu Sonrası 1. Ölçüm,

\*TKB 2; Bilirubin Enjeksiyonu Sonrası 2. Ölçüm, \*TKB 3; Sakrifikasyon Öncesi Ölçüm (mg/dL)

Kandaki STBD gruplararası karşılaştırıldığında deney grubunda plasebo ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p < 0,05$ ) (Grafik 4.2).



**Grafik 4.2.** Grupların serum total bilirubin düzeyi (STBD) (mg/dL)

Gruplardan elde edilen Tkb ve kandaki STBD ilişkin ortalama ve standart sapma verileri Tablo 4.2’ de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** Gruplararası Transkutan Bilirubinometri ve Kandaki Serum Total Bilirubin Düzeyi Değerleri

	Kontrol		Placebo		Deney		P
	Ortalama	ss	Ortalama	ss	Ortalama	Ss	
TkB 0	0.015	0.008	0.013	0.01	0.016	0.008	1
TkB 1	0.015	0.008	0.032	0.01	0.875	0.083	0.0*
TkB 2	0.030	0.009	0.036	0.01	0.645	0.127	0.01*
TkB 3	0.087	0.044	0.326	0.07	0.426	0.164	0.12
STBD	0.128	0.059	0.396	0.07	0.415	0.236	0.03*

\*Tkb 0; Bilirubin Enjeksiyonu Öncesi, \*Tkb 1; Bilirubin Enjeksiyonu Sonrası 1. Ölçüm,  
 \*Tkb 2; Bilirubin Enjeksiyonu Sonrası 2. Ölçüm, \*Tkb 3; Sakrifikasyon Öncesi Ölçüm  
 \* STBD; Serum Total Bilirubin Düzeyi (mg/dL)

Deney, plasebo, kontrol gruplarındaki sakrifasyon öncesi Tkb ile STBD değerleri arasında pozitif yönde, kuvvetli, istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Gruplardaki korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılık Tablo 4.3’te belirtilmiştir.

**Tablo 4.3.** Gruplardaki Sakrifikasyon Öncesi Tkb ile Kandaki STBD Değerlerinde Korelasyon Katsayısı ve İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

	R	P
Kontrol	0.986	0.00*
Placebo	0.812	0.05*
Deney	0.955	0.03*

## 4.2. ELEKTROFİZYOLOJİK BULGULAR

### 4.2.1. İşitsel Beyinsapı Cevapları (İBC)

#### 4.2.1.1. Eşik Bulguları

Gruplar arasında İBC 'nın karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Her bir grupta bir rattan bilateral İBC elde edilememiştir. Bu nedenle söz konusu ratlar istatistiksel analizde 'missing case' olarak değerlendirilmiş ve İBC verileri analize dahil edilmemiştir.

Analiz sonuçlarına göre sağ kulak İBC eşik ortalaması gruplar arasında anlamlı farklılık göstermezken ( $p > 0,05$ ) sol İBC eşiği gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p < 0,05$ ). Bu farklılık deney grubundaki ratların sol kulak eşik şiddetlerinin diğer iki gruba göre daha yüksek olmasından kaynaklanmıştır.(Tablo 4.4)

**Tablo 4.4.** İşitsel Beyinsapı Cevapları (İBC) Sağ ve Sol Kulak Eşikleri Ortalamaları (dB nHL)

	Grup	Ortalama	SS
Sağ Kulak İBC Eşik	Kontrol	12.00	4.47
	Placebo	10.00	12.25
	Deney	26.00	11.40
Sol Kulak İBC Eşik	Kontrol	12.00	8.37
	Placebo	8.00	8.37
	Deney	32.00	14.83

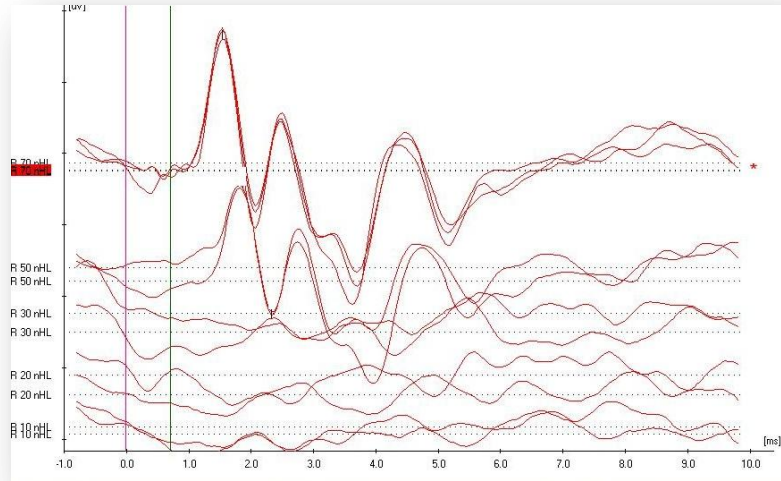
Çalışma gruplarındaki STBD değerleri ve İBC eşikleri arasındaki ilişkinin testi için değişkenler arasında Sperman's rho katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, İBC sol ve sağ eşik değerinin STBD değeri ile gruplara göre anlamlı düzeyde bir ilişkisi bulunmamaktadır (Tablo 4.5).

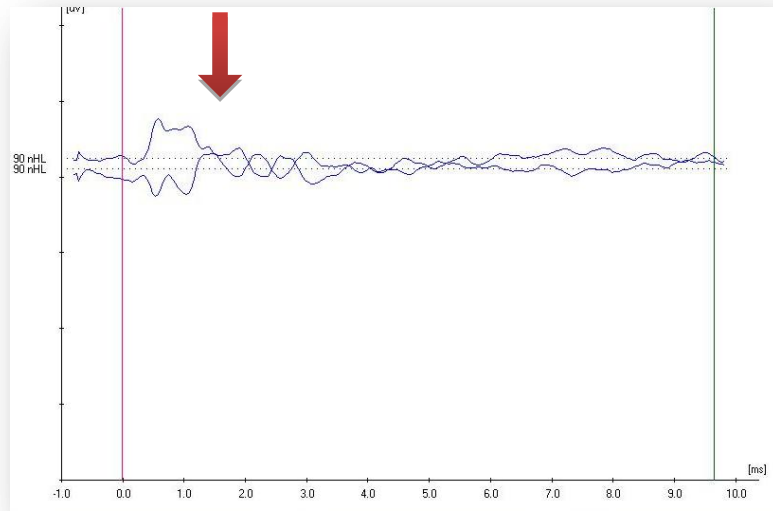
**Tablo 4.5.** Gruplardaki Sağ ve Sol Kulak İBC Eşikleri ile STBD Arasındaki İlişki

		Kontrol		Plasebo		Deney	
Spearman's rho		İBC Sağ	İBC Sol	İBC Sağ	İBC Sol	İBC Sol	İBC Sağ
R	<b>STBD</b>	-0.18	-0.54	0.53	-0.16	0.06	-0.23
P		0.77	0.35	0.36	0.80	0.93	0.71

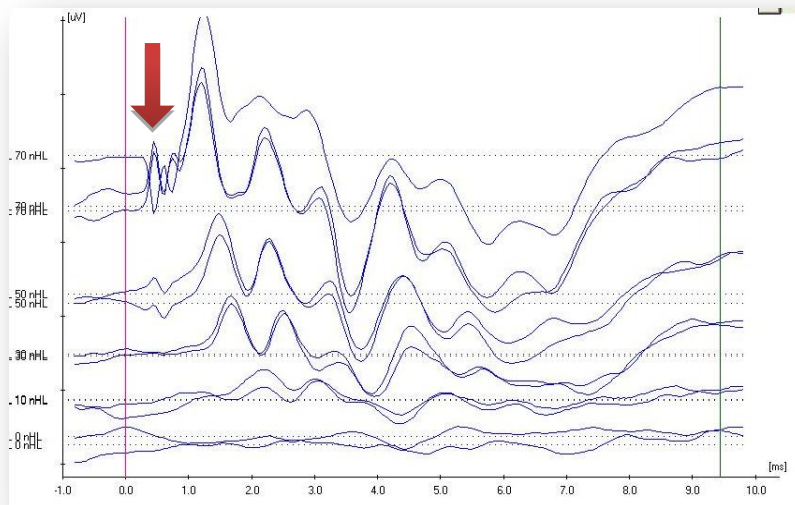
#### 4.2.1.2. Koklear Mikrofonik (KM) Varlığı ve Dalga Morfolojisine İlişkin Bulgular

Gruplardan elde edilen İBC örüntüsünde KM varlığı değerlendirilirken dört farklı özellik dikkati çekmiştir. KM bulguları, gözlenen bu özellikler temel alınarak kategorilendirilmiştir. Kategori 1’de normal İBC örüntüsü ile birlikte KM elde edilmezken, kategori 2’de II.dalga olmaksızın KM gözlenmiştir. Bunun yanı sıra KM örüntüsü ile birlikte II.dalga da elde edilen kategori 3, KM örüntüsü ile birlikte II. dalga da dahil olmak üzere bozuk dalga morfolojisi kategori 4 olarak değerlendirilmiştir.

