

Ekzojen Glukokortikoidlere Maruziyet Sonrası Gürültü Uygulanmasının İşitme Üzerine Etkisi Deneysel Hayvan Çalışması

Effect of Noise Application on Hearing Following Exogenous Glucocorticoid Exposure an Experimental Animal Study

Uz.Dr. Öner SAKALLIOĞLU,^a
 Prof.Dr. Şinasi YALÇIN,^b
 Prof.Dr. Figen KAYMAZ,^c
 Prof.Dr. Kadriye Mine ERGUN ERBİL,^d
 Doç.Dr. Hayrettin Cengiz ALPAY,^b
 Prof.Dr. Hatice Mürvet HAYRAN^d

^aKulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği, Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
^bKulak Burun Boğaz Hastalıkları AD, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ
^cHistoloji ve Embriyoloji AD,
^dAnatomi AD, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 31.01.2011
 Kabul Tarihi/Accepted: 01.11.2011

Yazışma Adresi/Correspondence:

Uz.Dr. Öner SAKALLIOĞLU
 Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
 Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği,
 Elazığ,
 TÜRKİYE/TURKEY
 onersakallioğlu@yahoo.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmanın amacı, prenatal dönemde ekzojen glukokortikoidlere maruz kalınmasının işitme üzerine etkisini irdelemek ve bir antioksidan olan aminoguanidinin iç kulakta oluşabilecek olası hasarı önlemede etkili olup olmadığını değerlendirmektir. **Gereç ve Yöntemler:** On iki hamile Sprague-Dawley cinsi rata, hamileliklerinin 14. gününden doğum yapana kadar deksametazon veya distile su enjekte edildi. Esas denekler, bu ratların yavrulamasıyla elde edildi. Esas denekler iki aylık olduklarında stres etkisi oluşturmak için ses izolasyonlu bir ortamda dört saat süresince 110 dB gürültüye maruz bırakıldı. Denekler üç gruba ayrıldı. Grup 1: Annesine distile su enjekte edilen ve kendisi 110 dB gürültüye maruz kalanlar. Grup 2: Annesine deksametazon verilen ve kendisi 110 dB gürültüye maruz kalanlar. Grup 3: Annesine deksametazon verilen, kendisi 110 dB gürültüye maruz kalan ve 200 mg/kg/gün aminoguanidin verilenler. Gürültü ve aminoguanidinin işitme ve iç kulak üzerine etkileri beyinsapı uyarılmış yanıt odyometri (BERA) ve elektron mikroskopisiyle değerlendirildi. **Bulgular:** Grup 1 ve grup 2 deneklerinin gürültüden iki ay sonraki işitme eşiği değerlerinde, 48 saat sonraki eşik değerlerine kıyasla meydana gelen düzelme istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Geçici eşik kaymalarının en fazla aminoguanidin verilen grup 3 deneklerinde olduğu gözlemlendi. Aminoguanidin verilen grup 3 deneklerinin gürültüden iki ay sonraki dönemde yapılan işitme eşiği ölçümlerinde, gürültüden 48 saat sonraki döneme göre gözlemlenen düzelmelerin (13,75 dB), grup 1 (10 dB) ve grup 2 (10 dB) deneklerine göre 3,75 dB daha fazla olduğu tespit edildi. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) ve aminoguanidin verilmesinin faydalı olmadığına işaret etmekteydi. **Sonuç:** Prenatal dönemde ekzojen steroidlere maruz kalınması, iç kulağı gürültünün etkilerine karşı hassas hale getirmemektedir. Aminoguanidin olası hasarı önlemede etkili bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Glukokortikoidler; işitme; perinatal maruz kalmanın geç etkileri

ABSTRACT Objective: The aim of this study is to investigate the effect of exogenous glucocorticoid exposure in the prenatal period on hearing, and the effectiveness of an antioxidant, 'aminoguanidine', on the prevention of the inner ear injury. **Material and Methods:** Twelve pregnant Sprague-Dawley rats were injected with dexamethasone or distilled water beginning from 14th day of gestation to delivery. Test subjects were exposed to 110 dB of noise for four hours in a sound isolated environment in order to create a stress effect, when they became two months old. Test subjects were divided into three groups. Group 1: The ones whose mothers were injected with distilled water and who were exposed to 110 dB noise. Group 2: The ones whose mothers were injected with dexamethasone and who were exposed to 110 dB noise. Group 3: The ones whose mothers were injected with dexamethasone and who were exposed to 110 dB noise, and administered 200 mg/kg/day aminoguanidine. Effects of noise and aminoguanidine on hearing and the inner ear were assessed with brainstem evoked response audiometry (BERA) and electron microscopy. **Results:** Improvement of hearing thresholds of test subjects in group 1 and group 2 two months after noise exposure was statistically significant when compared to the thresholds obtained 48 hours after noise exposure ($p<0.05$). The temporary threshold shifts were observed mostly in group 3 (injected with aminoguanidine). An improvement of 13.75 dB was evident in the hearing thresholds in group 3 test subjects two months after noise exposure while hearing thresholds 48 hours after noise exposure was 3.75 dB better than the hearing thresholds of test subjects in group 1 (10 dB) and group 2 (10 dB). This difference was not statistically significant ($p>0.05$) and it was indicated that the application of aminoguanidine was not beneficial. **Conclusion:** Exposure to the exogenous glucocorticoids in prenatal period does not make the inner ear susceptible to the effect of noise. Aminoguanidine was not found effective to prevent possible injury.