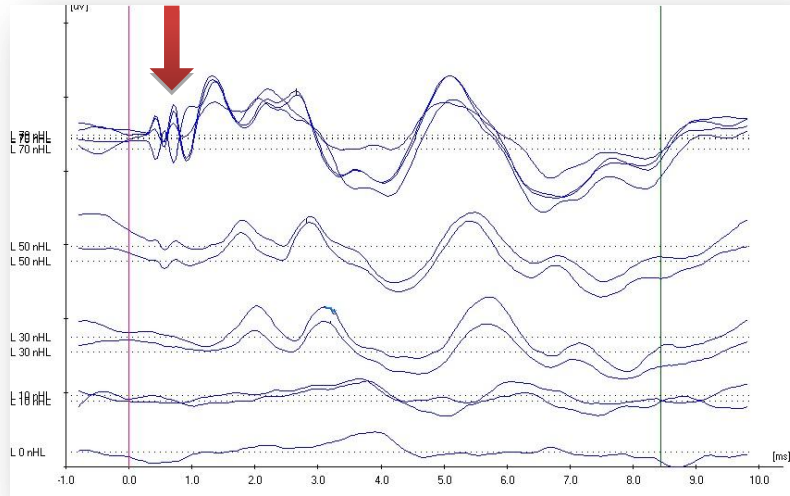
**Resim 4.1.** Kategori 1 Örneği



**Resim 4.2.** Kategori 2 Örneği



**Resim 4.3.** Kategori 3 Örneği



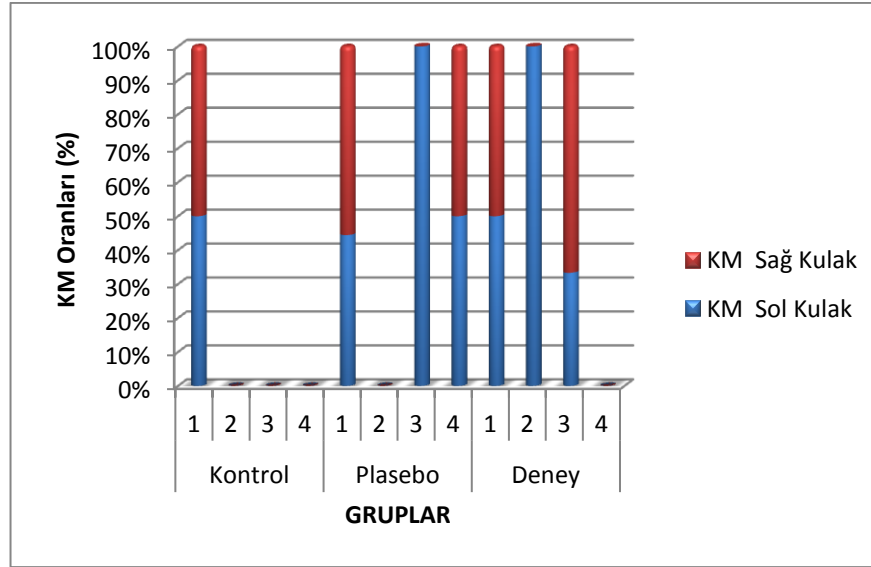
**Resim4.4.** Kategori 4 Örneği

Koklear Mikrofonik bulguları ve dalga morfolojisine ilişkin olarak elde edilen kategorilerin gruplara göre sağ ve sol kulakta görülme oranları Tablo 4.6 ve grafik 4.3'te gösterilmiştir

**Tablo 4.6.** Koklear Mikrofonik Kategorilerinin Gruplara Göre Görülme Oranları (%)

KM Kategori	Deney Grubu		Plasebo Grubu		Kontrol Grubu	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1	%33,33	%33,33	%33,33	%41,66	%50	%50
2	%0	%8,3	%0	%0	%0	%0
3	%16,66	%8,3	%8,3	%0	%0	%0
4	%0	%0	%8,3	%8,3	%0	%0





**Grafik 4.3.** Koklear Mikrofonik ve Benzeri Örüntü Formu Oranları

#### 4.2.2. Otoakustik Emisyon (OAE) ve Kontralateral Supresyon (KLS) Bulguları

Gruplarda OAE bulguları değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki bir rat dışındaki tüm ratlarda cevap elde edilirken deney ve plasebo gruplarında OAE cevabı olmadığı görülmüştür. Deney ve plasebo grubunda OAE yanıtı alınmadığından KLS yapılmamıştır. OAE yanıtı alınmayan 1 rat dışında kontrol grubundaki diğer tüm ratların sağ ve sol kulaklarına KLS değerlendirmesi yapılmıştır. Kontrol grubunda KLS yapılan ratların sağ ve sol kulaklarının supresyon yanıtının varlığı saptanmıştır.

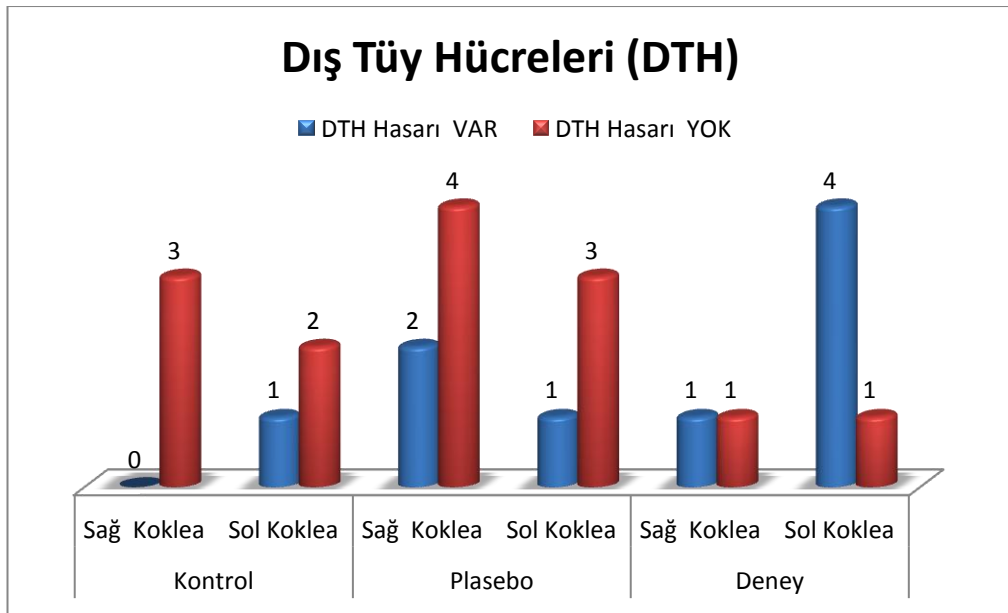
İBC ile OAE cevaplarının gruplar arasındaki farkını değerlendirmek amacıyla iki yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Gruplar arasında sağ ve sol kulak OAE cevaplarının İBC'na göre anlamlı farklılık gösterip göstermediği test edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3. MORFOLOJİK BULGULAR

Gruplardan alınan kesitlerin morfolojik değerlendirilmesinde koklea kesitlerindeki fiksasyon sorunu nedeniyle kontrol grubunda her iki kulakta da 3 ratta

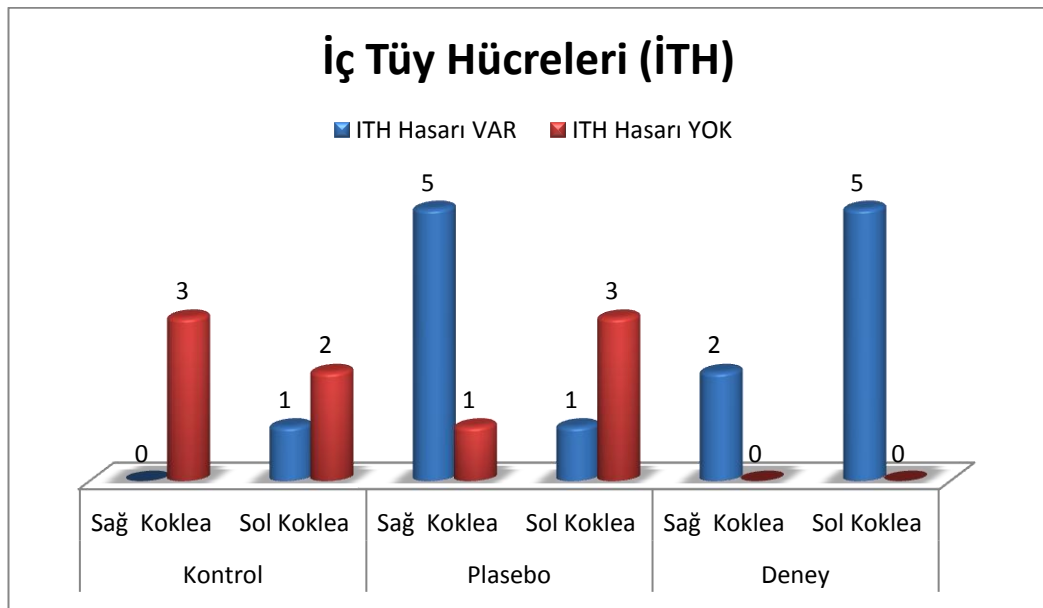
(%50) DTH ve İTH incelenmesi yapılamamıştır. Değerlendirmeler bu ratlar dışındaki veriler dikkate alınarak yapılmıştır. Kontrol grubundaki ratların tümünde KN incelemeye alınmıştır. Plasebo grubundaki ratlardan 3'ünde (%16,66) sol koklea ve beyin sapı kesitlerindeki fiksasyon sorunu nedeniyle DTH, İTH ve KN değerlendirilememiştir. Deney grubunda ise ratlardan 4'ünde (%33,33) sağ, 1'inde sol (%8,3), 2'sinde (%33,33) ise koklea ve beyinsapı kesitlerindeki fiksasyon sorunu nedeniyle DHT, İTH ve KN değerlendirilememiştir.

Gruplardaki fiksasyon sorunu olmayan sağ ve sol kokleasındaki DTH'de şekil anormallikleri ya da bozulmaları olan ve olmayan ratların sayıları grafik 4.4'te gösterilmiştir. Hüresel değişikliklerin hepsi, hücrelerde değişik şekillerde apoptoz varlığı ile karakterize idi. Bazı kesitlerde hücre sayısında da azalma dikkat çekmiştir. Kontrol grubunda İBC elde edilemeyen 1 ratta sol kokleadaki DTH yapıları değerlendirilebilmiştir ve hüresel anormallikler saptanmıştır. Plasebo grubunda ise sağ ve sol kokleadaki DTH değerlendirmesinde sağda %16,66, solda ise %8,33 oranında hüresel bozulmalar saptanmıştır. Deney grubunda sağ ve sol kokleadaki DTH'nin şekil bozuklukları sağda %8,33, solda ise %33,33 olduğu belirlenmiştir.



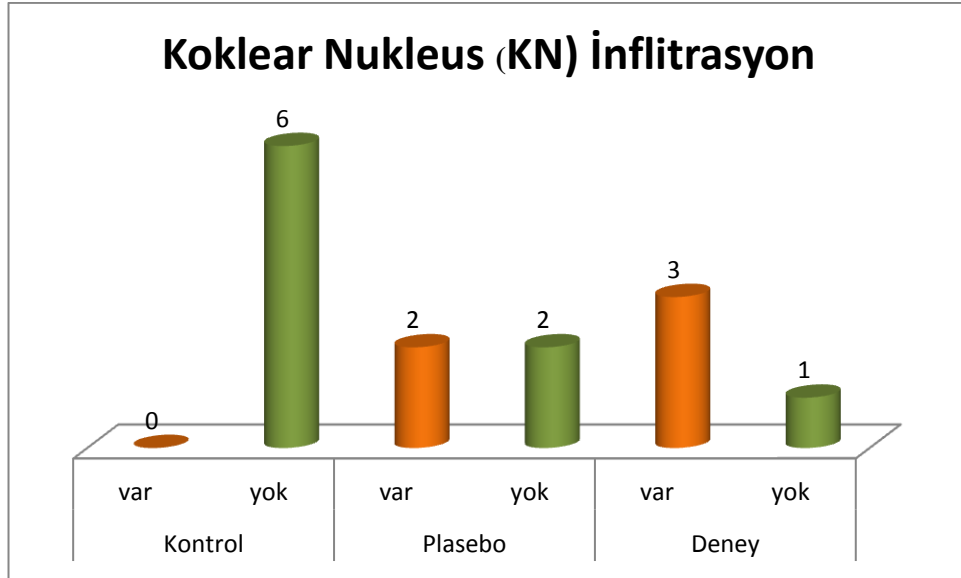
**Grafik 4.4.** Gruplardaki Ratların Sağ ve Sol Kokleadaki DTH Morfometrik Bulguları

Gruplara göre sağ ve sol koklea kesitinde İTH anormalliği veya bozulmalarına ilişkin bulgular grafik 4.5'te gsterilmiştir. Kontrol grubunda İBC elde edilemeyen 1 ratta sol koklea kesitindeki İTH değerlendirilebilmiştir ve hücresel anormallikler saptanmıştır. Plasebo grubunda ise sağ ve sol koklea kesitindeki İTH yapılarının değerlendirmesinde sağda %41,66, solda ise %8,3 oranında hücresel bozulmalar saptanmıştır. Deney grubunda sağ ve sol kokleada kesitindeki İTH yapılarında şekil bozuklukları sağda %16,66, solda ise %41,66 olduğu belirlenmiştir.



**Grafik 4.5.** Gruplardaki Ratların Sağ ve Sol Kokleadaki İTH Morfometrik Bulguları

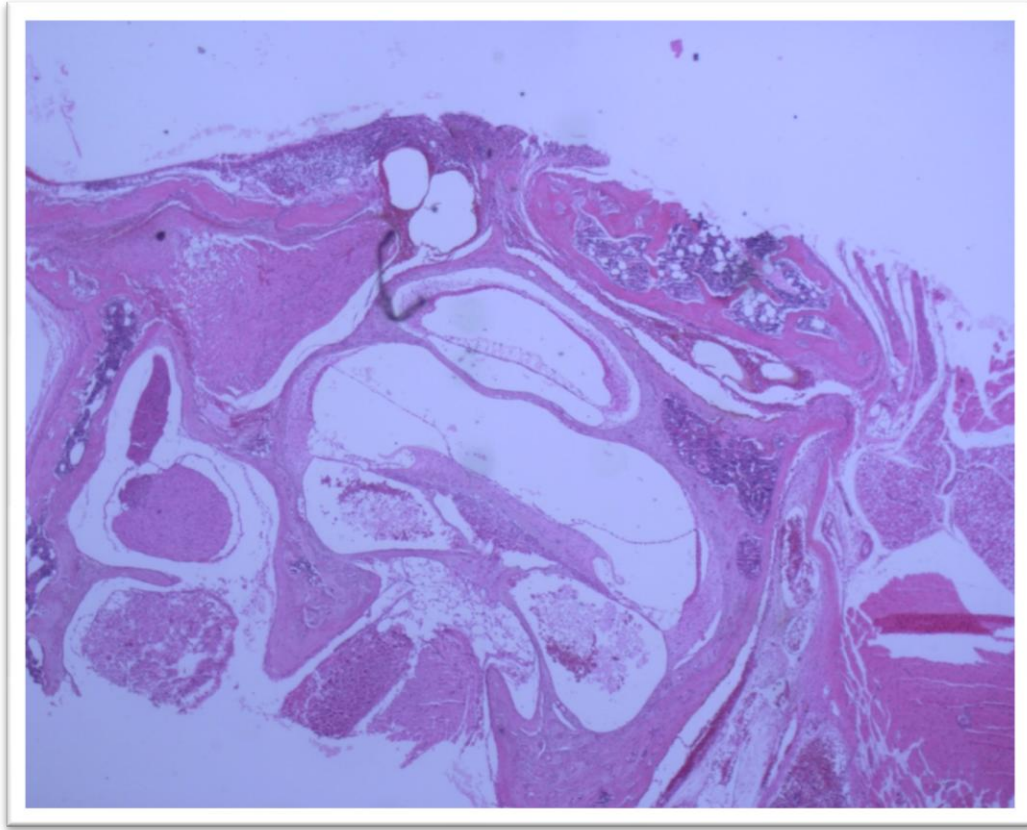
Beyin sapı kesitleri incelendiğinde, özellikle 8. Sinirin beyin sapına girdiği bölgede inflamatuvar hücre infiltrasyonu deney gruplarında dikkat çekmiştir. Hücreler mononükleer tipte gözlenmiştir. Gruplardaki fiksasyon sorunu olmayan beyinsapı kesitlerinde KN'larda infiltrasyon olan ve olmayan ratların sayıları grafik 4.6'da gsterilmiştir. Kontrol grubundaki ratlarda KN infiltrasyonu saptanmazken, plasebo grubunda %33,33, deney grubunda ise %50 oranında KN infiltrasyonu gözlenmiştir.



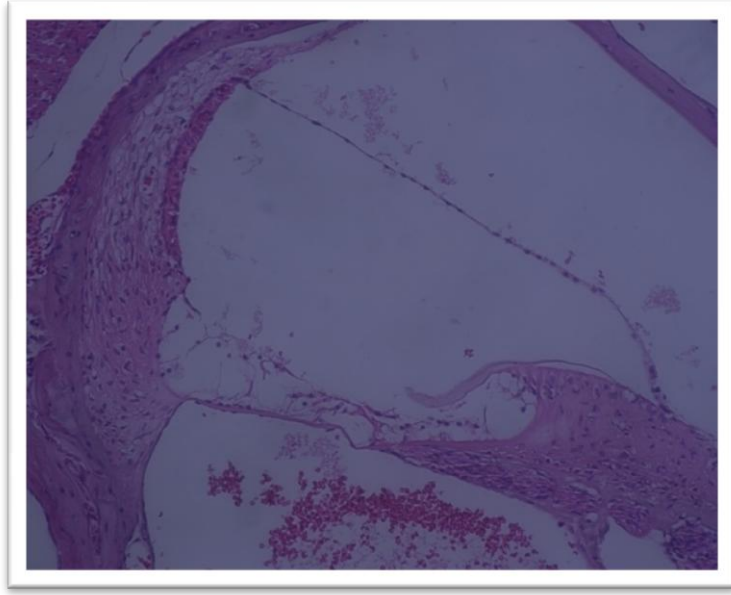
**Grafik 4.6.** Gruplardaki Ratların KN Morfometrik Bulguları

Gruplar arasında STBD ile morfometrik bulgular arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla iki yönlü varyans analizi uygulanmıştır.. Gruplarda her iki kulakta da ortalama STBD değerleri ile DTH ve İTH yapıları ile KN infiltrasyonu yönünden istatistiki yönden anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

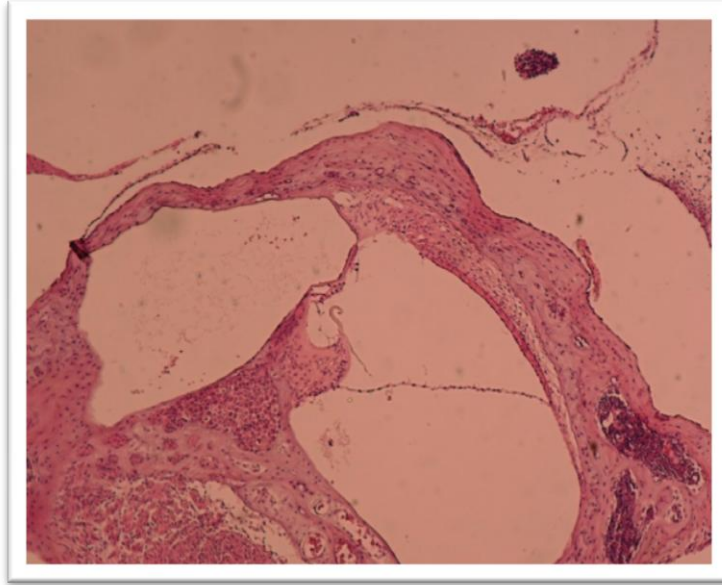
Işık mikroskopisiyle değerlendirilen koklea, DTH ve İTH kesitlerine ilişkin görüntüler resim 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8’de gösterilmektedir. Resim 4.5 ve resim 4.6 de sırasıyla normal koklea görüntüsü ve normal DTH ile İTH görüntüsü (kontrol grubu) verilirken, resim 4.7 ve resim 4.8’ de bozuk koklea görüntüsü ve bozuk DTH ile İTH görüntüsü (deney grubu) verilmiştir.



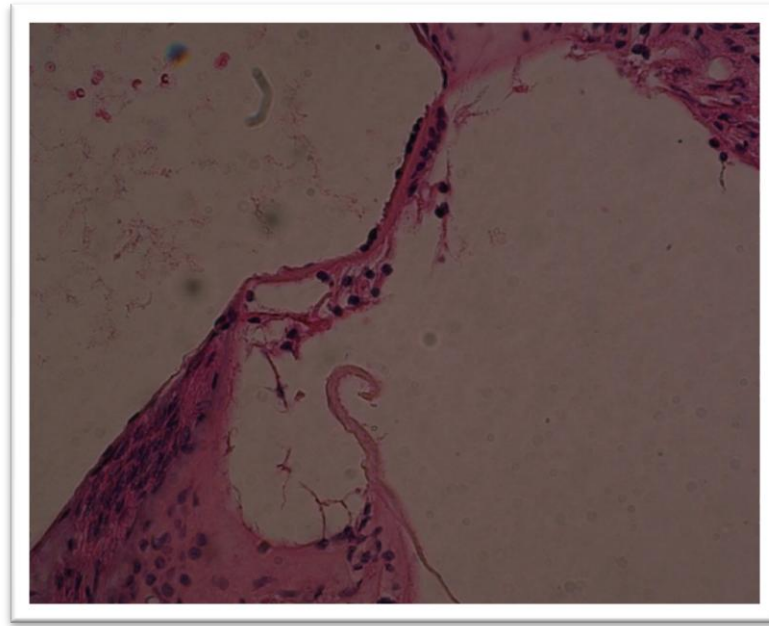
**Resim 4.5.** Kontrol grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle normal koklea görüntüsü (x10 büyütme)



**Resim 4.6.** Kontrol grubundaki ratta ışık mikroskopisiyle normal DTH,ITH görüntüsü (x10 büyütme)



**Resim 4.7.** Deney grubundaki ratta ışık mikroskopisiyle koklea görüntüsü (x10 büyütmede)



**Resim 4.8.** Deney grubundaki ratta ışık mikroskobisiyle DTH,ITH görüntüsü (x40 büyütme)

Gruplardaki ratların sağ ve sol kulağa göre DTH morfometrik bulguları ile OAE cevap varlığı oranları tablo 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12’ de gösterilmiştir. Tablolardaki bulgular koklea kesitlerinde fiksasyon sorunu olmayan kulakların değerlendirmeleridir.