Key Words: Glucocorticoids; hearing; prenatal exposure delayed effects

doi: 10.5336/medsci.2011-22997

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(2):354-63

Fetal büyüme ve gelişme esnasında hızlı hücre bölünmesi nedeniyle çeşitli vücut dokularında farklılaşma meydana gelir. Bu esnada besinsel ve hormonal ortamlarda meydana gelen değişiklikler fetal genomun ifadesini etkileyerek fizyolojik süreçlerde kalıcı sonuçlara neden olabirirler.¹ Yani, intrauterin ortamdaki metabolik ve endokrin denge, bireyin gelecekteki yaşamını etkileyebilmektedir ve organizmanın gelişimindeki rolü önemlidir.^{2,3} Bilindiği gibi glukokortikoidler, prenatal ortam için elzem role sahiptir ve çeşitli dokuların gelişiminde gereklidir. Bu dokulardan en iyi bilineni akciğerdir.⁴

Erken doğum olasılığı olan hamilelerde fetüsün akciğer gelişimini indüklemek veya adrenogenital sendromu tedavi etmek amacıyla ekzojen olarak glukokortikoidler kullanılmaktadır. Ancak fazla miktarda ekzojen sentetik glukokortikoidlere maruz kalınması, fetal gelişimi olumsuz etkileyebilir. Ekzojen veya endojen glukokortikoidlere ve strese maruz kalınması sonucu düşük doğum ağırlıklı yavru doğabilmekte ve yine bazı organlar ve sistemler bu durumdan etkilenmektedir.⁵ Örneğin prenatal dönemde maruz kalınan yüksek şiddette (120 dB) gürültünün de ratlarda düşük doğum ağırlığına yol açabileceği ortaya konmuştur.⁶ Yine bazı çalışmalarda prenatal dönemde sentetik glukokortikoidlere ve strese maruz kalan rat yavrularında gürültü verilmesi sonrasında işitme kayıpları olduğu gösterilmiştir.⁷ Ayrıca prenatal dönemde maruz kalınan stres, organizmayı çeşitli dış etkenlere karşı daha hassas hâle getirebilmektedir.⁸

Nöroendokrin ve nörodavranışsal işlevlerde değişikliklere yol açan diğer bir olası mekanizma da oksidatif stresle ilgili hücresele olaylardır. Bilindiği üzere serbest oksijen radikalleri (SOR) hücresele düzeyde sinyal iletimi, hücresele büyüme, farklılaşma ve apoptotik hücre ölümü gibi olaylarda etkin rol oynamaktadırlar.⁹⁻¹¹ Prenatal dönemde yüksek miktarlarda glukokortikoidlere maruz kalınması, serebellar nöronlarda oksidatif stresin indüklediği apoptozise eğilimi arttırmaktadır.¹² Gürültüye maruz kalınmasının koklear damarlarda vazokonstrüksiyona yol açabileceği gösterilmiştir. Vazokonstrüksiyon sonucu koklear kan akımı aza-

larak hipoksi ve neticede SOR oluşumu söz konusu olabilecektir.^{13,14} Bazı çalışmalarda SOR oluşumunu önleyen ilaçların, gürültüye cevap olarak kokleada oluşabilecek hasarı önlemede faydalı olduğu gösterilmiştir.¹⁵

Yaptığımız bu çalışmada, prenatal dönemde ekzojen glukokortikoidlere maruz kalınmasının işitme üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca bir antioksidan ajan olan aminoguanidinin iç kulakta meydana gelebilecek olası hasarı önlemede etkili olup olmadığı elektrofizyolojik (BERA: Brainstem Evoked Response Audiometry) olarak ve elektron mikroskopisiyle incelendi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEKLER

Çalışma 200-300 g ağırlığındaki 16 adet dişi ve 16 adet erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanılarak gerçekleştirildi. Ratların bakımı özel yemlere ve suya kolayca ulaşabilecekleri, 30x40x20 cm boyutlarında, üzeri çelik tel parmaklıkla örtülü plastik kafesler içinde yapıldı. Ratlar, her kafese en fazla dörder adet rastgele dağılımları yapılarak barındırıldı. Çalışma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun onayı alınarak ve deney hayvanları bakımını ve kullanımını ilkelerine uyulmak suretiyle hayvan hakları korunarak gerçekleştirildi.

ESAS DENEKLERİN ELDE EDİLMESİ

Esas deneklerin elde edilmesi için 16 dişi ve 16 erkek rat kendi aralarında çiftleştirilmeye bırakıldı. Ratların hamile kalıp kalmadıkları günlük servikal sürüntülerle izlendi ve böylece hamileliklerinin ilk günü belirlendi. Fakat bütün dişi ratların hamile kalmaları sağlanamadı. Hamile kalması sağlanan 12 adet dişi rat, her bir grupta altı adet olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bir gruptaki altı hamile rata, hamileliklerinin üçüncü trimestrının başlangıcından (14. gün) hamileliklerinin son gününe (21. gün) kadar 0,1 mg/kg/gün deksametazon intraperitoneal (IP) yoldan verildi. Diğer gruptaki altı hamile rata ise yine hamileliklerinin üçüncü trimestrının başlangıcından hamileliğinin son gününe kadar 0,1 mg/kg/gün distile su IP yoldan verildi. Böylece ileride kullanılacak esas deneklerin

bir kısmı prenatal dönemde ekzojen steroidlere maruz kalmışken, diğer kısmı ise ekzojen steroidlere maruz kalmamış oldu. Her bir hamile ratın iki ile beş yavru doğurması sonucu toplam 48 adet yavru rat elde edildi. Ekzojen steroid verilmiş olan altı hamile rattan 34 yavru ve distile su verilmiş olan altı hamile rattan ise 14 yavru olmak üzere, toplam 48 yavru doğdu. Bu 48 yavru rattan 20 tanesi çeşitli nedenlerle öldü. Ölen 20 rattan 18 tanesi steroid verilen gruba, iki tanesi ise steroid verilmeyen gruba mensuptu. Geriye ekzojen steroidlere maruz kalmış 16 yavru ve steroidlere maruz kalmamış 12 sağ yavru rat kaldı. Kalan toplam 28 adet yavru ratın 24 tanesi ise esas denek olarak kullanıldı. Ekzojen steroidlere maruz kalmış 16 yavru rat grup 2 (n=8) ve grup 3 (n=8) için, steroidlere maruz kalmamış sekiz yavru ise grup 1 (n=8) için denek olarak kullanıldı. Geri kalan dört adet steroidlere maruz kalmamış rattan bir tanesi kontrol amaçlı elektron mikroskopisi incelemesi için kullanılırken, diğer üç tanesi ise kullanılmadı. Bu yavru denekler üzerinde çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için iki ay beklendi.