**Tablo 4.7.** Kontrol Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları

			<b>DTH sağ</b>	<b>Toplam</b>
			<b>Hasar YOK</b>	
<b>OAE</b>	<b>Cevabı</b>	n	3	3
	<b>Sağ VAR</b>	%	100.0%	100.0%
<b>Toplam</b>		n	3	3
		%	100.0%	100.0%

**Tablo 4.8.** Plasebo Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları

		DTH Sağ Kulak Hasar		Toplam
		YOK	VAR	
OAE Cevabı Sağ YOK	n	4	2	6
	%	66.7%	33.3%	100.0%
Toplam	n	4	2	6
	%	66.7%	33.3%	100.0%

**Tablo 4.9.** Deney Grubundaki Ratların Sağ Kulak OAE ve DTH bulguları

		DTH Sağ Kulak Hasar		Toplam
		YOK	VAR	
OAE Cevabı YOK	n	1	1	2
	%	50.0%	50.0%	100.0%
Toplam	n	1	1	2
	%	50.0%	50.0%	100.0%

**Tablo 4.10.** Kontrol Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları

			DTH Sol Kulak Hasar		Toplam
			YOK	VAR	
OAE Cevabı	YOK	n	0	1	1
		%	0.0%	33.3%	33.3%
	VAR	n	2	0	2
		%	66.7%	0.0%	66.7%
Toplam	n	2	1	3	
	%	66.7%	33.3%	100.0%	

**Tablo 4.11.** Plasebo Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları

		DTH Sol Kulak Hasar		Toplam
		YOK	VAR	
OAE Cevabı YOK	n	3	1	4
	%	75.0%	25.0%	100.0%
Toplam	n	3	1	4
	%	75.0%	25.0%	100.0%



**Tablo 4.12.**Deney Grubundaki Ratların Sol Kulak OAE ve DTH bulguları

		DTH Sol Kulak Hasar		Toplam
		YOK	VAR	
OAE Cevabı	n	1	4	5
YOK	%	20.0%	80.0%	100.0%
Toplam	n	1	4	5
	%	20.0%	80.0%	100.0%

Çalışmadaki deney, plasebo ve kontrol grubunda elde edilen tüm elektrofizyolojik ve morfometrik bulgular Tablo 4.13, 4.14 ve 4.15 gösterilmiştir. Deney grunda 1 ratta bilateral İBC elde edilmemekle birlikte sol kulağında KM saptanmıştır. Unilateral İNSB (%8,33) düşünülen ratın hem sağ hem de sol kulağında DTH, İTH anormallikleri saptanmıştır. Aynı rattın KN'sinde infiltrasyon da gözlenmiştir.

İBC eşiği 20 dBnHL'in üzerinde olan değerler SNİK olarak kabul edilmiştir. Kontrol ve plasebo grubundaki birer ratta bilateral SNİK saptanmıştır. Deney grubunda ise 4 ratta bilateral (%66,67), 2 ratta ise unilateral (%16,67) SNİK bulunmuştur. SNİK düşünülen tüm ratların DTH, İTH yapılarında bozulma ve KN infiltrasyonu saptanmıştır. Plasebo ve kontrol grubundaki ratlarda 1'er rat hariç 20 dBnHL üzerinde İBC eşiği saptanmamıştır. Plasebo grubundaki 1 ratta bilateral İBC elde edilmemiştir (%16,67). Kontrol grubunda İBC elde edilemeyen 1 ratın konjenital işitme kaybı olduğu kabul edilmiştir (%16,67). Kontrol Grubundaki konjenital işitme kaybı olan ratın sağ kokleasında morfolojik değerlendirme yapılamamıştır. Sol kokleasındaki DTH, İTH bozulmalar saptanmış, KN'da infiltrasyon gözlenmemiştir.

**Tablo 4.13.** Deney Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları

DENEY GRUBU	KM sağ	KM sol	İBC Eşik Sağ	İBC Eşik Sol	OAE Sağ	OAE Sol	KLS Sağ	KLS Sol	DTH sağ	DT H sol	İTH sağ	İTH sol	KN İnfilt
RAT 1	1	1	30	40	Ø	Ø	T.Y	T.Y	*	+	*	+	*
RAT 2	1	1	30	30	Ø	Ø	T.Y	T.Y	*	+	*	+	*
RAT 3	3	3	10	10	Ø	Ø	T.Y	T.Y	-	-	+	+	+
RAT 4	1	2	Ø	Ø	Ø	Ø	T.Y	T.Y	+	+	+	+	+
RAT 5	3	1	20	30	Ø	Ø	T.Y	T.Y	*	*	*	*	+
RAT 6	1	1	40	50	Ø	Ø	T.Y	T.Y	*	+	*	+	-

(\*); Fiksasyon problemi nedeniyle ışık mikroskopisiyle incelenemeyen, (+); deformasyon mevcut, (-); deformasyon yok, Ø; cevap yok, √; Cevap var, T.Y; Test Yapılmadı

**Tablo 4.14.** Pasebo Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları

PLASEBO GRUBU	KM sağ	KM sol	İBC Eşik Sağ	İBC Eşik Sol	OAE Sağ	OAE Sol	KLS Sağ	KLS Sol	DTH sağ	DT H sol	İTH sağ	İTH sol	KN İnfil
RAT 1	1	3	20	0	Ø	Ø	T.Y	T.Y	+	-	+	-	*
RAT 2	1	1	Ø	Ø	Ø	Ø	T.Y	T.Y	+	+	+	-	+
RAT 3	1	4	20	20	Ø	Ø	T.Y	T.Y	-	*	+	*	+
RAT 4	4	1	-10	0	Ø	Ø	T.Y	T.Y	-	*	+	*	*
RAT 5	1	1	10	10	Ø	Ø	T.Y	T.Y	-	-	+	-	-
RAT 6	1	1	10	10	Ø	Ø	T.Y	T.Y	-	-	-	-	-

(\*); Fiksasyon problemi nedeniyle ışık mikroskobisiyle incelenemeyen, (+); deformasyon mevcut, (-); deformasyon yok, Ø; cevap yok,√; Cevap var, T.Y; Test Yapılamadı.

**Tablo 4.15.** Kontrol Grubundaki Ratların Elektrofizyolojik ve Morfometrik Bulguları

KONTRO L GRUBU	KM sağ	K M sol	İBC Eşik Sağ	İBC Eşik Sol	OAE Sağ	OA E Sol	KLS Sağ	KL S Sol	DT H sağ	DTH sol	İTH sağ	İTH sol	KN İnfil
RAT 1	1	1	Ø	Ø	Ø	Ø	T.Y	T.Y	*	+	*	+	-
RAT 2	1	1	20	10	√	√	√	√	*	-	*	-	-
RAT 3	1	1	10	20	√	√	√	√	*	-	*	-	-
RAT 4	1	1	10	20	√	√	√	√	-	*	-	*	-
RAT 5	1	1	10	10	√	√	√	√	-	*	-	*	-
RAT 6	1	1	10	0	√	√	√	√	-	*	-	*	-

(\*); Fiksasyon problemi nedeniyle ışık mikroskobisiyle incelenemeyen, (+); deformasyon mevcut, (-); deformasyon yok, Ø; cevap yok,√; Cevap var, T.Y; Test Yapılamadı.

## 5. TARTIŞMA

Hiperbilirubinemi yenidoğanlarda önemli bir sağlık sorunudur. Çoğu durumda hiperbilirubinemi klinik olarak merak uyandırmasa da bilirubin artışının ileri düzeyde olması ve normale dönüş süresinin uzaması yenidoğanlarda farklı anatomik bölgelerde hasarların oluşmasına neden olabilmektedir. Hiperbilirubinemi beyinde özellikle subtalamik nukleus, hipokampus ve bazal ganglia gibi bazı alanlara hasar verdiği bilinmektedir. Santral sistemin yanı sıra işitme sistemi de bilirubin toksisitesine duyarlıdır. Santral işitsel alanlardaki hasarlar anatomik ve fonksiyonel olarak hiperbilirubinemili hem hayvan hem de insanlarda tanımlanmıştır. Ancak periferik işitsel organlarda hiperbilirubinemi nedeniyle oluşan hasarların fizyolojik etkisi ve nöromekanizması hala gizemini korumaktadır.

Hiperbilirubineminin işitsel sisteme hasarıyla birlikte SNİK(%12,8) (5) ve /veya farklı oluşum teorilerine dayandırılan ancak bilirubin artışının bir sonucu olarak İNSB görülmektedir. İNSB'nin ileri düzeyde hiperbilirubinemisi olan olguların 1/3-1/2'sinde görülebileceği literatürde belirtilmiştir (101,102).

Bilirubin toksisitesi STBD ile yakından ilişkilidir. İnsanlarda bilirubin seviyesinin yüksekliği ile SNİK arasında yüksek korelasyon gözlenirken İNSB'nda bu korelasyon azalmaktadır, bilirubin düzeyi 19,5 mg/dL'nin altında olduğunda İNSB meydana gelmesi beklenmezken 20 mg/dL'nin üzerindeki düzeylerde İNSB görülme olasılığı artmaktadır (3). Hayvan modellerinde bu kadar kesin ayrımları ve patolojilerle ilişkilerini belirten yayınlar mevcut değildir. Hayvan modelleri oluşturmadaki zorluklar ve sınırlılıklar nedeniyle bilirubin düzeylerinin net olarak saptanması ve bunun sonucu oluşan patolojilerin belirlenmesi oldukça güçtür (22).

DeneySEL hiperbilirubinemili hayvan modellerinde sıklıkla genetik yapısı değiştirilmiş bir kemirgen türü olan '*Gunn Rat*' kullanılabilir. Bu rat türünün tercih edilmesinin en önemli nedeni bilirubin seviyesini yükseltmek için ek işlemlere ihtiyaç duyulmaması ve her yaş grubundaki rat ile daha düşük mortalite riskiyle çalışılabilir olmasıdır (103, 104, 22). Ancak ülkemizde yetiştirilememesi, yurt

dışından temin edilmesi, transferler sırasında mortalite riskinin yüksek olması, karantina altında tutularak geçen süre nedeniyle yenidoğan döneminde çalışamama ve yüksek maliyet nedeniyle çalışmada *Gunn Rat* türü yerine *Wistar Albino Rat* türü kullanılmıştır.

Hiperbilirubinemili rat modeli oluşturmada, hem ulaşılabilirliğinin ve uygulamasının kolay olması hem de dolaşım sisteminde kısa sürede absorbe olarak nörotoksisite sağlanabilmesi nedeniyle intraperitoneal bilirubin enjeksiyonu sıklıkla tercih edilmektedir (22,105). Gao ve diğ. (105) 2011 yılında yaptıkları çalışmada, serbest bilirubin uygulamasının hem hiperbilirubinemi hem de İNSB oluşturmada kullanılabilirliğinin etkin olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, çalışmada hiperbilirubinemili rat modeli oluşturmada intraabdominal bilirubin enjeksiyonu yöntemi tercih edilmiştir.

Hai Bo Ye ve diğ. (22), hayvan modellerinde tek ve düşük doz bilirubin enjeksiyonun yapılması durumunda fonksiyonel hasarların uzun sürmediğini, bu nedenle yüksek ve tekrarlı dozların hiperbilirubineminin uzun dönem etkilerini belirlemede daha etkin olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar bu manipulasyonlarda en büyük riskin mortalite olduğuna da dikkat çekmişlerdir. Çalışmada ön deneylerle de desteklenerek, Hansen ve diğ. (98) modeli kullanılmış, yenidoğan ratların kilosuna uygun ve mortaliteye neden olmayan bilirubin dozu belirlenmiştir.

Wennberg ve diğ.'nin (106) belirttiği üzere yenidoğan deney hayvanlarında STBD'nin monitorizasyonundaki yaklaşım metodlarının yetersizliğinden dolayı bilirubin düzeyi ile nörotoksisite bağlantısını kurmak zor olmaktadır. Yenidoğan ratlarla ilgili olarak literatürde STBD'yi belirten yayın bulunmamaktadır. Bunun en önemli nedeni yenidoğan rattaki kan miktarının çok düşük olması (ör. 1 haftalık ratta ortalama 1 cc) ve bu kanın alınmasıyla da ölümün gerçekleşmesidir. Bu durum etik açıdan da önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ancak, insanlarda bilirubin düzeyini belirlemede kullanılan ve non invaziv bir yöntem olan TkB yenidoğanlarda olduğu gibi ratlarda da kullanılabilir. TkB sonuçları ile kandaki total serum bilirubin düzeyi sonuçlarının benzer olduğu literatürde belirtilmektedir. Kanda STBD'ne

bakılması daha güvenilir olmakla beraber TkB'nin de alternatif olarak kullanılabilirliği bildirilmektedir (107). Çalışmada, ratların bilirubin düzeylerini belirlemek amacıyla sakrifikasyona kadar transkutan bilirubinometri ile periyodik ölçümler yapılmıştır. Sakrifikasyon öncesi yapılan ölçümle elde edilen bilirubin düzeyi ile sakrifikasyon sonrası intrakardiyak yolla alınan kandaki STBD leri karşılaştırılmış ve literatürle uyumlu olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Wistar Albino ratlarda TkB değerlerinin bilirubin enjeksiyonundan 24-48 saat sonrasında maksimum değerlere ulaştığı ve zamanla değerlerin düştüğü belirtilmektedir (98,99). Çalışmada elde edilen TkB verilerine göre bilirubin düzeyinin deney grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olması bilirubin toksisitesine yaklaşıldığının önemli bir göstergesi olmuştur. Sakrifikasyon öncesi TkB ölçüm sonuçlarının tüm gruplarda göreceli olarak yükselmesi erişkin döneme ulaşıncaya kadar kandaki bilirubin değerlerinde meydana gelen değişkenlikle açıklanabilir.

Bilirubin toksisitesinin işitsel sisteme etkisi önemlidir. Yenidoğanlarda da bu etkileri belirlemede İBC sıklıkla tercih edilmektedir. İşitsel duyarlılığı değerlendirmede kullanılan İBC, objektif ve non invaziv olması, güvenilirliğinin diğer test yöntemlerine göre daha yüksek olması, İNSB'nin tanılmasında KM örüntüsünün saptanabilmesi gibi nedenlerle yenidoğanlarda tercih edilmektedir (46, 84, 103).

Hiperbilirubinemili ratlarla yapılan çalışmalarda sıklıkla İBC'de latans uzaması ve amplitüde azalma gibi farklılıklar değerlendirilirken bu değişkenlerin yanı sıra eşik değerlendirmesi de yapılmış ve İBC'lerinde önemli derecede eşik yükselmeleri olduğu belirtilmiştir (20, 22, 103, 105). Çalışmada İBC'lerinde kontrol grubunda 1 rat dışında diğer ratlarda normal verilere yakın değerler ve morfoloji saptanırken plasebo ve deney gruplarında İBC bulgularında değişik derecelerde eşik değerlerinde yükselme, morfolojide bozulma gözlenmiştir. Deney grubunda 1 ratta tek kulakta KM kaydı ile İNSB ile uyumlu bulgu elde edilirken rattın diğer kulağında KM kaydı olmaksızın İBC yanıtı alınamamıştır. Diğer ratlarda ise değişik örüntülerde İBC larında bozulmalar gözlenmiştir. Ratlarda İBC dalgalarında

anatomik yerleşmeler insanlardan farklılık göstermektedir. İnsanlarda I., II. dalga VIII.sinirden, III.dalga KN'dan köken alırken ratlarda I. ve II.dalgaların KN, III.dalganın ise SOC kaynaklı olduğu bilinmektedir (85, 86, 87). Deney grubunda yer alan ratlarda yapılan morfolojik değerlendirme KN'da gözlenen bozulmaların bu grupta İBC yanıtlarının morfolojisinde de bozulmalara yol açtığı düşünülmektedir (22, 103, 105). Shapiro ve diğ. (108) *Gunn Ratlarda* akut bilirubin toksisitesinin özellikle ilk 4 saatte İBC'larını önemli ölçüde değiştirdiğini belirtmektedirler. Hiperbilirubinemi yenidoğanlarda yapılan çalışmalarda İBC elde edilmeyen ve KM görülen olgularda herhangi bir müdahale yapılmaksızın %50 oranında spontan düzelme olduğu da bildirilmiştir (109). Ayrıca İBC değişikliğine neden olan işitsel beyinsapındaki nöronal hasar, işitsel nöronların aktivasyonu ile oluşan senkronizasyonu da azaltmaktadır. Böylelikle işitsel nöronların membran potansiyeli de düşmekte ve işitsel beyinsapındaki nöronal fonksiyon hiperbilirubinemi nedeniyle bozulmaktadır (22, 103, 105, 110). Çalışmamızda yenidoğan ratların kan- beyin bariyerleri oluşmadan önce bilirubin enjeksiyonlarının yapılması, erişkin oluncaya kadar anne bakımına ihtiyaç duymaları ve yavrunun anneden uzaklaştırılmasıyla ya da anestezi sırasında mortalite risklerinin artması nedeniyle enjeksiyondan hemen sonra İBC değerlendirilmesi yapılmamıştır. Bu sebeple, bilirubin toksisitesinin akut etkisi ve takipleri de değerlendirilememiştir. Literatürde hayvan çalışmalarında uzun dönem takiplerin zorluğu vurgulanırken buna ilişkin sonuçların belirtilmediği de dikkati çekmektedir. Çalışmada, II.doz enjeksiyon sonrası ratlar erişkin duruma gelinceye kadar 11 gün beklenmiştir. Bu süre içinde hiperbilirubineminin muhtemel etkilerinin azalmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, hiperbilirubineminin etkisinin azalmış olmasına rağmen, çalışmada da görüldüğü gibi bilirubin yüksekliğine bağlı olarak İBC eşiklerinin yüksek şiddetlerde elde edilebilmesiyle birlikte dalga morfolojisinde bozulmalar, İNSB bulguları ve/veya İBC elde edilememesi gibi sonuçlara yol açtığı düşünülmektedir.

Otoakustik emisyon (OAE), kokleadaki DTH'nin cevabıdır ve ototoksiste, virüs, gürültü gibi nedenlerle koklear hasara neden olan durumlarda DTH fonksiyonunu değerlendirmede hem rutin klinik uygulamalarda hem de yenidoğan işitme taramalarında sıklıkla kullanılmaktadır (11, 112, 113).

DTH hasarı neticesinde OAE yanıtı alınamamaktadır. Baradaranfar ve diğ. (114), çalışmasında hiperbilirubinemili 35 yenidoğana 1 yıl sonrasında İBC ve OAE uygulamış ve 26 bebekte (%74.3) normal işitme saptarken 9'unda (%25.7) işitme kaybı tesbit edilmiştir. TEOAE testi sonucunda, 30 bebekte (%85.7) cevap alınırken diğer bebeklerden (%14.3) cevap alınamamıştır. Araştırmacılar cevap alınamayan bebeklerin bulgularının değerlendirilmesi sonucunda İNSB tanısı koyduklarını belirtmişlerdir.

Kontrol grubunda 1 rat dışında diğer ratlarda OAE bulgusu elde edilirken plasebo ve deney grubundaki ratlarda OAE cevabı elde edilememiştir. Bu bulgu morfolojik değerlendirmede de gözlenen DTH hücre hasarı ile desteklenmektedir. Literatürde de OAE cevaplarının alınamamasında DTH hasarının etkisine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır (60, 61, 64, 115).