DENEKLERİN GRUPLARA AYRILMASI

Yavru deneklerin büyümeleri için iki ay beklendikten sonra, ilk önce denekler ekzojen steroidlere maruz kalanlar ve kalmayanlar olarak iki gruba ayrıldı. Bu süre sonunda deneklere işitme eşiklerinin belirlenmesi için BERA testi uygulandı. BERA ile deneklerin işitme eşiklerinin belirlenmesinden bir hafta sonra, bütün denekler ses izolasyonlu olan bir kafeste dört saat boyunca 110 dB gürültüye maruz bırakıldı. Çalışmada kullanılacak olan 200 mg/kg aminoguanidin gürültüden 30 dakika önce bir doz, gürültü uygulandıktan hemen sonra bir doz ve sonraki takip eden üç gün içinde de her gün birer doz olmak üzere toplam beş doz şeklinde uygulandı. Gürültü uygulanması ve antioksidan ajanların verilmesinden sonra denekler ekzojen steroid ve antioksidan ajanların verilip verilmemesi göz önüne alınarak her bir grupta sekiz rat olmak üzere;

Grup 1: Annelerine IP yoldan 0,1 mg/kg/gün distile su injekte edilen ve kendisine dört saat süresince 110 dB gürültü uygulananlar (n=8),

Grup 2: Annelerine IP yoldan 0,1 mg/kg/gün deksametazon enjekte edilen ve kendisine dört saat süresince 110 dB gürültü uygulananlar (n=8),

Grup 3: Annelerine IP yoldan 0,1 mg/kg/gün deksametazon enjekte edilen, kendisine dört saat süresince 110 dB gürültü uygulanan ve yine IP yoldan 200 mg/kg/gün aminoguanidin verilenler (n=8) şeklinde üç gruba ayrıldı.

DENEKLERE GÜRÜLTÜ UYGULANMASI

Deney hayvanlarına gürültü uygulanması için 1x0,5x0,5 m boyutlarında, üst kapağı açılıp kapanabilen, yan taraflarında havalandırma deliği olan, su ve yiyeceğe rahat ulaşılabilen bir kafes hazırlandı. Ses yansımalarını önlemek için kafesin içerisi strafor köpük ile kaplandı.

Gürültü uygulanması için, Interacoustics Clinical Computer Audiometer Model AC40' ta (Interacoustics Co., Danimarka) üretilen geniş band (800-20000 Hz) gürültü odimetre çıkışıdan direkt bağlantı ile ses kayıt cihazına kayıt edildi. Ses kayıt cihazından elde edilen sesin şiddeti CEL-254 (Lucas CEL Inst. Ltd. Hitchin, Herts, İngiltere) ses seviye ölçeri ve Bruel-Kjaer tip 1613 oktav filtre setiyle 800-20000 Hz'de ölçülen değerlerin ortalaması ile tayin edildi. Ölçümler kafesin farklı noktalarından yapılarak gürültü düzeyi ortalama 110 dB±2 dB olacak şekilde standardize edilerek, dört saat süresince sürekli olarak gürültü uygulandı.

DENEKLERE ANTIOKSİDAN AJANIN (AMİNOGUANİDİN) UYGULANMA BİÇİMİ

Deneklere antioksidan ajan olarak aminoguanidin beş doz şeklinde IP yoldan uygulandı. Uygulama; aminoguanidin sadece grup 3 deneklerine her bir doz 200 mg/kg olacak şekilde gürültüden 30 dakika önce bir doz, gürültü uygulandıktan hemen sonra bir doz ve sonraki takip eden üç gün içinde de birer doz olmak üzere, toplam beş doz verilerek yapıldı.

DENEKLERİN İŞİTME EŞİKLERİNİN BERA TESTİ İLE TESPİTİ

Tüm deneklere gürültüden bir hafta önce, gürültüden 48 saat sonra ve iki ay sonra %2 ksilazin

hidroklörür (Rompun, Bayer, Türkiye) 5 mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) 60 mg/kg kombinasyonu intramusküler (IM) yoldan verilerek anestezi sağlandı. 26-28°C'de sabit tutulan ses izolasyonlu bir odada, Homoth BERA-System 4000 marka BERA cihazı ile tüm deneklerin işitme eşikleri tayin edildi. Yani gürültü uygulanmadan bir hafta önce, gürültü uygulandıktan 48 saat sonra ve gürültü uygulandıktan iki ay sonra olmak üzere, her bir deneğin üç kez BERA ile işitme eşiği tayini yapılmış oldu.

Beyerdynamic DT48 numaralı kulaklık vasıtasıyla deneklere 110-40 dB SPL (sound pressure level) arasında 0,1 ms süreli rarefaksiyon kliği verilerek BERA testi yapıldı. BERA kaydı elde etmek için 1024 uyararla elde edilen cevaplar averajlandı. Elde edilen cevaplarda 32, 16, 8, 4, 2, 1 ve 0,5 kHz'te V. dalgalar işaretlendi. Çalışmamızda dalgalar pozitif ve negatif dalgalar halinde monitörize edildi. Tüm ölçümler sağ ve sol kulak için ayrı ayrı yapıldı ve her bir kayıt iki kez kaydedilerek dalga formlarından emin olunmaya çalışıldı.