Yapılan çalışmalarda, bilirubin enjeksiyonu sonrasında sadece işitsel beyinsapındaki KN'larda bozukluklar değil aynı zamanda DTH ve İTH'nde de anormallikler, hücre şekillerinde bozulmalar saptanmıştır (22, 105, 108). Hiperbilirubineminin, işitsel nöronların aktivasyonu ile oluşan senkronizasyonu azaltması sonucu İBC'de morfolojik yapının bozulmasıyla KM örüntünün oluşmasına neden olduğu belirtilmektedir (22,105,110) Çalışmada morfolojik değerlendirmede deney grubundaki 1 ratta hem DTH, İTH bozulmaları hem de KN infiltrasyonu saptanmıştır. Bu ratta elektrofizyolojik değerlendirme sonucunda unilateral İNSB bulgusu (%8.33) elde edilmiştir.. Deney grubundaki diğer 1 ratta İBC'ında KM benzeri örüntü ve yüksek şiddette eşik elde edilmesinin yanı sıra morfolojik değerlendirmede normal DTH yapıları ile İTH hasarı saptanmıştır. İNSB çoğunlukla bilateral görülmekle birlikte İNSB'li olguların %10'undan daha az unilateral olarak da karşılaşılabilmektedir (116, 117, 118).

Podwall ve diğ. (117), herhangi bir risk faktörü bulunmaksızın, normal radyolojik bulguları olan ve sol kulağında İNSB belirledikleri bir olguyu yayınlamış ve bilirubinin toksik etkisinin sistemik olmasına karşın tutulum lokalizasyonuna göre unilateral sonuçlarla da karşılaşılabileceğini belirtmişlerdir.

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de hayvan çalışmalarına olan ilgi giderek artmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda (123,124,125) hiperbilirubinemi modeli oluşturulmakla birlikte hiperbilirubineminin işitme sistemine olan etkilerinin çalışılmadığı görülmüştür. Bu açıdan önemli olan çalışmanın sonuçları hiperbilirubineminin işitsel sisteme olan olumsuz etkilerinin göstermesinin yanı sıra daha yüksek oranda SNİK oluşturduğunu da desteklemektedir.

Çalışmanın modeli oluşturulurken, kullanılan rat türünün yanı sıra hiperbilirubinemi oluşturulmasında kullanılan toz bilirubin aynı olması sebebiyle Hansen ve diğ. ’nin (98) çalışmasında kullandığı model örnek alınmıştır. Literatürde de plasebo grubunda aynı solüsyonun kullanılması sebebiyle solüsyonun işitme sisteme etkisine ilişkin herhangi bir ön çalışma yapılmamıştır. Ancak plasebo grubuna ilişkin bulguların değerlendirilmesinde bazı ratlarda morfometrik ve elektrofizyolojik değerlendirmelerde deney grubundaki ratlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu grupta TKB, STBD değerlerinin yüksek olmadığı da gözönünde bulundurulduğunda elde edilen bu bulgu solüsyonun da işitsel sistem üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Çalışmanın zayıf noktası olarak kabul edilebilecek bu bulgu aynı zamanda hayvan modellerinde hiperbilirubinemi oluşturulmasında kullanılacak olan solüsyonun etkisinin araştırılmasının hiperbilirubineminin işitme sistemi üzerindeki gerçek etkisinin anlaşılmasında önemli olduğunu göstermesi açısından da çok değerli bilgi sağlamaktadır.

Çalışma hipotezlerinde olduğu gibi yenidoğan ratlara toksik dozlarda bilirubin vererek kandaki bilirubin düzeyinin yükselmesi sağlanmış ve hiperbilirubineminin SNİK ve/veya İNSB’ye neden olabileceği görülmüştür. Bunun yanı sıra hiperbilirubinemi etkilerinin İBC’de farklı örüntülerle ortaya çıkabileceği de dikkati çekmiştir.



## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, toksik dozda bilirubin seviyesi ile hiperbilirubinemili yenidoğan rat modeli oluşturularak risk altındaki bebek ve çocuklarda bilirubin yüksekliğinin işitme sistemi üzerine etkileri elektrofizyolojik işitme değerlendirme sonuçları ve morfolojik değişimler incelenmiştir.

Çalışmamızda,

1. STBD hakkında veri sağlayabilmek için özellikle yenidoğan ratlar gibi çalışılması zor olan deney hayvanlarında non invaziv bir yöntem olan TkB'nin kolay ve alternatif seçenek olabileceği saptanmıştır.
2. Hiperbilirubineminin uzun dönem etkilerinde İBC eşiklerini yükseltebileceği, dalga morfolojisini bozabileceği gözlenmiştir.
3. İBC'de dalga morfolojisinin bozulmasının işitsel beyinsapındaki nöronal hasar, işitsel nöronların aktivasyonu ile oluşan senkronizasyonun azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.
4. Hiperbilirubineminin SNİK yanı sıra İNSD'ye de yol açabileceği ve İBC yanıtı olmaksızın KM görülebileceği, sistemik uygulamalarda yalnız bilateral değil unilateral tutulumların da olabileceği gözlenmiştir.
5. Hiperbilirubineminin DTH, İTH ve KN'lar da morfolojik bozulmalara neden olduğu saptanmıştır.
6. Deney hayvanlarında İBC lokalizasyonu tercih edilen hayvana göre farklılık göstermektedir. Bu sebeple deneysel çalışmalarda bu farklılıklar gözönünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

### ÖNERİLER

Hiperbilirubinemi yenidoğan kliniklerinde olduğu kadar odyoloji merkezlerinde de göz ardı edilmemesi gereken risk faktörleri arasında olmalıdır. Uzun dönemde yüksek düzey bilirubin toksisitesinin her ne kadar merkezi sinir sistemi üzerine etkileri biliniyor olsa da özellikle periferik işitme sistemi üzerine etkileri net olarak tanımlanmamıştır. Bu nedenle hiperbilirubinemili yenidoğanların ülkemizde de uygulanan Ulusal Yenidoğan İşitme Taraması kapsamındaki işitme

testlerinden geçmelerine karşın takiplerinin mutlak yapılması ve ailelerin yeterli düzeyde bilgilendirilmesi gereklidir.

Takiplerin yanı sıra uzun dönemde uygun işitme test protokollerinin belirlenerek daha net tanıların konulabilmesi ve tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesinde deney hayvanlarının kullanımı büyük önem taşımaktadır. Bunun için çalışmalara uygun deney hayvanlarının tercihi ve modellerinin oluşturulması gerekmektedir. Yapılan ön çalışmalar ve araştırmalarla daha iyi modellerin geliştirilmesi uzak değildir. Hiperbilirubineminin işitme sistemine etkilerini belirlemede etik kurallara uygun şekilde çalışmaların desteklenmesiyle elde edilen bulguların hiperbilirubinemili yenidoğanlara farklı ufukların açabileceği unutulmamalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Oysu Ç., Aslan I., Ulubil A., Başerer N. (2002). Incidence of Cochlear Involvement in Hyperbilirubiemic Deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 111. 1021- 1025.
2. Ögün B., Şerbetçioğlu B., Duman N., Özkan H., Kırkım G. (2003). Long- term outcome of neonatal hyperbilirubinemia: subjective and objective audiological measures. *Clin. Otolaryngol.* 28. 507- 513.
3. Nickisch A., Massinger C., Wagner B., Voss H. (2009). Pedaudiologic findings after severe neonatal hyperbilirubinemia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 266. 207-212.
4. Akyıldız N. (2002). Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. 1. Baskı. 215- 332. Ankara. BilimselTıp Yayın Evi.
5. Boo NY., Rohani AJ., Asma A. (2008). Detection of sensorineural hearing loss using automated auditory brainstem-evoked response and transient-evoked otoacoustic emission in term neonates with severe hyperbilirubinaemia. *Singapore Med J.* Mar;49(3). 209-14.
6. Roush P. (2008). Auditory neuropathy spectrum disorder: Evaluation and management. *Hearing Journal.* November. Volume 61 (11). 36,38-41
7. Sharma A., Cardon G., Henion K., Roland P. (2011). Cortical maturation and behavioral outcomes in children with auditory neuropathy spectrum disorder. *International Journal of Audiology.* Feb; 50(2). 98-106.
8. Batalla FN., Fernandez PC., Leon ME., Trelles TG. (2008). Incidence of hypoacusia secondary to hyperbilirubinaemia in a universal neonatal auditory screening programme based on otoacoustic emissions and evoked auditory potentials. *Acta Otorrinolaringol Esp;* 59. 108-113.

9. Neyzi O., Ertuğrul T. (2002), Kernikterus (Bilirubin Ensefalopatisi), Çoban A.(Ed) Pediatri. 402-420. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
10. Kavlu A. (2006), Kliniğimiz Yenidoğan Ünitesine Yatırılan İndirekt Hiperbilirubinemili Olguların Değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi. Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
11. Ree C., Park H., Jang Y. (1999). Audiologic Evaluation of Neonates With Severe Hyperbilirubinemia Using Transiently Evoked Otoacoustic Emissions and Auditory Brainstem Responses. *The Laryngoscope*. 109 (12). 2005 – 2008.
12. Brenda L., Lonsbury M., Martin GK., Luebke AE. (1996). İşitme ve vestibüler sistemlerin fizyolojisi. Ballenger JJ, Snow JB, editors. (Senocak D, çev.ed.) Otolaringoloji Bas Boyun cerrahisi.. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 15. Baskı.
13. Toros M.(2010), Yenidoğan Sarılığı Olan ve Olmayan Bebeklerin İşitme Taraması Bulguları ile 3 ve 6. Ay Klinik Beyinsapı Odyometrisi Bulgularının Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
14. Berkow R. (1995). The Merck Manual Tanı-Tedavi El Kitabı. Keklikoğlu M, Tuzcu M (Çev), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 16.baskı.
15. Norr KF. Nacion K. (1987). Outcomes of postpartum early discharge, 1960-1986. A Comparative Review. *Birth*.14. 135-141.
16. Loeb WF., Qiumby FW. (1999). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, 2. Edition. USA. Taylor & Francis.
17. Şimşek MF. (2009). Yenidoğan Sarılıklarında Transkutan Bilirubin Ölçümü ile Total Serum Bilirubin Ölçümü Arasındaki Korelasyonun Araştırılması. Uzmanlık tezi. Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
18. Mauk GW., Behrens TR. (1993) Historical, political and technological context associated with identification of hearing loss. *Semin Hear*. 14. 1-17.

19. Abbas PJ., Miller CA. (1998). Physiology of the auditory system. Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE, editors. *Otolaryngology Head & Neck Surgery*. 3 rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book. 2831–74.
20. Shapiro SM. (2003). Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol*. 29. 410-421.
21. Ovalı F. (2007). İndirekt Hiperbilirubinemi. Dağoğlu T., Ovalı F. Neonatoloji, İstanbul, Nobel tıp kitabevi, 2. Baskı, 517-536.
22. Ye HB., Shi HB., Wang J., Ding DL., Yu DZ., Chen ZN., Li CY., Zhang WT., Yin SK. (2012). Bilirubin induces auditory neuropathy in neonatal guinea pigs via auditory nerve fiber damage. *J Neurosci Res*. Nov; 90 (11). 2201-13.
23. Hall JW., Swanepoel DW. (2010). Objective Assessment of Hearing, San Diego, Plural Publishing, 1-5.
24. Parving A. (1993). Congenital hearing disability; epidemiology and identification. *Int J Pediatric Otolaryngology*. 27. 111-91.
25. Mencher GT. (2000). Challenge of epidemiological research in the developing world: over view. *Audiology*. 39(4). 178-83.
26. White KR., Vohr BR., Behrens TR. (1993). Universal newborn hearing screening using Transient Evoked Otoacoustic Emmission: Results of the Rhode Island Hearing Assessment Project. *Seminars in Hearing*. 14 (1). 18-29.
27. Aktaş FV., (2012), Çocuklarda Sensörinöral İşitme Kayıpları ve Odyolojik Değerlendirme, *Türkiye Klinikleri Kulak Burun Boğaz*, 5(2), 32-42.
28. Huang BY., Zdanski C., Castillo M. (2012). Pediatric Sensorineural Hearing Loss, Part2: Syndromic and Acquired Causes. *AJNR Am J Neuroradiol*. Mar.33(3). 399-406.

29. Zeng FG., Kong YY., Michalewski H.J., Starr A., (2005). Perceptual consequences of disrupted auditory nerve activity, *J. Neurophysiol.* 93. 3050–3063.
30. Hinchcliffe R., Osuntokun BO., Adeuja AO. (1972). Hearing levels in Nigerian ataxia neuropathy, *Audiology.* 11. 218–230.
31. Worthington DW., Peters JF. (1980). Quantifiable hearing and no ABR: paradox or error? *Ear Hear.* 1. 281–285.
32. Cacace AT., Satya-Murti S., Grimes CT., (1983). Frequency selectivity and temporal processing in Friedreich's ataxia: clinical aspects in two patients, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 92. 276–280.
33. Kraus N., Ozdamar O., Stein L., Reed N. (1984). Absent auditory brain stem response: peripheral hearing loss or brain stem dysfunction? *Laryngoscope.* 94. 400–406.
34. Dowley AC., Whitehouse WP., Mason SM., Cope Y., Grant J., Gibbin KP., (2009), Auditory neuropathy: unexpectedly common in a screened newborn population, *Dev. Med. Child Neurol.* 61 (8). 642–646.
35. Berlin CI., Hood LJ., Morlet T., Mattingly KR., Taylor-Jeanfreau J., John PS. (2010). Multi-site diagnosis and management of 260 patients with auditory neuropathy/ dys-synchrony (Auditory Neuropathy Spectrum Disorder\*), *Int. J. Audiol.* 49. 30–43.
36. Soliman SM., (1987) Low frequency sensorineural hearing loss: a syndrome, *Audiology* 26. 332–338.
37. Starr A., McPherson D., Patterson J., Don M., Luxford W., Shannon R., Waring M.(1991), Absence of both Auditory Evoked Potentials and Auditory Percepts Dependent on Timing Cues. *Brain.* 114. 1157-1180.
38. Starr A., Picton TW., Sininger Y., Hood LJ., Berlin CI. (1996). Auditory neuropathy, *Brain.* 119. 741–753.

39. Berlin CI., Hood LJ., Rose K. (2001). On renaming auditory neuropathy as auditory dys-synchrony. *Audiology Today*. 13. 15-17.
40. Rapin I., Gravel J. (2003). Auditory neuropathy: physiologic and pathologic evidence calls for more diagnostic specificity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. Jul.67 (7). 707-28.
41. Berlin CI., Morlet T., Hood LJ. (2003). Auditory neuropathy/dyssynchrony: its diagnosis and management. *Pediatr Clin North Am*. Apr.50 (2). 331-40.
42. Starr A., Isaacson B., Michalewski HJ., Zeng FG., Kong YY., Beale P., Paulson GW., Keats BJ., Lesperance MM. (2004) Dominantly Inherited Progressive Deafness Affecting Distal Auditory Nerve and Hair Cells. *J Assoc Res Otolaryngol*. Dec. 5 (4). 411-26.
43. Rapin I., Gravel J. (2006). Auditory Neuropathy: A Biologically Inappropriate Label Unless Acoustic Nerve Involvement is Documented. *Journal of the Academy of Audiology*, 17. 147-50.
44. El-Badry MM., McFadden SL. (2009). Evaluation of inner hair cell and nerve fiber loss as sufficiently pathologies underlying auditory neuropathy. *Hear. Res*. 255. 84–90.
45. Sutton G., Gravel J., Hood LJ., Lightfoot G., Mason S., Sirimanna T. (2008). Assessment & management of auditory neuropathy/auditory dys-synchrony. NHSP AN/ AD Protocol v 1.1.
46. Ngo RY., Tan HK., Balakrishnan A., Lim SB., Lazaroo D. (2006). Auditory neuropathy/auditory dys-synchrony detected by universal newborn hearing screening, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 70. 1299–1306.
47. Manchaiah VK, Zhao F, Danesh AA, Duprey R. (2011). The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSO). *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 75. 151–158.

48. Martin GK, Probst R, Lonsbury-Martin BL. (1990). Otoacoustic emissions in human ears: Normative findings. *Ear Hear.* 11. 106–20.
49. Özturan O, Lew H, Jerger J. (1994). Otoakustik emisyonlar ve klinik uygulamaları. *KBB İhtisas Dergisi.* 2. 194–205.
50. Kemp DT. (1986). Otoacoustic emissions, travelling waves and cochlear mechanisms. *Hear Res.* 22. 95– 104.
51. Rance G., Starr A. (2011). Auditory Neuropathy/ Dys- Synchrony Type Hearing Loss, Seewald R., Tharpe AM. *Comprehensive Handbook of Pediatric Audiology*, San Diego, Plural Publishing.
52. Gökdoğan Ç. (2012). Koklear İmplant Adaylarında Preoperatif Odyolojik Değerlendirme ve Postoperatif Takip, *Türkiye Klinikleri Kulak Burun Boğaz.* 5 (1). 27- 33.
53. Khovels R. Freeman S. Sohmer H. (1996). Transient Evoked Otoacoustic Emissions Can Be Recorded in the Rats. *Hearing Research.* 97. 120-126.
54. Nakamura M., Yamasoba T., Kaga K. (1997). Changes in Otoacoustic Emissions in Patient with Idiopathic Sudden Deafness. *Audiology.* 36. 121-135.
55. Penner MJ. (1990). An estimate of the prevalence of tinnitus caused by spontaneous otoacoustic emissions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* Apr.116 (4). 418-23.
56. Probst R., Lonsbury BL., Martin M., Martin GK. (1991). A Review of Otoacoustic Emissions. *Jou. Acous. Som.* 89. 2027-2067.
57. Stenklev NC, Laukli E. (2003). Transient Evoked Otoacoustic Emissions in the Elderly. *Int. J. Audiology.* 4. 87-94.
58. Mazelova J, Popelar J, Syka J. (2003). Auditory Function in Presbycusis: Peripheral vs Central Changes. *Exp Gerontol.* 38. 87-94.



59. Barbara M, Hultcrantz M. (1991). Vasculer Supply of the Endolymphatic Sac. A Gross and Ultrastructural Study in the Mongolian Gerbil Under Norma and Experimental Conditions. *Acta Otolaryngol.* 111 (4). 728-737.
60. Campell KCM., Durrant J. (1993). Audiological Monitoring for Ototoxicity. *The Otolaryngologic Clinics of North America.* 26 (5). 903-917.
61. Hotz MA., Harris FP., Probst R. (1994). Otoacoustic Emissions: An Approach for Monitoring Aminoglycoside-ototoxicity. *Laryngoscope.* 104. 1130-1134.
62. Moulin A, Bera JC, Collet L. (1994). Distortion Product Otoacoustic Emissions and Sensorineural Hearing Loss. *Audiology.* 33. 305-326.
63. Korres S, Balatsouras D, Manta P. (2002). Cochlear Dysfunction in Patients With Mitochondrial Myopathy. *ORL J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 64. 315- 320.
64. Lafreniere D, Smurzynski J, Jung M. (1993). Otoacoustic Emissions in Full-Term Newborns at Risk for Hearing Loss. *Laryngoscope.* 103. 1334-1341.
65. Bohmer A. (1993) Hydrostatic Pressure in the Inner Ear Fluid Compartments and its Effects on Inner Ear Function. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 507. 3-24.
66. Morrison GA, Teixeira M, Sterkers O, Amiel C, Ferrary E. (1996). Effect of Glycerol on Electrochemical Composition of Endolymph and Perilymph in the Rat. *Acta Otolaryngol.* Jul. 116 (4). 546-551.
67. Brown AM. (1987). Acoustic Distortion from the Rodent Ears: a Comparison of Responses from Rats, Guiana Pigs and Gerbils. *Hear Res.* 31. 25-38.
68. Guinan JJ, Warr WB, Norris BE. (1983). Differential olivocochlear projections from lateral vs. medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol.* 221. 358- 370.
69. Warr WB, Guinan JJ. (1979). Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res.* 173 152- 155.