HAYVANLARIN KESİLEREK KOKLEA SPESMENLERİ ELDE EDİLMESİ

Denekler dört aylık iken, yani gürültü uygulamasından iki ay sonra BERA testi ile işitme eşiği tayini yapılmasının ardından yüksek dozda ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid verilerek anestezi sağlandı. Verilen anestezi sonrası, giyotin sistemi yardımıyla tek hamlede denekler dekapite edildi. Ardından her bir denek yüzüstü yatırıldı ve deneklerin baş kısımlarının arkasından öne doğru, buruna kadar insizyon yapılarak kafa cildi ikiye ayrıldı. Her iki yanda keskin diseksiyon yapılarak, kafatası ortaya konuldu. Kafatası kemiği ortadan dikkatle kesilerek her iki tarafta timpanik bullalar ortaya konuldu. Timpanik bullada kabarıklık yapan koklea, etraf kemik dokuya zarar verilmeksizin özenle diseke edildi ve en blok olarak çıkarıldı.

Her bir hayvanın çıkarılan kokleaları %2 fosfat tamponlayıcı gluteraldehit içinde saklandı. Elde edilen spesmenler elektron mikroskopik incelemelerinin yapılması için hızla transport edildi.

ELEKTRON MİKROSKOPİSİ İNCELEMESİ İÇİN DOKU HAZIRLANMASI

Alınan doku örnekleri EDTA (10 cc gluteraldehit %25, 70 cc fosfat tampon, 6 g EDTA) ve gluteraldehit çözeltisi içinde dört hafta dekalsifiye edildi. Örnekler yeterince dekalsifiye olduktan sonra %2'lik osmiyum tetroksit ile postfiksasyon yapıldı. Dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi ve rutin elektron mikroskobu doku takibi sonrasında araldite CY212 epoksi resin kit içine gömüldü. Etüv içinde 60°C'de 48 saat polimerize edildi. Elde edilen blokların hepsinden 2 µm kalınlığında kesitler alındı. Korti organına ait kısım dilimlendi ve 70-90 mm kalınlığında kesitler bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat-kurşun sitrat ile kontrastlanarak boyandıktan sonra Jeol JEM 1200 EX elektron mikroskobunda incelenip fotoğrafları çekildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS 15,0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Gürültü öncesi (E1), gürültüden 48 saat sonraki (E2) ve gürültüden iki ay sonraki (E3) dönemlerde BERA ile belirlenen işitme eşiği sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında parametrik olmayan test yöntemlerinden Friedman testi kullanıldı. E1, E2 ve E3 dönemlerindeki grup içi farklılıklar iki yönlü varyans analizi yapılarak ve gruplar arası farklılıklar ise tekrarlı ölçümlerle çift yönlü varyans analizi kullanılarak Post Hoc testiyle değerlendirildi. p değeri < 0,05 ise, sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

BERA TESTİ SONUÇLARI

Gürültü uygulanmadan bir hafta önce yapılan BERA testinde bütün gruplardaki deneklerin işitme eşiklerinin normal düzeylerde olduğu saptandı. Yani annelerine ekzojen deksametazon verilen ve verilmeyen bütün deneklerde 40 dB düzeyinde V. dalgalar elde edilmişti ve deneklerin işitme eşikleri bakımından istatistiksel olarak bir farklılık söz konusu değildi.

GRUP 1'DEKİ BULGULAR

Annelerine distile su verilen ve gürültüye maruz kalan grup olan grup 1'deki sekiz deneğin gürültü

uygulamasından 48 saat sonraki işitme eşiklerinde, gürültü öncesi işitme eşiklerine kıyasla ortalama 13,75 dB geçici eşik yükselmesi olduğu tespit edildi ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca grup 1'deki sekiz deneğin gürültü uygulandıktan iki ay sonraki işitme eşiklerinde, gürültü uygulanmasından 48 saat sonra belirlenen işitme eşiklerine kıyasla ortalama 10 dB eşik düzelmesi olduğu belirlendi ve bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

GRUP 2'DEKİ BULGULAR

Annelerine ekzojen deksametazon verilen ve gürültüye maruz kalan grup olan grup 2'deki sekiz deneğin gürültü uygulamasından 48 saat sonraki işitme eşiklerinde, gürültü öncesi işitme eşiklerine kıyasla ortalama 12,50 dB geçici eşik yükselmesi olduğu tespit edildi ve bu eşikler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca grup 2'teki sekiz deneğin gürültü uygulandıktan iki ay sonraki işitme eşiklerinde, gürültü uygulanmasından 48 saat sonra belirlenen işitme eşiklerine kıyasla ortalama 10 dB eşik düzelmesi olduğu belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$).

GRUP 3'TEKİ BULGULAR

Annelerine ekzojen deksametazon verilen ve gürültüye maruz kalan, ayrıca bir antioksidan ajan olan aminoguanidin zerkedilmiş grup olan grup 3'teki sekiz deneğin gürültü uygulamasından 48 saat sonraki işitme eşiklerinde, gürültü öncesi işitme eşiklerine kıyasla ortalama 15 dB geçici eşik yükselmesi olduğu tespit edildi ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca Grup 3'teki deneklerin gürültü uygulandıktan iki ay sonraki işitme eşiklerinde, gürültü uygulanmasından 48 saat sonra belirlenen işitme eşiklerine kıyasla ortalama 13,75 dB eşik düzelmesi olduğu saptandı. Yani gürültü öncesi eşiklerle gürültüden iki ay sonraki eşiklerinin birbirlerine çok yakın olduğu gözlemlendi. Bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı çıktı ($p<0,05$).

Sonuç olarak, grup 1 ve grup 2 deneklerinde gürültüden 48 saat sonraki işitme eşiği değerleri, gürültü öncesi döneme göre daha kötü çıkmıştı

yani geçici eşik yükselmeleri meydana gelmişti ve bu değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). Benzer şekilde grup 1 ve grup 2'de gürültüden iki ay sonraki işitme eşiği değerleri, gürültüden 48 saat sonraki döneme göre daha iyi (10 dB) çıkmıştı yani eşiklerde düzelme olmuştu ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttu ($p<0,05$). Gürültü uygulamasından 48 saat sonraki dönemde yapılan işitme eşiği ölçümlerinde geçici eşik kaymalarının en fazla aminoguanidin verilen grup 3 deneklerinde olduğu gözlemlendi. Aminoguanidin verilen grup 3 deneklerinin gürültüden iki ay sonraki dönemde yapılan işitme eşiği ölçümlerinde, gürültüden 48 saat sonraki döneme göre gözlemlenen eşik düzelmelerinin (13,75 dB), grup 1 (10 dB) ve grup 2 (10 dB) deneklerine göre 3,75 dB daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 1 ve 2). Fakat yapılan gruplar arası karşılaştırmada bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ortaya çıktı ($p>0,05$). Yani gürültü uygulamasından önce, gürültü uygulandıktan 48 saat sonra ve iki ay sonraki işitme eşiği ölçümlerinin gruplar arası değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Tablo 3). Bu durum, gürültü uygulamasının deneklerin işitme eşiklerinde gürültü uygulamasından 48 saat sonra geçici eşik kaymalarına yol açabileceğini ve iki ay sonra ise eşiklerde düzelme olabileceğini göstermektedir (Şekil 1). Sonuçta, prenatal dönemde ekzojen steroidlere maruz kalınmasının iç kulağı gürültünün etkilerine karşı hassas hale getirmediği ve aminoguanidin verilmesinin koruyucu etkisi olmadığı gözlemlendi.

ELEKTRON MİKROSKOBİSİ BULGULARI

Prenatal dönemde glukokortikoid ve gürültüye maruz kalmayan normal bir ratın kokleasının sağlıklı elektron mikroskopik görüntüsü aşağıda sunulmuştur (Resim 1).

Grup 1: Saçlı hücrelerin ince yapısı incelendiğinde çekirdek normal görünümündedir. Sitoplazmada ise organellerin bir miktar dejenere olduğu ancak mitokondriyonların sağlıklı kaldığı izlenmiştir. Saçlı hücreler arasındaki bağlantı birimleri ise kopmuştur. Altlarındaki destek hücrelerin ise çekirdek ve sitoplazmaları sağlıklı görünümündedir. Saçlı hücre ile destek hücre bağlantısı ise zayıfla-

TABLO 1: E1, E2 ve E3 dönemlerinde BERA ile ölçülen işitme eşikleri ve ortalama değerleri.

| | Grup 1 | | | Grup 2 | | | Grup 3 | | |
|-----------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|------|-------|
| | (E1) | (E2) | (E3) | (E1) | (E2) | (E3) | (E1) | (E2) | (E3) |
| Denek 1 | 40 | 60 | 40 | 40 | 60 | 50 | 40 | 40 | 40 |
| Denek 2 | 40 | 60 | 50 | 40 | 40 | 40 | 40 | 60 | 40 |
| Denek 3 | 40 | 40 | 40 | 40 | 50 | 40 | 40 | 50 | 50 |
| Denek 4 | 40 | 50 | 40 | 40 | 70 | 40 | 40 | 70 | 40 |
| Denek 5 | 40 | 70 | 50 | 40 | 60 | 40 | 40 | 70 | 40 |
| Denek 6 | 40 | 40 | 40 | 40 | 50 | 50 | 40 | 50 | 40 |
| Denek 7 | 40 | 60 | 50 | 40 | 50 | 40 | 40 | 60 | 40 |
| Denek 8 | 40 | 50 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Eşik ort, | 40 | 53,75 | 43,75 | 40 | 52,50 | 42,50 | 40 | 55 | 41,25 |

E1: gürültü uygulanmadan önce BERA ile ölçülen işitme eşiği (dB) değerleri.

E2: gürültü uygulandıktan 48 saat sonraki BERA ile ölçülen işitme eşiği (dB) değerleri.

E3: gürültü uygulandıktan 2 ay sonraki BERA ile ölçülen işitme eşiği (dB) değerleri.

BERA: Beyinsapı uyarlınmış yanıt odyometri.

TABLO 2: E1, E2 ve E3 dönemlerinde her bir grubun kendi içindeki eşik değişimlerinin istatistiksel analizi.

| | E2 ile E1 | E3 ile E1 | E2 ile E3 |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | arasındaki fark | arasındaki fark | arasındaki fark |
| Grup 1 | 13,75±2,86 SD | 3,75±2,86 SD | 10,00±2,86 SD |
| p | 0,001* | 0,413 | 0,009* |
| Grup 2 | 12,50±3,18 SD | 2,5±3,18 SD | 10,00±3,18 SD |
| p | 0,004* | 0,717 | 0,018* |
| Grup 3 | 15,00±3,67 SD | 1,25±3,67 SD | 13,75±3,67 SD |
| p | 0,003* | 0,939 | 0,006* |

* p < 0,05 değeri anlamlı, SD: Standart sapma.

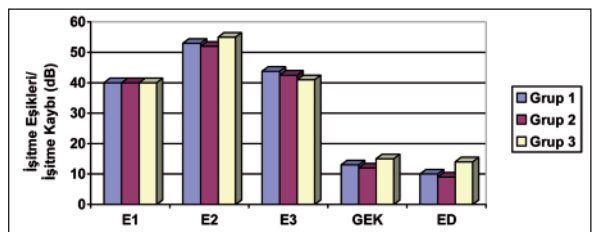
TABLO 3: E1, E2 ve E3 dönemlerinde gruplar arası işitme eşiği değerlerinin istatistiksel analizi.

| | G1 ile G2 | G1 ile G3 | G2 ile G3 |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|
| | arasındaki fark | arasındaki fark | arasındaki fark |
| E1 | 0±0 SD | 0±0 SD | 0±0 SD |
| p | > 0,05* | > 0,05* | > 0,05* |
| E2 | 1,25±4,79 SD | -1,25±4,41 SD | -2,5±4,12 SD |
| p | 0,7* | 0,334* | 0,249* |
| E3 | 1,25±2,95 SD | 2,5±2,5 SD | 1,25±2,27 SD |
| p | 0,267* | 0,482* | 0,604* |

p < 0,05 değeri anlamlı, () İstatistiksel olarak anlamsız, SD: Standart sapma.

mıştır. Apikal kutiküler plakaların (Apical Cuticular Plate, ACP) devamlılığında yer yer kesilme görülmektedir (Resim 2).

Grup 2: Saçlı hücrelerin bazılarında çekirdek normal ve sitoplazmada hafif dejenerasyon izlenirken, bazı saçlı hücrelerde çekirdekte kromatin yoğunlaşması ile başlayan apoptoz dikkati çekmektedir. Saçlı hücreler arasındaki bağlantı komplekslerinde ayrılma belirgindir. Destek hücrelerinin saçlı hücrelerle bağlantı ve ilişkisi kopmuş olarak gözlenmektedir. Destek hücresi sitoplazmasında organelerin tümüyle lizise uğradığı görülmektedir. ACP'de dejenerasyon ve devamlılığında bozulma belirgin olarak dikkati çekmektedir (Resim 3).



ŞEKİL 1: Gürültü öncesi (E1), gürültüden 48 sonraki (E2) ve gürültüden iki ay sonraki (E3) işitme eşikleri ortalama değerleri. Geçici eşik kaybı (GEK): E1 ile E2 arasındaki fark ve eşikte düzelme (ED): E2 ile E3 arasındaki fark. (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

Grup 3: Saçlı hücreler arasındaki bağlantı kompleksleri bütünlüğünü korumaktadır. ACP devamlılığında yer yer bozulma izlenmektedir. Destek hücrelerin saçlı hücrelerle arasındaki bağ-

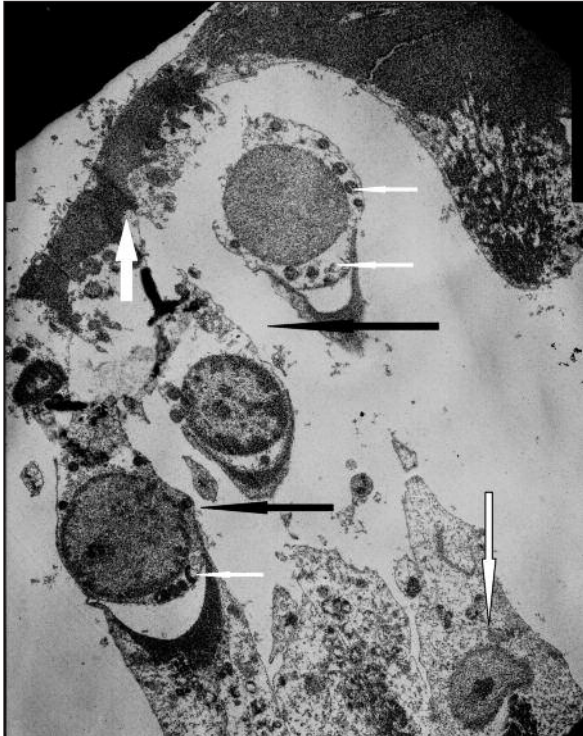
lantılarda kopukluk ve destek hücrelerde bir miktar bozulma vardır (Resim 4).

TARTIŞMA

Fetal çevrede meydana gelen herhangi bir değişiklik (prenatal stres, annenin beslenme durumu, ekzojen ilaçlara maruz kalınması gibi) gelişmekte olan organizmanın gelecekteki yaşamını etkileyebilmektedir. Fakat fetüsün yaşamının idamesi için bazı durumlarda dışarıdan tıbbi müdahale yapılması gerekli olabilir. Örneğin ekzojen olarak glukokortikoidlerin verilmesinin yenidoğanın solunumsal hastalığı, intraventriküler kanama ve yenidoğan ölümü riskini azalttığı gösterilmiştir.^{16,17} Bununla birlikte prenatal dönemde ekzojen glukokortikoid verilmesinin fetüsün ileriki yaşamında bazı sorunlara yol açabileceği de akılda tutulmalıdır. Prenatal dönemde ekzojen glukokortikoid verilmesinin vücut ve beyin gelişimini olumsuz etkilediği ve gelecekte ortaya çıkabilecek birçok hastalıktan sorumlu olabileceğine işaret eden bilimsel çalışmalar bulun-



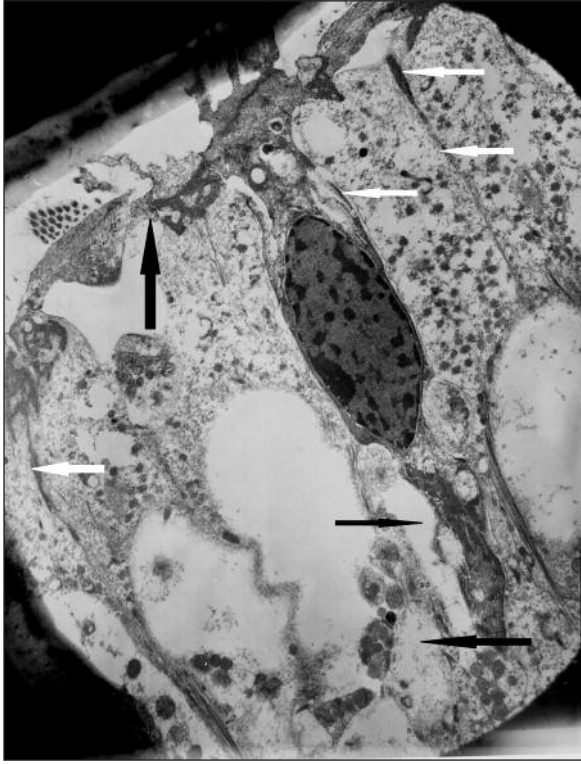
RESİM 1: Saçlı hücreler (siyah yıldızlar) arası bağlantı birimleri (beyaz oklar) sağlıklı. Apikal kutiküler plaka (ACP) (siyah oklar) ve destek hücre (beyaz yıldız) nükleus ve sitoplazması normal. Normal rat (uranyl asetat+kurşun sitrat, orijinal büyüme x 3000).



RESİM 2: Saçlı hücreler arasındaki bağlantı birimlerinin (sola bakan siyah oklar) kopması, sitoplazma organellerinde (sola bakan beyaz oklar) bir miktar dejenerasyon, ACP devamlılığında yer yer kesilme (yukarı bakan beyaz ok) ve destek hücresi (aşağı bakan beyaz ok) (uranyl asetat + kurşun sitrat, orijinal büyüme x 3000).



RESİM 3: Destek hücresinin saçlı hücrelerle bağlantı (siyah yıldız) ve ilişkisinin kopması, destek hücresi sitoplazmasında organellerin tümüyle lizise uğraması (sola bakan siyah ok), saçlı hücreler arasındaki bağlantı komplekslerinde belirgin ayrılma (yukarı bakan siyah ok), ACP'de dejenerasyon ve devamlılığında bozulma (sağa bakan beyaz ok), kromatin yoğunlaşması (yukarı bakan beyaz oklar) (uranyl asetat+kurşun sitrat, orijinal büyüme x3000).



RESİM 4: Saçlı hücreler arası bağlantı komplekslerindeki (sola bakan beyaz oklar) devamlılık, ACP devamlılığında yer yer bozulma (yukarı bakan siyah ok), destek hücrelerinin saçlı hücrelerle arasındaki bağlantılarda kopukluk (sağa bakan siyah ok) ve destek hücrelerde bir miktar bozulma (sola bakan siyah ok) (uranil asetat+kurşun sitrat, orijinal büyütme x3000).

maktadır.^{18,19} Ahlbom ve ark. hamile ratlara üçüncü trimesterde deksametazon vererek yavru ratlardan elde ettikleri hücre kültürlerine hidrojen peroksit (H_2O_2) ve metal civa (MeHg) ekleyip ve deksametazon, H_2O_2 ve MeHg verilen ratların granüler hücrelerindeki apoptotik hücre sayısının kontrol grubundakilerden daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.¹²

Rybalko ve Syka 3-6 aylık ratların gürültüye maruz kalmadan önceki işitme eşiklerinin erişkin ratların eşikleri ile yakın olduğunu ortaya koymuştur.²⁰ Gürültüye maruziyetin tüm yaşlardaki ratlarda benzer değişikliklere yol açtığını ve gürültüden sonraki iki hafta içinde işitme eşiklerinde düzelmelerin başladığını görmüşlerdir.²⁰ Bizim çalışmamızda da tüm gruplardaki ratlarda gürültüden iki ay sonra işitme eşiklerinde düzelme olduğu gözlemlendi. Ancak Hougaard ve ark. ise prenatal dönemde maruz kalınan gerek stresin gerekse deksametazonun işitme

organı üzerine zararlı bir etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır.²¹ Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla uyumlu olmakla birlikte, literatürdeki çoğu çalışmanın sonuçları ile uyumlu değildir.

Stenqvist, *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksini verdiği ratlarda tüm frekanslarda işitme eşiği yükselmeleri meydana geldiğini, ilerleyen zamanlarda düşük frekanslarda tama yakın ve yüksek frekanslarda da kısmi iyileşme olduğunu gözlemlemiştir.²² Kadner ve ark. ise işitme eşikleri üzerine prenatal stresin etkilerini araştırmış ve prenatal stresin düşük frekanslarda işitme kaybına neden olduğunu tespit etmişlerdir.⁷ Canlon ve ark. deksametazon verilen ratlarda gürültü verilme suretiyle oksidatif stres oluşturulmadığı sürece saçlı hücrelerde herhangi bir kayıp oluşmadığı sonucuna varmışlardır.² Çalışmamızda saçlı hücre bağlantılarında kopma, destek hücrelerinin lizisi ve ACP devamlılığının bozulması gibi koklear patolojilere grup 2 deneklerinde (deksametazon verilen), grup 1 deneklerine (deksametazon verilmeyen) göre daha fazla rastlanmıştır.

Gürültü uygulanmasından sonra saçlı hücre stereosilyalarında gevşeme, sarkma oluşması ve stereosilyalar arası bağlantılarda kopma olması gibi bazı değişiklikler meydana gelmektedir.^{23,24} Gao ve ark. orta ve yüksek derecede gürültünün saçlı hücre stereosilyalarında patolojik değişikliklere yol açarak işitme eşiklerini etkilediklerini ileri sürmüşlerdir.²⁵ Sullivan ve Conolly ratlara dört hafta süresince haftada beş kez günde altı saat olmak üzere 110, 100, 95 ve 85 dB gürültü uygulanması sonucu 95, 100 ve 110 dB gürültü uyguladıkları ratlarda dış saçlı hücre kaybı olduğunu ortaya koymuşlardır.²⁶ Çalışmamızda özellikle grup 2 deneklerinde ACP ve saçlı hücre devamlılığında bozulma, destek hücrelerinde lizis ve işitme eşiklerinde yükselme olduğu gözlemlenmiştir.

SOR blokerleri ve membran stabilizatörlerinin kokleada iskemi ve reperfüzyon hasarını önlemede faydalı olduğu bilinmektedir. Seidman ve ark. ratlarda koklear hasar meydana getirmek için 60 saat süresince 90 dB devamlı gürültü uygulamış ve allopurinol ve süperoksit dismutazın hasarı önlemede etkili olup olmadığını araştırmışlardır.¹⁵ Sonuç olarak gürültü verilmesi sonucu kokleada

SOR nedeniyle hasar meydana geldiğini ve sözü geçen ajanların hasarı önlemede kısmen de olsa faydalı olduğunu bulmuşlardır.¹⁵ Bizim çalışmamızda ise aminoguanidinin koklear hasarı kısmen de olsa önlemediğini gözlemledik. Yapılan bir başka çalışmada da dokuda iskemi reperfüzyon hasarının bir antioksidan olan kafeik asit feniletil ester (CAPE) ile azaltılabileceği gösterilmiştir.²⁷ Irmak ve ark., ratlarda 20 dakika boyunca karotid arter oklüzyonu yaparak beyinde iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmuşlar ve 10 µM CAPE and 25 µM alfa-tokoferol verilen deneklerde iyileşme sonuçlarının daha iyi olduğunu görmüşlerdir.²⁸

Kelly ve ark., sislpatinin neden olduğu ototoksitede nitrik oksitin rolünü araştırmak için bir indüklenebilir nitrik asit oksit sentetaz (iNOS) inhibitörü olan aminoguanidinden faydalanmışlardır.²⁹ Deneklere sislpatin verilmeden üç gün önce ve verildikten hemen sonra BERA ile eşik tespiti yapmışlar, koklear dokuda bir nitrik oksit markırı olan malondialdehid düzeylerini çalışmışlar ve normalden yüksek düzeylerde olduğunu saptamışlardır. Ayrıca sislpatin verilen ratlarda eşik yükselmeleri olduğunu, buna karşın aminoguanidin verilenlerde

ise eşik yükselmelerinin daha az olduğunu gözlemlemişlerdir.²⁹ Aydoğan ve ark. ise potansiyel bir antioksidan ve iNOS inhibitörü olan aminoguanidinin SOR oluşumunu önlemek suretiyle cilt flebinin yaşamasına olumlu katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir.³⁰ Çalışmamızda aminoguanidin verilen grup 3 deneklerinde, grup 1 ve grup 2 deneklerinde de gözlemlendiği gibi gürültüden iki ay sonraki dönemde BERA ile yapılan ölçümlerde işitme eşiklerinde düzelmeler olduğu görülmüştür.

SONUÇ

Sonuç olarak, BERA ve elektron mikroskopik inceleme sonuçlarına göre prenatal dönemde ekzojen steroidlere maruz kalınmasının iç kulağı gürültünün etkilerine karşı duyarlı hale getirmede ve aminoguanidin verilmesinin iç kulakta oluşabilecek olası hasarı önlemede koruyucu etkisinin olmadığı görüşündeyiz.

Teşekkür

Finansal desteğinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler (FÜBAP) birimine teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J eds. The Childhood Environment and Adult Disease. 1st ed. Chichester: John Wiley; 1991: p.38-55.
- Canlon B, Erichsen S, Nemlander E, Chen M, Hossain A, Celsi G, et al. Alterations in the intrauterine environment by glucocorticoids modifies the developmental programme of the auditory system. Eur J Neurosci 2003;17(10): 2035-41.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Mac-cari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. J Neurosci 1996;16(12):3943-9.
- Ballard PL. Scientific rationale for the use of antenatal glucocorticoids to promote fetal development. Pediatr Rev 2000;1(5):E83-90.
- Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklöf AC, Ceccatelli S, de Santiago A, et al. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. Pediatr Res 1998;44(3): 317-22.
- Börekçi B, Al RA, Kumtepe Y, Kadanali S. [Effect of impulse noise during pregnancy on birth weight of rats]. J Turk Soc Obstet Gynecol 2008;5(1):46-50.
- Kadner A, Pressimone VJ, Lally BE, Salm AK, Berrebi AS. Low-frequency hearing loss in prenatally stressed rats. Neuroreport 2006; 17(6):635-8.
- Hougaard KS, Andersen MB, Kjaer SL, Hansen AM, Werge T, Lund SP. Prenatal stress may increase vulnerability to life events: comparison with the effects of prenatal dexamethasone. Brain Res Dev Brain Res 2005;159(1):55-63.
- Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic Biol Med 1997;22(1-2):269-85.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell Physiol Biochem 2001;11(4):173-86.
- Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. Am J Med Genet 2001;106(1):62-70.
- Ahlborn E, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S. Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(26):14726-30.
- Seidman MD, Quirk WS, Nuttall AL, Schweitzer VG. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase-polyethylene glycol on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage. Otolaryngol Head Neck Surg 1991;105(3):457-63.
- Seidman MD, Quirk WS. The protective effects of tirilad mesylate (U74006F) on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage. Otolaryngol Head Neck Surg 1991;105(4):511-6.
- Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. Otolaryngol Head Neck Surg 1993;109(6):1052-6.
- Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics 1972;50(4):515-25.

17. Crowley PA. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(1):322-35.
18. Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol* 1999;94(2):213-8.
19. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 2001;13(2):113-28.
20. Rybalko N, Syka J. Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear Res* 2001;155(1-2):32-40.
21. Hougaard KS, Barrenäs ML, Kristiansen GB, Lund SP. No evidence for enhanced noise induced hearing loss after prenatal stress or dexamethasone. *Neurotoxicol Teratol* 2007;29(6):613-21.
22. Stenqvist M. Age-related hearing changes and effects of exotoxin on inner ear function in aging rat. A frequency-specific auditory brainstem response study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000;62(1):13-9.
23. Syka J. Experimental models of sensorineural hearing loss-effects of noise and ototoxic drugs on hearing. *Progress in Sensory Physiology*. Vol. 9. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1989: p.97-170.
24. Lim DJ. Cochlear anatomy related to cochlear micromechanics. A review. *J Acoust Soc Am* 1980;67(5):1686-95.
25. Gao WY, Ding DL, Zheng XY, Ruan FM, Liu YJ. A comparison of changes in the stereocilia between temporary and permanent hearing losses in acoustic trauma. *Hear Res* 1992;62(1):27-41.
26. Sullivan MJ, Conolly RB. Dose-response hearing loss for white noise in the Sprague-Dawley rat. *Fundam Appl Toxicol* 1988;10(1):109-13.
27. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yağmurca M, Ozyurt H, Karaman A, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. *Urol Res* 2001; 29 (3):190-3.
28. Irmak MK, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct* 2003;21(3):283-9.
29. Kelly TC, Whitworth CA, Husain K, Rybak LP. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 2003;186(1-2):10-6.
30. Aydoğan H, Gürlek A, Parlakpınar H, Aydoğan N, Acet A. [The protective effect of aminoguanidine on random pattern skin flap survival: an experimental study in rats]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27(1):36-43.