70. Goodman SS, Keefe DH. (2006). Simultaneous measurement of noise-activated middle-ear muscle reflexes and stimulus frequency otoacoustic emissions. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 7(2). 125- 39.
71. Yost WA. (2000). Peripheral Auditory Nervous System and Hair cells. *Fundamentals of hearing*. Fourth ed. Academic Press. 105- 126.
72. Guinan JJ. (2006). Olivocochlear efferents: Anatomy, physiology, function and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hearing*. 27. 589- 607.
73. Brown MC. (1989). Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hear Res*. 40. 93- 109.
74. Liberman MC, Brown MC. (1986). Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res*. 24. 17- 36.
75. Liberman MC. (1988). Response properties of cochlear efferent neurons: monaural vs. binaural stimulation and the effects of noise. *J Neurophysiol*. 60. 1779- 1798.
76. Robertson D. (1984). Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res*. 15. 113- 121.
77. Gkoritsa E, Korres S, Segas I, Xenelis I, Apostolopoulos N, Ferekidis E. (2007). Maturation of the auditory systems: 2. Transient otoacoustic emission suppression as an index of the medial olivocochlear bundle maturation. *International Journal of Audiology*. 46. 277- 286.
78. Wagner W, Heppelmann G, Kuehn M, Tisch M, Vonthein R, Zenner H. (2005). Olivocochlear activity and temporary threshold shift-susceptibility in humans. *The Laryngoscope*. 115. 2021- 2028.
79. Rajan R. (2000). Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by a loud sound. *Journal of Neuroscience*. 20. 6684- 6693.

80. Mulders WH, Robertson D. (2002). Inputs from the cochlea and the inferior colliculus converge on olivocochlear neurones. *Hearing Research*. 167. 206-213.
81. Thompson AM, Thompson GC. (1993). Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. *J Comp Neurol*. 335. 402-412.
82. Hall III J. W. (2007). ABR Analysis and Interpretation. Dragin S. D..New Handbook of Auditory Evoked Responses. 212-258. USA.
83. Stapells DR, Gravel JS, Martin BA. (1995). Thresholds for auditory brain stem responses to tones in notched noise from infants and young children with normal hearing or sensorineural hearing loss. *Ear Hear*. Aug.16 (4). 361-71.
84. Wilson JW, Sharp KJ, Hansen C, Kwong P, Kelly A. (2007).Especially prominent cochlear microphonic activity in the auditory brainstem response. *International Journal of Audiology*. 46. 362-373.
85. Overbeck, G.W., Church, M.W. (1992). Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hear. Res*. 59 (2). 129–137.
86. Parham, K., Sun, X.M., Kim, D. (2001). Noninvasive assessment of auditory function in mice: auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emissions. Willott, J.P. Handbook of Mouse Auditory Research: From Behavior to Molecular Biology. New York, CRC Press.
87. Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Jareño-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. (2012). Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci Res*. Aug. 73 (4). 302-11.
88. Kolar R. (2006). Animal Experimentation. Science and Engineering Ethics. Volume 12, 111-122.
89. Resnik D, B. (2004) Bilim Etiği. Mutlu V. İstanbul. Ayrıntı Yayınları.

90. Çobanoğlu N., Aydoğdu İ B. (2004). Hayvan Haklarının Tarihsel Gelişimine Biyoetik Yaklaşım. *Bilim ve Ütopya*. S:116.
91. [http://www.wistar.org/about\\_wistar/history.html](http://www.wistar.org/about_wistar/history.html) Erişim Tarihi: 17.01.2013
92. Judkins RF, Li H. (1997). Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 117. 438–47.
93. Zimmer WM, Deborah FR, Saunders JC. (1994). Middle-ear development VI: Structural maturation of the rat conducting apparatus. *Anat Rec.* 239. 475–84.
94. Daniel HJ, Fulghum RS, Brinn JE, Barrett KA. (1982). Comparative anatomy of eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 91. 82–89.
95. Albiin N, Hellström S, Stenfors L-E, Cerne A. (1986). Middle ear mucosa in rats and humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 126 Suppl. 2–15.
96. Hebel R, Stromberg MW. (1976). *Anatomy of the laboratory rat*. Baltimore. Williams & Wilkins Co.
97. <http://www.jcam.com.tr/files/KATD-559.pdf> Erişim Tarihi:17.01.2013
98. Hansen T, Tommarello S, Allen J. (2001). Subcellular localization of bilirubin in rat brain after in vivo i.v. administration of [3H] bilirubin. *Pediatr Res.* 49. 203–207.
99. Mesner O, Miller MJ, Iben SC, Prabha KC, Mayer CA, Haxhiu MA, Martin R. (2008). Hyperbilirubinemia diminishes respiratory drive in a rat pup model, *J Pediatr Res.* Sep.64 (3). 270-4.
100. Balistreri WF, Shaw LM. (1987). Liver function. Tietz NW, *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders.
101. Madden C, Rutter M, Hilbert L, Greinwald JH Jr, Choo DI. (2002). Clinical and audiological features in auditory neuropathy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 128. 1026–1030.

102. Rance G, Briggs RJ. (2002). Assessment of hearing in infants with moderate to profound impairment: the Melbourne experience with auditory steady-state evoked potential testing. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 189. 22 – 8.
103. Shapiro SM, Nakamura H. (2001). Bilirubin and the auditory system. *J Perinatol.* Dec.21 Suppl 1. 52-62.
104. Shaia WT, Shapiro SM, Spencer RF. (2005). The jaundiced Gunn rat model of auditory neuropathy/dyssynchrony. *Laryngoscope.* Dec. 115 (12). 2167-73.
105. Gao X, Yang X, Zhang B. (2011). Neuroprotection of taurine against bilirubin-induced elevation of apoptosis and intracellular free calcium ion in vivo. *Toxicol Mech Methods* 21. 383–387.
106. Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. (2006). Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics.* 117. 474–485.
107. Vreman HJ, Wong RJ, Chan ML, Young BW, Stevenson DK. (2006). Transcutaneous bilirubinometry: a noninvasive tool for studying newborn jaundiced rats before and after exposure to light. *Pediatr Res.* Feb.59 (2). 203-9.
108. Shapiro SM, Te Selle ME. (1994). Cochlear microphonics in the jaundiced Gunn rat. *Am J Otolaryngol.* Mar-Apr. 15 (2). 129-37.
109. Hall III J. W. (2007). ECochG: Clinical Applications and Populations. Dragin S. D. *New Handbook of Auditory Evoked Responses.* 135-170. USA.
110. Jiang ZD, Brosi DM, Wilkinson AR. (2009). Changes in BAER wave amplitudes in relation to total serum bilirubin level in term neonates. *Eur J Pediatr.* Oct. 168 (10). 1243-50.
111. Azevedo MF. Emissões otoacústicas. (2003) Figueiredo MS. Emissões otoacústicas e bera. São José dos Campos. 35-83. Pulso.

112. Borges CAB, Moreira LMO, Pena GM, Fernandes FR, Borges BCB, Otani BH. (2006). Triagem auditiva neonatal universal. *Arq Int Otorrinolaringol.* 10 28-34.
113. Ilha L, Kasse C, Mesquita Neto O, Almeida CR, Cruz OLM. (2007). Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dosedependente - avaliação funcional. *Acta ORL.* 25. 112-18.
114. Baradaranfar MH, Atighechi S, Dadgarnia MH, Jafari R, Karimi G, Mollasadeghi A, Eslami Z, Baradarnfar A. (2011). Hearing status in neonatal hyperbilirubinemia by auditory brain stem evoked response and transient evoked otoacoustic emission, *Acta Med Iran.* 49 (2). 109-12.
115. Silva DP, Martins RH. (2009). Analysis of transient otoacoustic emissions and brainstem evoked auditory potentials in neonates with hyperbilirubinemia. *Braz J Otorhinolaryngol.* May-Jun. 75 (3). 381- 6.
116. Ohwatari R, Fukuda S, Chida E, Matsumura M, Kuroda T, Kashiwamura M, Inuyama Y, (2001). Preserved otoacoustic emission in a child with a profound unilateral sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx.* 28. 117–120.
117. Podwall A., Podwall D., Gordon T. G., Lamendola P., and Gold A. P. (2002) Unilateral auditory neuropathy: case study. *Journal of Child Neurology.* 17(4). 306–309.
118. Buchman C. A., Roush P. A., Teagle H. F. B., Brown C. J., Zdanski C. J., and Grose J. H. (2006). Auditory neuropathy characteristics in children with cochlear nerve deficiency. *Ear and Hearing.* 27 (4). 399–408.
119. <http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2717137>  
Erişim Tarihi: 17.01.2013
120. <http://it.wikipedia.org/wiki/File:ABR.png> Erişim Tarihi:17.01.2013
121. [http://psychology.utoledo.edu/images/users/74/21.JAALAS\\_Revised.pdf](http://psychology.utoledo.edu/images/users/74/21.JAALAS_Revised.pdf) Erişim Tarihi:17.01.2013

122. Sininger Y, Oba S. (2001).Patients with Auditory Neuropathy: Who Are They and What Can They Hear? In: Sininger Y, Starr A. Auditory Neuropathy: A New Perspective on Hearing Disorders. 15-35. Canada: Singular Thomson Learning.
123. Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altiok M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. (2010). Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol*. Sep 14.16 (34). 4313-20.
124. Oruç MT, Ozmen MM, Han U. (2009). A new technique for inducing and releasing obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res*. 43 (4). 354-9.
125. Kaya O, Ozdemir F, Atli M, Aslan V, Cağatay M, Anlar M, Alper M. (2009). The effects of ciprofloxacin and ursodeoxycholic acid on bacterial translocation in obstructive jaundice. *Turk J Gastroenterol*. Sep. 20 (3). 186-91.

## 8. EK

## EK-1. ETİK KURUL ONAYI



**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**REKTÖRLÜĞÜ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı**

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 4-983  
KONU :

17.10/2012

Sayın

**Doç.Dr. Aydan GENÇ**  
**Hacettepe Üniversitesi Hastanesi**  
**Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı**  
**Odyoloji Bilim Dalı**  
**Öğretim Üyesi**

Araştırmacı grubu Aydan GENÇ, Çağıl GÖKDOĞAN ve Yasemin ÖZDEMİR'den oluşan, G.Ü.ET-12.001 kod numaralı ve "*İşitsel Nöropatili Yenidoğan Wistar Albino Rat Modelinde Elektrofizyolojik İşitsel Yanıtların Morfolojik Bulgularla Karşılaştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-12.001 and entitled "*Comparation of Electrophysiological Auditory Parameters and Morphological Results in Newborn Wistar Albino Rats Model With Auditory Neuropathy*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

  
**Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN**  
**Gazi Üniversitesi**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı**