

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

KULAK ÇINLAMASI (TİNNİTUS) OLUŞTURULMUŞ
RATLARIN KOKLEAR ÇEKİRDEKLERİNDE BAZI İYON
KANALI EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Yasemin ÜSTÜNDAĞ

2013

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Sadık YILMAZ

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gürsel DİNÇ



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Sadık YILMAZ (Başkan)



Prof.Dr. Gürsel DİNÇ (Danışman)



Prof.Dr. Hasan ALPAK



Prof.Dr. Z. Ender ÖZKAN



Prof.Dr. Yesari ERÖKSÜZ



TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımın en son ve en zorlu dđnemi olan doktora sşrecimde başta; danışmanlığımı ũstlenen, fikirlerime gđnřlden destek veren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Gşrsel DİNÇ ve laboratuvarını ve bilgi birikimlerini benimle paylaşan çok değerli ikinci danışman hocam Prof. Dr. Ramazan BAL olmak ũzere değerli meslek břyřđđm ve hocam Prof. Dr. Sadık YILMAZ ve Prof. Dr. Yesari ERŐKSŐZ hocama sonsuz şşkranlarımı sunarım.

Ayrıca hayvan davranış testinde değerli vaktini benimle paylaşan Arş. Gđr. Dr. Ersoy BAYDAR'a, dokularımın alım aşamasında gerekli olan sıvı azot teminini sağlayan Prof. Dr. Seyfettin GÖR ve Arş. Gđr. şeyma ŐZER KAYA'ya, tezimin molekşler aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ebru ŐNALAN'a, istatistiksel analizimin değerlendirilmesinde bşyşk katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Murad GŐRSES'e teşekkşrş bir borç bilirim.

Bu zorlu sşrecin her aşamasında benimle birlikte olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım; Osman Yasir KOYUN, Funda BULUT ve Sibel BARATA'ya teşekkşr etmekten mutluluk duyarım.

Son olarak, sonsuz teşekkşrşn bile değersiz kaldığı sevgili kardeşim Elif ŐSTŐNDAĐ, annem Hatice ŐSTŐNDAĐ ve babam Hşsnş ŐSTŐNDAĐ'a minnettarlığımı sunmaktan onur duyarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Hayvanlarda Deneysel Kulak Çınlaması Modelleri	8
3.1.1. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlaması (NT) Modeli	8
3.1.2. Sodyum Salisilat ile Oluşturulan Kulak Çınlaması (SAT) Modeli.....	10
3.2. Hayvan Davranış Testleri	12
3.2.1. Jastreboff'un Koşullandırılmış Baskılama Yöntemi:	13
3.2.2. Bauer ve Brozski'nin Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi:	13
3.2.3. Rüttiger'in Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi.....	14
3.2.4. Guitton'un Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi.....	14
3.2.5. Guitton'un T- Su Labirenti Yöntemi.....	15
3.2.6. Lobarinas'ın Planlı Oluşturulmuş Polidipsiadan Kaçınma Yöntemi ...	15
3.2.7. Turner'ın Sıçrama Refleksini Baskılama Yöntemi.....	16
3.2.8. Heffner'in Sesin Yerini Belirleme Yöntemi.....	16
3.3. İşitme Sistemi.....	17

3.3.1. Auris İnterna (İç Kulak)	17
3.3.1.2. Cochlea.....	18
3.3.1.2.1. Reissner Membranı.....	19
3.3.1.2.2. Basilar Membran	20
3.3.1.2.3. Tectorial Membran	20
3.3.1.2.4. Spiral Limbus	21
3.3.1.2.5. Spiral Ligament	21
3.3.1.2.6. Stria Vascularis	21
3.3.1.2.7. Spiral Prominence	21
3.3.1.2.8. External Sulcus.....	21
3.3.1.2.9. Corti Organı	22
3.3.1.2.9.1. Destek Hücreleri	22
3.3.1.2.9.1.1. Hensen Hücreleri.....	22
3.3.1.2.9.1.2. Deiters Hücreleri	23
3.3.1.2.9.1.3. Sütun Hücreleri	23
3.3.1.2.9.1.4. Phalangeal Hücreler.....	23
3.3.1.2.9.2. Duyusal Hücreler	23
3.3.1.2.9.2.1. Stereocilia	23
3.3.1.2.9.2.2. Dış Tüy Hücreleri.....	24
3.3.1.2.9.2.3. İç Tüy Hücreleri	25
3.3.1.2.9.3. İç Sulcus	25
3.3.1.2.9.4. Spiral Limbus	25
3.3.1.2.9.5. Spiral Ganglion.....	25
3.4. Tüy Hücrelerinin Transdüksiyonu	26

3.5. Merkezi İşitme Sistemi	28
3.5.1. Nucleus Cochlearis (CN).....	29
3.5.1.1. Nucleus Cochlearis Dorsalis (DCN).....	30
3.5.1.2. Nucleus Cochlearis Ventralis (VCN)	32
3.5.2. Nucleus cochlearis'in uzantıları.....	34
3.5.3. Superior Olivary Kompleks (SOC).....	36
3.5.4. Lemniscus Lateralis (LL)	37
3.5.5. Colliculus Inferioris (IC)	37
3.5.6. Colliculus Superioris (SC).....	38
3.5.7. Corpus Geniculatum'un Medial Nucleus'u (MGN)	38
3.5.8. İşitme Cortexi	39
3.5.9. Descendens İşitme Yolakları	39
3.6. İyon Kanalları.....	41
3.6.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	42
3.6.1.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (Na _v).....	42
3.6.1.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (Ca _v)	43
3.6.1.3. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (K _v)	43
3.6.1.4. Hiperpolarizasyonla Etkinleştirilmiş Siklik Nükleotid Kapılı Kasyon Kanalları (HCN)	44
3.6.2. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları.....	45
3.6.2.1. TRPM Kanalları	45
4. GEREÇ VE YÖNTEM	49
4.1. Gereç.....	49
4.2. Yöntem.....	49

4.2.1. Deneklerin Gruplandırılması	49
4.2.2. Davranış Testinin Uygulanması.....	50
4.2.3. Deneklere Aşırı Gürültü Uygulanması.....	53
4.2.4. Deneklere Sodyum Salisilat Uygulanması	54
4.2.5. Dokuların Alınması.....	54
4.2.5.1. İntrakardiyak Perfüzyonun Uygulanması	56
4.2.6. Floresan İmmunohistokimya Tekniği	56
4.2.6.1. Kesitlerin Alınması.....	56
4.2.6.2. Bloklama	57
4.2.6.3. Primer Antikor Uygulaması	57
4.2.6.4. Sekonder Antikor Uygulaması	58
4.2.6.5. Doku Kesitlerin İncelenmesi	59
4.2.6.6. Floresan İmmunohistokimya Analizi.....	59
4.2.6.7. Floresan İmmunohistokimya Analizi İçin Kullanılan Solüsyonlar:	60
4.2.6.7.1. Saline Phosphate Buffer (PBS) Solüsyonu	60
4.2.6.7.2. Fosfat Buffer Solüsyonu	60
4.2.6.7.3. %4 Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu	60
4.2.6.7.4. %30'luk Sucrose	61
4.2.6.7.5. Bloklama Solüsyonu.....	61
4.2.6.7.6. Primer Antikor Sulandırma Solüsyonu	61
4.2.6.7.7. Sekonder Antikor Sulandırma Solüsyonu	61
4.2.7. Gerçek Zamanlı PZR Analizi	62
4.2.7.1. Dokuların Homojenizasyonu.....	62

4.2.7.2. RNA İzolasyonu	62
4.2.7.3. RNA Miktarının Ölçülmesi	64
4.2.7.4. cDNA Oluşturulması	64
4.2.7.5. Gerçek Zamanlı PZR 'ın Oluşturulması	65
5.BULGULAR.....	68
5.1. Hayvan Davranış Testi Sonuçları.....	68
5.2. Gerçek Zamanlı PZR Bulguları.....	71
5.3. Floresan İmmunohistokimya Analizi	77
6. TARTIŞMA.....	88
6.1. Kulak Çınlamasının Nüfusla İlişkisi.....	88
6.2.Hayvan Davranış Testinin Değerlendirilmesi.....	89
6.3. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının İyon Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	91
6.3.1. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Potasyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	94
6.3.2. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi	96
6.3.3. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi	97
6.3.4. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının HCN Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	98
6.3.5. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının TRPM Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	100

6.4. Farmakolojik Olarak Oluşturulan Kulak ınlama Modellerinin Karşılaştırılması	101
6.5. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının Değerlendirilmesi ..	102
6.6. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının İyon Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	106
6.6.1. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	107
6.6.2. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi	108
6.6.3. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının Voltaj Kapılı Potasyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	109
6.6.4. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının HCN Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	109
6.6.5. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlamasının TRPM Kanallarına Göre Değerlendirilmesi.....	110
6.7. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak çınlaması ile İlaçla Oluşturulan Kulak ınlamasının Karşılaştırılması:	112
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
7.KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ	130

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Her analiz ve grup için kullanılan rat sayısı.....	50
Tablo 2. Günlere göre hayvanların ağırlık ve % ağırlık azalışı	68
Tablo 3. Kulak çınlamasından sonra elde edilen baskılanma oranları	69
Tablo 4. NT Grubunun Tanımlayıcı İstatistiği	70
Tablo 5. SAT Grubunun Tanımlayıcı İstatistiği	70
Tablo 6. Elde edilen RNA miktarları (mg/ml).....	71
Tablo 7. RNA havuzu oluşturulması için kullanılan RNA ve su miktarları (µl)...	72
Tablo 8. HCN kanalları	73
Tablo 9. Sodyum Kanalları	74
Tablo 10. Potasyum Kanalları.....	75
Tablo 11. TRPM kanalları.....	75
Tablo 12. Kalsiyum Kanalları.....	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kulak Çınlaması Oluşturulduktan Sonra Elde Edilen Hayvan Davranış Testi Sonuçları	70
Şekil 2.	Çalışmada incelenen bütün iyon kanalı ekspresyonlarının azalış grafiği	77
Şekil 3.	HCN1 iyon kanalının 40x büyütme fotoğrafı	78
Şekil 4.	HCN1 iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu.....	79
Şekil 5.	HCN₂ iyon kanalının 40x büyütme fotoğrafı.....	80
Şekil 6.	HCN ₂ iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu.....	81
Şekil 7.	HCN ₄ iyon kanalının 40x büyütme fotoğrafı	82
Şekil 8.	HCN ₄ iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu.....	83
Şekil 9.	Erg 3 iyon kanalının 40x büyütme fotoğrafı	84
Şekil 10.	Erg 3 iyon kanallarının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu.....	85
Şekil 11.	Erg 1-2-3 iyon kanallarının 40x büyütme fotoğrafı.....	86
Şekil 12.	Erg 1-2-3 iyon kanallarının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu.....	87

KISALTMALAR

A1	: Birincil işitme cortex'i
A2	: İkincil işitme cortex'i
ADPR	: Adenozin 5'-difosforiboz
aVCN	: Anterior nucleus cochlearis ventralis
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotropik faktör
Ca_v	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
CACNA1B	: Cav2.2 kanalının geni
Calb1	: Calbindin
cDNA	: Komplementer DNA
CIC	: Colliculus inferioris'in merkezi çekirdeği
CN	: Nucleus cochlearis
CT	: Siklus eşiği
CTCF	: Düzeltilmiş toplam alan floresanı
dB	: Desibel
DCN	: Nucleus cochlearis dorsalis
DMPO	: Corpus trapezoideum'un dorsomedial periolivar nucleus'u
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNLL	: Lemniscus lateralis'in dorsal nucleus'u
EMEA	: European Medicines Agency
FDA	: Food and Drug Administration
GABA	: Gamma amino bütirik asit
GAD-67	: Glutamate decarboxylase
GAP-43	: Growth Associated Protein 43

GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HCN	: Hiperpolarizasyonla etkinleştirilmiş siklik nükleotid kapılı katyon kanalı
IC	: Colliculus inferioris
IM	: Intra muskuler
INLL	: Lemniscus lateralis'in intermedier nucleus'u
Kcnh2	: Erg 1 kanalının geni
Kcnh7	: Erg 3 kanalının geni
kHz	: Kilo Hertz
K_v	: Voltaj kapılı potasyum kanalı
LL	: Lemniscus Lateralis
LNTB	: Corpus trapezoideum'un lateral nucleus'u
LSO	: Nucleus olivaris superioris lateralis
mA	: Mili amper
MGN	: Corpus geniculatum'un medial nucleus'u
mM	: Mili molar
MNTB	: Corpus trapezoideum'un medial nucleus'u
MSO	: Nucleus olivaris superioris medialis
mV	: Mili volt
Na_v	: Voltaj kapılı sodyum kanalı
NMDA	: N-Methyl-D-aspartic acid
NOS	: Reaktif nitrojen türleri
NT	: Aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması
PBS	: Saline Phosphate Buffer

PFA	: Paraformaldehit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pVCN	: Posterior nucleus cochlearis ventralis
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNA	: Ribonükleik Asit
SAT	: Sodyum salisilat ile oluşturulan kulak çınlaması
SC	: Subcutan
SC	: Colliculus superioris
SCN1A	: Nav1.1 kanalının geni
SCN2A1	: Nav1.2 kanalının geni
SCN3A	: Nav1.3 kanalının geni
SIPAC	: Schedule-Induced-Polydipsia Conditioning
SOC	: Nucleus olivaris dorsalis
SPL	: Sound pressure level
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TRP	: Transient Receptor Potential Kanalı
TRPA	: Ankyrin reseptör bağlantılı TRP kanalı
TRPC	: Konik TRP kanalı
TRPM	: Melastatin reseptör bağlantılı TRP kanalı
TRPP	: Polycystin reseptör bağlantılı TRP kanalı
TRPV	: Vanilloid reseptör bağlantılı TRP kanalı
TRPML:	Mucolipin reseptör bağlantılı TRP kanalı
VCN	: Nucleus cochlearis ventralis
VNLL	: Lemniscus lateralis'in ventral nucleus'u

1. ÖZET

Kulak çınlaması, dış kaynaklı sesin yokluğunda hayali ve değişik nitelikteki seslerin işitsel olarak algılanmasıdır. Populasyonun kabaca % 10-15'ini etkiler ve bu oranın yaklaşık %20'si hayat kalitesinin olumsuz etkilenmesinden dolayı tıbbi yardıma ihtiyaç duyar. Ancak bu rahatsızlığın oluşum mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma, sodyum salisilatla ve aşırı gürültü oluşturulan rat kulak çınlaması modelinde bazı (Ca_v , HCN, Na_v , K_v , TRPM) iyon kanalı ekspresyonlarının incelenmesi amacıyla yapıldı.

Deneyde 48 tane 4 aylık erkek Wistar Albino rat (195-330 gr) kullanıldı. Ratlar floresan immunohistokimya analizi yapılacak olanlar ve Gerçek Zamanlı PZR analizi yapılacak olanlar olmak üzere (n=24) iki gruba ayrıldı. Daha sonra bu iki grup da kendi içinde sodyum salisilatla kulak çınlaması oluşturulacak grup (SAT), aşırı gürültüyle kulak çınlaması oluşturulacak grup (NT) ve kontrol grubu olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Kulak çınlaması oluşturulduktan sonra, koklear çekirdek dokuları toplanarak analizler gerçekleştirildi.

Deney grupları kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında HCN1, HCN2, HCN4, SCN1A, SCN2A1, SCN3A, TRPM2, TRPM7, KCNH2, KCNH7, CACNA1B mRNA'larının ($p < 0,05$) istatistiksel olarak azaldığı bulundu. Ayrıca HCN1, HCN2, HCN4, Erg1-2-3 ve Erg3 iyon kanalları için yapılan floresan immunohistokimya analizinde deney gruplarından elde edilen düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunlukları kontrol grubundan elde edilenlerden daha az ölçüldü.

Sonuç olarak, aşırı gürültüyle ve sodyum salisilatla oluşturulan kulak çınlaması oluşturulmuş ratların koklear çekirdek dokusunda bazı iyon kanalı

ekspresyonun baskılandığı gözlemlenmiştir. Ancak bu değişimin oluşum mekanizmasındaki yerinin belirlenmesi için işitme yolağındaki tüm iyon kanalı ekspresyon değişimlerinin bir bütün olarak incelenmesi gerektiği düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gerçek Zamanlı PZR, immunohistokimya, iyon kanalı, kulak çınlaması, sodyum salisilat.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME ION CHANNEL EXPRESSIONS IN COCHLEAR NUCLEUS OF TINNITUS INDUCED RATS

Tinnitus is the perception of various phantom sounds without an external sound source. Roughly, 10-15% of general population is affected by this condition and approximately 20% of this ratio require medical attention due to negative effects on quality of daily life. However, formation mechanism of this condition has not been completely understood yet. The aim of this performed study was to investigate expressions of some ion channels (Ca_v , HCN, Na_v , K_v , TRPM) in rat noise induced and sodium salicylate induced tinnitus model.

Fourty eight, four-month-old male Wistar Albino rats (195-330 gr) were used. The rats were divided into two groups (n=24) according to analysis, Real Time PCR or flourescent immunohistochemistry. Subsequently, these two groups were divided into three sub-groups as noise induced tinnitus group (NT), sodium salicylate induced tinnitus group (SAT) and control group. After tinnitus was induced, cochlear nucleus tissues were collected and analysis was performed.

As compared to control groups values, it was observed that mRNAs of HCN1, HCN2, HCN4, SCN1A, SCN2A1, SCN3A, TRPM2, TRPM7, KCNH2, KCNH7, CACNA1B statistically ($p < 0,05$) decreased. However, in flourescent immunohistochemistry analysis made for HCN1, HCN2, HCN4, Erg1-2-3 and Erg3 ion channels, corrected total cell fluorescence obtained from experimental groups were measured less than control groups.

Consequently, it was observed that some ion channel expressions were inhibited in cochlear nucleus tissue of rats in noise induced and sodium salicylate induced tinnitus. However, in order to determine where these changes play role in formation mechanism, all expressional changes about ion channels are believed to be examined as a whole.

Key Words: Immunohistochemistry, ion channel, Real Time PCR, sodium salicylate, tinnitus.

3. GİRİŞ

Kulak çınlaması, dış kaynaklı sesin yokluğunda, periferel ya da merkezi sinir sisteminden başlangıç alan, hayali ve değişik nitelikteki (ısıklık sesi, vızıltı, uğultu, gürültü gibi) seslerin işitsel olarak algılanmasıdır (1-5).

Algılanan bu hayali sesler, bir hastalıktan ziyade işitme yolağındaki bir anormalliğın semptomudur. Şiddeti, yoğunluğu, gürlüğü, sıklığı değişkendir ve araştırılması güçtür. Aralıklı formdan sürekli bir forma kadar uzananabilir. Etki aralığı azdan çoğa doğru gider. Populasyonun kabaca % 10-15'ini etkiler ve bu oranın yaklaşık %20'si hayat kalitesinin olumsuz etkilenmesinden dolayı tıbbi yardıma ihtiyaç duyar. Çünkü özellikle sesiz ortamlarda gelişir ve oldukça rahatsız edici bir durumdur (1-5). Uyuyabilme yeteneğini, konsantrasyonu ve dolaylı olarak bireyin duygusal refahını derinden etkiler. Tüm bu olumsuz etkiler, dinlenme, sosyalleşme gibi temel yaşamsal fonksiyonlarını engeller. Özellikle şiddetli vakalarda uzamsal öğrenme, zihinsel çalışma, işe konsantre olma ve dikkat etme yeteneği kısıtlanır. Bunun sonucunda depresyon, intihara eğilim, anksiyete, sinir bozukluğu, insomnia gibi psikolojik rahatsızlıklar meydana gelebilir (6-10). Sürekli kulak çınlaması, kontrol kaybıyla birlikte problemin daha güçleşmesine ve bireyde gittikçe artan bir stres döngüsüne neden olan bir korkuya yol açar (11).

Kulak çınlamasının nedenlerinin bilinmemesine rağmen birçok kulak çınlaması çeşidi bildirilmiştir ve çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Çınlama akut (günler veya haftalar süren) veya kronik (6 aydan uzun süren) olabilir. Sınıflandırma etiyojisine göre işitme sisteminin içinde (koklear) ya da dışında

(ekstrakoklear) veya subjektif ya da objektif olarak tanımlanabilir. Bu ayırım bakım ve tedavi açısından önemlidir (4, 5, 12,13).

En yaygın kulak çınlaması, subjektif olarak sınıflandırılabilir. Subjektif kulak çınlaması, dışarıdan her hangi bir uyarımın olmadığı bir durumda yalnızca birey tarafından hayali seslerin algılanmasıdır. Değişik derecelerdeki yoğunluklarda oluşabilir. Nedeni bilinmeyen bir işitme kaybıyla birlikte meydana gelebilir. Bu çeşit çınlama duyuşal-algısal özelliklerine göre tanımlanabilmesine rağmen, akustik özelliklere sahip değildir. Bu sebepten dolayı ölçülemez ya da ses basıncı cihazlarıyla belirlenemez (4, 5, 12, 13).

Objektif kulak çınlamasına göre daha az yaygın olan objektif kulak çınlaması vücut içerisindeki akustik bir kaynak tarafından oluşturulur, örneğin: temporomandibular eklem anormallikleri, vasküler anormallikleri, arter pulzasyonları, merkezi işitme sisteminin anormal fonksiyon göstermesi, tensor tympani kasının spasmı, östaki borusu yoluyla alınan patolojik hava akımı. Duyulan sesler somatosensorik seslerdir ve bireyin kulağına yakın olarak duyulabilir. Birey bu sesleri kafanın içinden (tinnitus cerebri) ya da kulağın içinden (tinnitus aurium) algılayabilir. Bu çeşit çınlama akustik özelliklere sahip olduğundan ölçülebilir (4, 5, 12, 13). Ayrıca kulak çınlamasının merkezi nöropatik ağrılarla benzerliği vardır, bunun yanı sıra sıklıkla vestibular Schwannoma'nın ilk belirtisidir (14).

En önemli nedenlerinin yaşlanma, işitme kaybı ve aşırı gürültüye maruz kalma olmasının yanında dış, orta ve iç kulağı ya da işitme sinirini içine alan hemen her hastalık çınlamanın nedeni olabilir. Ancak herhangi bir kulaksal patolojinin olmadığı durumlarda da çınlama bildirilmiştir (15, 16).

Akut durumlar enfeksiyon, ilaç tedavisi, kafa veya boyun yaralanmaları, kulak kiri, kan basıncındaki veya metabolizmadaki değişiklikler tarafından gelişebilir. Kronik durumlar, sensoröral (iletimsel) işitme kaybı sonucunda oluşur. İletimsel işitme kaybı ise, dış ya da orta kulakta sesin iletilme kabiliyetini düşüren; kolestatoma, orta kulak efüzyonu, kulak zarı defektleri, otoskleroza da kapsayan kemiksel anormallikler, iç kulak ya da beyine giden yolaktaki hasarlar, vestibulocochlear sinirin fonksiyon bozukluğu gibi nedenlerden köken alır. Kulak çınlaması; Me´nie`re hastalığı, akustik nöroma, mikrovasküler kompresyon sendromu gibi işitme siniri hasarları, viral enfeksiyonlarla ilişkili olabilir, hemifacial spazmın komplikasyonu olabilir, özellikle aminoglikozid grubu antibiyoklerin, diüretiklerin, kinin gibi antimalaryal ilaçların, salisilat gibi nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların, cisplatin, vincristine gibi kemoterapi ilaçlarının kullanımı çınlamaya neden olabilir. Tüm bunların dışında metabolik hastalıklardan hipertiroidizm, hipotiroidizm, anemi, hiperinsülinemi, temporomandibular eklem bozuklukları ve nadiren nörolojik hastalıklarda da kulak çınlamasının oluştuğu bildirilmiştir (5, 17-25).

Wegel gibi bazı araştırmacıların, kulak çınlamasıyla dış tonların benzer etkileşimlerde bulduklarını bulmalarına rağmen, şimdilerde bu olayın sadece kulağın kendisinin fiziksel sesler ürettiği durumlarda oluştuğuna inanılmaktadır (26-28). Çünkü kulağın sadece basit bir alıcı olmadığı kendi kendine ses üretebildiği saptanmıştır (29).

3.1. Hayvanlarda Deneysel Kulak ınlaması Modelleri

İnsanlarda kulak çınlamasının varlığının ve varlığı durumunda karakteristiğinin belirlenmesi zor değildir. Bu amaçla gürültü ya da salisilatla oluşturulmuş deneysel çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalar kulak çınlamasının genel karakteristiğinin belirlenmesi ve vücuttaki seslerle ilişkisinin araştırılması için önemlidir (29). Fakat kulak çınlamasının fizyolojik temellerinin araştırılması ve potansiyel tedavi denemeleri için deneysel çalışmalar yapmak üzere hayvan modellerinin kullanımı zorunludur. Ancak hayvanlarda kulak çınlamasının varlığının belirlenmesi çok basit değildir. Bu amaçla başta Jastreboff olmak üzere birçok araştırmacı gürültüyle ya da salisilatla kulak çınlaması oluşturmadan önce, hayvanları bir hayvan davranış testine tabii tutmuş ve bu testin uygunluğunu araştırmıştır(28, 30-32). Bu hayvan modelleri, deneklerde standart şartlandırma tekniklerinin uygulanması ve bu teknikler uygulanırken deneklerin standart şartlandırma kafesindeki davranışlarının gözlemlerine dayanmaktadır (33).

Hayvanlarda da insanlarda olduğu gibi iki şekilde kulak çınlaması meydana getirilir:

- 1) Aşırı gürültüye maruz bırakma
- 2) Sodyum salisilat (veya quinine) uygulaması.

3.1.1. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak ınlaması (NT) Modeli

Gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması modelinde denekler yüksek sese maruz bırakılarak akustik travma oluşturulur. Gürültüye maruz bırakılmanın kulak çınlaması oluşturduğu değişik hayvan modelleriyle kanıtlanmıştır. (34-36).

Bu modelde denekler öncelikle sesli ortam ile sessiz ortamın ayırımını yapabilmesi için SIPAC (Schedule-Induced-Polydipsia Conditioning) gibi bir davranış testi için eğitilir. Denekler eğitimin sonunda anesteziye alınır ve tek kulaktan olmak üzere olarak 2-3 saat süreyle 6-12 kHz aralığında 120 dB'lik dar bantlı gürültüye maruz bırakılır. Gürültünün tek kulaktan verilmesinin nedeni, gürültüye maruz bırakılan kulakta çınlamayı başlatmak ve diğer kulakta normal işitmenin devamını sağlamaktır (37, 38).

Tek taraflı gürültü uygulamasıyla oluşan kulak çınlaması kalıcı olmaktadır. Kulak çınlmasının birçok nedeni olmasına rağmen en çok rastlanılan türü aşırı gürültüyle oluşan akustik travmadır (39-41). Yoğun seslere maruz kalmanın işitme kaybına ve kulak çınlamasına yol açtığı uzun süredir bilinmektedir (38, 42). Gürültüyle oluşturulan işitme kaybının tüy hücrelerinin kaybı ya da stereocilia hasarı gibi koklear patolojilerle ilişkilendirilebilmesine rağmen kulak çınlmasının yapısal değişikliklerle ilgisi tam olarak belirlenememiştir (43, 44).

Bu açıdan geçen on yıl içinde gürültüyle oluşturulan kulak çınlmasının patofizyolojisinin aydınlatılması için önemli sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların geniş oranında periferik işitme sisteminde meydana gelen hasarın merkezi sinir sisteminde plastik organizasyonun değişimini tetiklediği ve nöral hiperaktiviteyle sonuçlandığı gözlemlenmiştir (45-48) .

Beyindeki plastik değişiklikler artan ateşleme oranının artışıyla gösterilmiştir. Örneğin, 4-15 kHz 80-127 dB SPL gibi saf tonları içeren değişik parametrelerdeki gürültüye 20 dakikadan 4 saate kadar maruz bırakılmanın birincil işitme cortex'indeki ateşleme oranında ani bir artışa neden olduğu (49-51)

ayrıca nucleus cochlearis dorsalis'te ve colliculus inferior'te gecikmiş hiperaktivite başlangıcı oluşturduğu bildirilmiştir (34, 36, 52, 53-56). Gürültüye maruz kalma işitme sinirinde, DCN'de ve IC'de artan uyarılma aktivitesine de ışık tutar (57-59). Bununla birlikte akustik travma tarafından oluşturulan uyarılabilirliğin moleküler mekanizması henüz tam detaylandırılmadığı için moleküler çalışmalar devam etmektedir. Örneğin Tan ve arkadaşları, saf gürültüye bilateal maruz bırakılan ve 6 gün sonra kulak çınlaması olduğu kanıtlanan ratların inferior colliculus'larında, beyin kaynaklı nörotropik faktörün (BDNF) ekspresyonunda ve GABA immunopozitif sinyallerinde artış olduğunu belirtirken Sun ve arkadaşları ratlarda tek taraflı oluşturdukları kulak çınlamasının işitme cortex'indeki ısı şok protein ekspresyonunun arttığını gözlemlemiştir (60, 61).

3.1.2. Sodyum Salisilat ile Oluşturulan Kulak Çınlaması (SAT) Modeli

Bu modelde sodyum salisilatın yüksek dozda tek ya da düşük dozda tekrarlı kullanımı söz konusudur (62). Bilindiği üzere sodyum salisilat, analjezik ve antiinflamatuvar olarak kullanılan aspirinin etken maddesidir ve özellikle tekrarlı dozlarının kulak çınlaması oluşturduğu bilinmektedir (63, 64).

Jastreboff ve arkadaşları tarafından geliştirilen modelde de deney hayvanlarına 350mg/kg dozda sodyum salisilat arka arkaya iki gün intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde kulak çınlaması geliştiği belirtilmiştir. Ayrıca intraperitoneal enjeksiyondan 2-4 saat sonra sodyum salisilatın kandaki konsantrasyonunun en yüksek değere ulaştığı ve enjeksiyondan 8-15 saat sonra konsantrasyonun yarı değere indiği gözlemlenmiştir (65, 66). Aynı şekilde sodyum salisilat konsantrasyonunun cerebrospinal sıvı ve iç kulağın perilenfide

kandakine benzer bir zamanlamayla yükseldiği ancak bu konsantrasyonun kandakinden daha düşük seviyelerde olduğu ölçülmüştür. Kulak çınlamasının da perilenfteki salisilat konsantrasyonunun yükselmeye başladığı zamanlamaya paralel olarak geliştiği görülmüştür(67,68). Yani enjeksiyonundan yaklaşık bir- iki saat sonra salisilatın kan beyin engelini aşarak serebrospinal sıvıda 1-2 mM konsantrasyona ulaştığı, yaklaşık üç saat bu yüksek seviyede kaldığı ve dördüncü saatin sonunda 1mM düzeye düştüğü söylenebilir (69-71).

Cerebrospinal sıvıdaki salisilat konsantrasyonu 1 mM düzeyinde olması halinde kulak çınlaması geliştiği bilinmektedir. Kulak çınlamasının tınısı açısından benzemektedir (65, 66, 68, 72).

İnsanlarda salisilatla indüklenen kulak çınlamasının tınısı her olguda yüksek frekans aralığındadır. Ratlarda da insanlardaki gibi salisilatla indüklenen kulak çınlamasının frekansının tonal algılanması 10-16 kHz (66, 73, 74) veya 7-9 kHz olduğu rapor edilmiştir (75).

Salisilat; işitme sistemi ile hem cochleada hem de merkezi sinir sisteminde olmak üzere bir çok yolla etkileşimde bulunur. Etkilerinin ilk önce cochlea seviyesinde dış tüy hücrelerinin elektriksel ve mekanik özelliklerini değiştirerek gösterdiği bilinmektedir (62, 76-79). Cochlea'da ilk önce dış tüy hücrelerinin duvarında bulunan ve elektromotilitenin moleküler motoru olarak görev yapan prestinin ekspresyonunu azaltır dolayısıyla sinirsel girdiler azalarak bir işitme kaybı oluşur (62, 80-84).

Ancak Huang ve arkadaşları uzun süreli salisilat kullanımının bu etkiyi tersine çevirdiğini bildirmişlerdir (85). Ruel ve arkadaşları ise cochlear kesitlere iyontoforetik uygulanan salisilatın araşidonik asit döngüsüyle etkileştiğini ve

bunun sonucunda NMDA reseptör aktivitesinin arttığını ve işitme siniri liflerindeki spontan ateşleme oranının arttığını bildirmiştir (86). Bunun dışında kedilerde 200 mg/kg salisilatın sistemik uygulamasının işitme cortex'indeki spontan ateşleme oranının değişmediği ancak aynı yolla uygulanan 400 mg/kg salisilatın bu oranı arttırdığı bilinmektedir (87, 88).Merkezi olarak salisilat serotonin ve GABA aktivitesini düşürür ayrıca bazı potasyum kanallarının iletkenliklerini etkiler buna karşın cochlear perfüzyonda sistemik uygulamada görülen merkezi etkiler görülmez (86, 89, 90).

3.2. Hayvan Davranış Testleri

Son yıllarda kulak çınlamasına olan ilgi artmış, algılanan bu hayali seslerin nörolojik temellerinin anlaşılması ve bu rahatsızlığa karşı ilaç geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte, nörolojik rahatsızlıkların kontrollü çalışmalarının en iyi hayvanlarla yürütüldüğü tesbit edilmiştir. Ancak bir hayvanda kulak çınlamasının olup olmadığını belirlemek için bu ayrımı yapabilecek yollara ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Bu amaçla bir hayvanda kulak çınlamasının olup olmadığını gösterebilecek hayvan davranış testlerini tasarlamak rutin hayvan davranış bilimcileri için zor olmamıştır. Hayvanların fiziksel sesin varlığını ve yokluğunu ayırt edebilmesi için belli tonda bir sesin varlığında spesifik davranışlar göstermesi ve bu sesin yokluğunda ya değişik bir davranış sergilemesi ya da hiç tepki vermemesi prensibine dayanan koşullandırma testleri geliştirilmiştir (29, 91). Örneğin bir hayvan belirli tonda bir sesin varlığında su içme davranışı göstermesi için eğitilebilir. Bu amaçla kullanılacak 8 ayrı hayvan davranış testi mevcuttur.

3.2.1. Jastreboff'un Koşullandırılmış Baskılama Yöntemi:

Hayvanlarda ilk kulak çınlama testi Jastreboff ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Bu testte koşullandırılmış baskılama yöntemi kullanılmıştır (65). Bu yöntem, susuz bırakılmış hayvanların, özel tasarlanmış bir kafes içinde, belirli frekans ve yoğunluktaki arka sesin varlığında su içme davranışı göstermesi ve daha sonra bu arka ses kapatıldığında belirli bir sessiz aralık diliminde ayak şoku yardımıyla su içme hareketinin baskılanmasından oluşur. Başka bir deyişle susuz bırakılmış hayvanlara, ilk önce sesli ve sessiz ortamları ayırt etmesi öğretilir. Daha sonra sessiz ortamla su içme hareketini ilişkilendirebilmesi sağlanır. Bunun için sessiz ortamda kafes tabanından verilen bir ayak şokuyla su içmemeye koşullandırılır. Koşullandırma eğitimi tamamlanan hayvanlarda kulak çınlaması oluşmuşsa çınlamadan dolayı hala ses algılandığı düşünülür ve test süresi içinde belli aralıklarda arka ses kapatıldığında su içme hareketinde baskılanmanın azaldığı hatta ortadan kalktığı görülür. Eğer oluşmamışsa test süresi içinde belli aralıklarda arka ses kapatıldığında tabandan ayak şoku verilmemesine rağmen su içme hareketi neredeyse tamamen baskılanır.

3.2.2. Bauer ve Brozoski'nin Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi:

Bauer ve Brozoski tarafından tasarlanan koşullandırılmış kaçınma yöntemi Brennan ve Jastreboff'un yönteminden türetilmiştir (92). Yine ilk önce hayvanın sesli ortamla sessiz ortamı ayırabilmesi prensibine dayanır. Bu ayrımı öğrenen hayvanlarda çınlama oluşturulur ve sürekli dinletilen sesin arasında verilen sessiz aralıklarda hayvanlarda beklenen frekanstaki kulak çınlamasına oluşmuşsa hayvandan ona göre davranması beklenir. Bunun için aç bırakılan hayvanlar, ilk

önce 60 dB SPL geniş bant aralığındaki sesin varlığında yiyeceğe ulaşabilmesi için yiyecek koluna basmaya koşullandırılır. Koşullanmayı öğrenen hayvanlar ikinci bir koşullanmaya tabii tutulurlar. Bu koşullanmada 60 dB SPL geniş bant aralığındaki ses 60 saniyeliğine kapatılır ve bu sessiz aralığın sonunda hayvana kafesin tabanından bir ayak şoku verilir. Böylece sessiz aralıkta yiyecek koluna basma davranışı baskılanmaya çalışılır. Yiyecek koluna basma davranışı % 25 azalma gösterdiğinde artık ayak şoku verilmez (93).

3.2.3. Rüttiger'in Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi

Rüttiger ve arkadaşlarının yöntemi bahsi geçen diğer yöntemlere alternatif olarak sunulmuştur. Ratların şekerli suyu saf suya tercih ettiği bilinmektedir. Bu yöntemde 15-18 saat susuz bırakılan ratlar özel bir kafes içinde sunulan birinde saf su, birinde %3 sükröz solüsyonu bulunan su şişelerinden birini seçmeye koşullandırılır. İlk önce her iki şişeden su içmeye koşullanan ratlara su içme davranışıyla birlikte ödül verilir. Daha sonra 70 dB SPL geniş bant sesin geldiği taraftaki su şişesinden su içen rata ödül verilirken, ses kapatıldığında ödül verilmez ayrıca ayak şoku verilir. Bu eğitim ratın sessiz aralıklarda en fazla %20 oranında su içme hareketi göstermesine kadar devam ettirilir (69).

3.2.4. Guitton'un Koşullandırılmış Kaçınma Yöntemi

Guitton ve arkadaşları kulak çınlaması oluşturulacak ratların, belirli bir sesin varlığında verilecek ayak şokundan kaçınmalarını esas alan bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde önceden bahsedilen yöntemlerden farklı olarak sesli ortamda ayak şoku verilir. Ratlar 10 kHz 50 dB SPL saf sesin varlığında

kafesin bir köşesine yerleştirilmiş bir platforma tırmanmaya koşullandırılır. 10 dakikalık bir eğitim sürecince 10 defa ses verilir ve ratın şoktan kaçınmak için platforma tırmanmayı öğrenmesi beklenir. Rat verilen şokların %80'inden kaçabilmeyi öğrenmişse eğitimi öğrendiği kabul edilir (74).

3.2.5. Guitton'un T- Su Labirenti Yöntemi

Guitton ve arkadaşları iki seçenekli bir kulak çınlaması testi geliştirmişlerdir. Bu test hayvanlarda kulak çınlamasının olup olmamasına dayanan ratların sağa ya da sola yüzdüğü bir su T-labirentinden oluşur. Herhangi bir yoksunluk ve ayak şoku içermediğinden dolayı avantajlı bir yöntemdir. Hatta su labirenti içinde yüzen hayvanlar, dinlenmeleri için yerleştirilmiş olan platformu bulmaları için motive edilmiş olur. Hayvanlar su T-labirentinin başlangıç noktasına bırakıldıktan sonra, sesin varlığında sağ kola yüzmeye, sesin yokluğunda ise sol kola yüzmeye koşullandırılırlar. Bu koşullandırma sesin varlığında sağa yerleştirilen platform, sesin yokluğunda ise sola yerleştirilen platform aracılığıyla gerçekleştirilir (94).

3.2.6. Lobarinas'ın Planlı Oluşturulmuş Polidipsiadan Kaçınma Yöntemi

Lobarinas ve arkadaşlarının yönteminde ratlar su yerine yemden yoksun bırakılırlar. Yemden yoksun olan ratlar kendilerine verilecek yemleri beklerken su içmeye koşullandırılır ve planlı bir polidipsi oluşturulur. Diğer yöntemlerin aksine bu yöntemde planlı oluşturulan polidipside 40 dB SPL arka ses verildiğinde su içme davranışı gösterilirse rat ayak şokuyla uyarılır ve sessiz arakılarda su

içmesine izin verilir. Sessiz aralıklardaki su içme oranı toplam su içme oranının %90'ını aştığı durumlarda ratların eğitimi öğrendiği kabul edilir ve kulak çınlaması oluşturulur. Kulak çınlamasının varlığı ise sessiz aralıklarda ratın su içme davranışı göstermemesiyle kanıtlanır (95).

3.2.7. Turner'ın Sıçrama Refleksini Baskılama Yöntemi

Turner ve arkadaşları diğer yöntemlerden farklı olarak koşullandırma yoluna gitmemiş ani sestem oluşan sıçrama refleksini temel alan yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ayak şokuyla beraber, hiçbir kısıtlamaya gidilmemiştir. Sürekli dinletilen 60 dB SPL dar bant sesin arasında önce 150 ms sessiz aralıklar verilmesi ve bu sessiz aralık içinde 20ms 115 dB SPL geniş bant sesin verilmesiyle oluşan sıçramanın basınç değerinin ölçülmesi prensibine dayanır. Kulak çınlaması oluşan hayvanlarda sıçramayla oluşan basınç değerlerinin düştüğü belirtilmiştir (96).

3.2.8. Heffner'in Sesin Yerini Belirleme Yöntemi

Heffner ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem, tek taraflı gürültüye maruz bırakılan kulakta kulak çınlaması olduğu ve sağdan ya da soldan gelen sese tepki vermeyi öğrenen hayvanların, fiziksel sesin yokluğunda kulak çınlaması olan kulak yönünde aynı tepkiyi gösterdiği düşüncesine dayanır. Bunun için hayvanlar ilk önce verilen sesin sağdan mı soldan mı geldiğini öğrenebilmeleri için doğru cevap verdiklerinde ödüllendirilir, yanlış cevap verdiklerinde şoka maruz bırakılır. Eğitim sırasında verilen sessiz aralıklarda ne ödül ne de ceza verilir (97,98).

3.3. İşitme Sistemi

Ses, elastik bir ortam içinde üretilen basınçlı dalgalardır (99). İşitme ise oluşan ses dalgalarının kulak tarafından toplanması ve beyindeki işitme merkezlerinde karakter ve anlam olarak yorumlanmasına kadar olan karmaşık süreçleri ifade etmektedir. İşitme sistemi, periferal işitme sistemi “kulaktan” ve merkezi sinir sisteminin işitme ile ilgili kısımlarından oluşur. Her kulak, ulaşan karmaşık ses dalgalarının toplanması, iletilmesi, değiştirilmesi, yükseltilmesi ve analizi için uzak mesafe alıcısıdır. Algılanan bu mekanik enerji afferent işitme sinir lifleri tarafından kodlanmış sinir impulslarına çevrilir ve bu impulslar daha ileri analiz için beynin işitme merkezine iletilir. Periferal işitme sistemi, kulağın çeşitli kısımlarından oluşur ancak özellikle fonksiyonel olarak önemli olan kısmı *cochlea* ve *labriythus membranaceus*'un *cochlea*'ya ait bölümü *ductus cochlearis*'dir (100, 101). Merkezi işitme sistemi ise iç kulağın işitme kısmında bulunan aksonlara dolaylı ya da doğrudan bağlanan nöron grupları tarafından oluşturulur (102, 103).

3.3.1. Auris İnterna (İç Kulak)

İç kulak os temporale'nin pars petrosa'sı içerisinde yer alır. Dolambaçlı yollar ve bu yolları birbirine bağlayan kanallardan oluşur. Bu nedenle iç kulağa labrynthus denir. İşlev bakımından iki ayrı kısım bulunur: denge duyusunu alan vestibuler organ ve işitme duyusunu alan *cochlea*. Şekil ve yapı bakımından birbirine benzeyen, yapı ve işlev bakımından ise farklı olan iç içe geçmiş iki parçadan oluşur. Biri, dışta bulunan kemikten (*labrynthus osseus*), diğeri kemik

bölümün içinde yer alan zardan (labyrinthus membranaceus) oluşmuştur. (14, 101, 104.)

Labyrinthus osseus vücudun en sert kemik yapılarından biridir. Labyrinthus membranaceus'u bir kapsül tarzında sarar. Labyrinthus membranaceus'tan daha büyük olması nedeniyle iki yapı arasında bir boşluk kalır. Bu boşluk perilympha denilen ekstrasellüler doku sıvısına benzer bir sıvı ile doludur. Üç bölümden oluşur: Giriş kısmı (vestibulum osseus), denge ile ilgili olan yarım daire kanalları (canales semicirculares) ve işitme ile ilgili olan cochlea. (101, 104)

Labyrinthus membranaceus, labyrinthus osseus içinde yer alan ancak belli noktalarda kemiksel çatıya tutunan zarsal bir yapıdır. İçi endolympha denilen sıvı ile doludur. Labyrinthus membranaceus dört ana anatomik yapıdan oluşur. Bunlar, utriculus, sacculus, ductus semicirculares ve ductus cochlearis'tir. (101, 104.)

3.3.1.2. Cochlea

İç kulakta sesin algılanmasının gerçekleştiği yerdir. Kemiksel kısmı, zarsal kısmını çevrelemiştir. Her iki yapı cochlea'nın radial kesitlerinde çok iyi görülmektedir. Şekil bakımından salyongoz kabuğuna benzediği için bu isim verilmiştir. İnsanlarda yaklaşık 2,5 kıvrım halindedir. Açılmış cochlea'nın uzunluğu 3,1-3,3 cm arasında değişmektedir. Yüksekliği ise ortalama 0,5 cm'dir. Vestibulumun önünde bulunur. Koni şeklindedir. Basis cochlea denilen bir tabanı, cupuleae cochlea denilen bir tepesi vardır. Bu kemiksel kapsül orta kulak boşluğu iç duvarının önüne yerleşmiştir ve en içindeki modiulus adı verilen spongiyöz

dokudan oluşmuş, delikli bir koni şeklindeki yapı ile buraya bağlanmıştır (14, 101-105).

Modiolous'un çevresinde yer alan, dolambaçlı bir şekilde tabandan tepeye kadar uzanan kemik kanal *canalis spiralis cochlea*'dır. Tabanı tepesinden çok daha geniş olan bu kanalın boşluğu *lamina spiralis ossea* denilen ince kemik bölmeyle tam olmayan iki bölüme ayrılır. Ayrıca bu kanalı tam olarak üçe bölen iki esnek zar bulunur. Bunlar Reissner membranı ve basillar membran'dır. Üstte yer alan bölmeyle *scala vestibuli*, altta kalan bölmeyle ise *scala tympani*, ortada kalan bölmeyle ise *scala media* adı verilir. *Scala vestibuli fenestra vestibuli*'den başlar ve *cupuleae cochlea*'ya kadar uzanır. Tepe noktasında *helicotrema* adı verilen açıklıkla *scala tympani*'ye açılır. *Scala tympani* ise *cupuleae cochlea*'dan basale doğru iner ve *fenestra cochlea*'da sonlanır. Her iki *scala*, *perilympha* ile doludur. Bu sıvı yüksek sodyum, düşük potasyum iyon konsantrasyonludur ve *cerebrospinal sıvı* gibi ekstrasellüler sıvıya benzer. *Scala media* ise *cochlea*'nın ortasına yerleşmiştir. Reissner membranı ile *scala vestibuli*'den, basillar membran ile de *scala tympani*'den ayrılır. *Cochlea*'nın tabanından tavanına doğru daralır. *Scala media* içinde bulunan sıvının (*endolympa*) iyonik konsantrasyonu intrasellüler sıvı ile benzerdir. Yani düşük potasyum, yüksek sodyum konsantrasyonuna sahiptir (14, 101-105).

3.3.1.2.1. Reissner Membranı

Reissner membranı (vestibuler membran) *scala media*'yı *scala vestibuli*'den ayıran üç tabakalı bir zardır. Medial'de spiral limbus'un modiolar kenarına lateral'de ise *stria vascularis*'in apikal kenarındaki spiral ligamente

bağlıdır. Suya tamamen geçirgendir. Ancak büyük moleküllerin gevşek bağlantı yerlerinden parasellüler geçişini kısıtlar (105).

3.3.1.2.2. Basilar Membran

Basilar membran lamina spiralis ossea'nın lateral kenarıyla onun spiral ligamentin içindeki kısmı arasında uzanır. Scala media'nın tabanını oluşturur. Temel dokusunu cochlea'nın tonotopisi için birinci derecede önemli olan bağ doku oluşturur. Spiral uzunluğu insanda 31,5 mm, chinchilla tavşanında ise 18,3 mm'dir. Genişliği cochlea'nın tabanından apex'ine kadar 150 ile 450 µm arasında değişir. Sertliği bazal'de apex'e göre daha fazladır. Sertlikteki bu kademeli düşüş, dış kulaktan gelen sesin basilar membran üzerinde tabandan bazalden apex'e doğru bir dalga oluşmasına sebep olur. Bu dalgalanma hareketi frekansların ayrımının temelini oluşturur (14, 105).

3.3.1.2.3. Tectorial Membran

Tectorial membran, spiral limbus ve Corti organı'nın üzerinde uzanan hücreleri olmayan ekstrasellüler bir membrandır. Fibröz bir maddeden oluşmuştur. Tip II kollajen tectorial membran'ın esas proteini ve endolymphe tarafından hidre edilir. Altı bölgesi vardır, bunlar: limbal tabaka, fibröz matriks, marjinal bant, örtü ağı, Hensen şeridi ve Hardesty membranı. Corti organı'nın yüzeyinde Hardesty membranı dış tüy hücrelerinin üzerini örterken Hensen şeridi iç tüy hücrelerinin üzerini örter (105).

3.3.1.2.4. Spiral Limbus

Lamina spiralis ossea'nın iç kenarına bağlanır. En iç kenarına ise Reissner membranı bağlanır. Spiral biçiminde vaskülarize bağ dokusundan ibarettir (105).

3.3.1.2.5. Spiral Ligament

Scala media lateral duvarının büyük bir çoğunluğunu oluşturan yapıdır. Gevşek bağ dokudan oluşmuştur ve içerdiği hücreler iyon taşıyıcı enzimlerden zengindir. Lateral sınırı kulak kapsülünün iç yüzündedir. Medial sınırı ise stria vascularis ve spiral prominence tarafından oluşturulmuştur. Scala vestibuli ve scala tympani'nin içine doğru uzanır. Bu iki perilymphatic kanalın iletişim halinde bulunması için lateral bir rota oluşturur (105).

3.3.1.2.6. Stria Vascularis

Scala media'nın endolymphatic sınırını oluşturan yapıdır. Reissner membranı'nın bağlanma yerinden spiral prominence'ye uzanır (105).

3.3.1.2.7. Spiral Prominence

Stria vascularis ile basilar membran arasına yerleşmiş olan spiral şeklinde bir dokudur. Bu tabakanın iyon taşınmasında rolü olduğu sanılmaktadır (105).

3.3.1.2.8. External Sulcus

Spiral prominence basilar membran tarafından oluşturulan açık bir kanaldır (105).

3.3.1.2.9. Corti Organı

Corti organı, iç kulakta tüy hücreleri ve destek hücrelerinin spiral dizilişinden meydana gelen ve basilar membran'ın üzerine yerleşen bir reseptör organdır. Tectorial membran tarafından üzeri örtülmüştür. Birincil görevi basilar membran'ın mekanik titreşimlerini beyine iletilen nöral impulslara çevirmektir. Corti organı lateralden mediale doğru Hensen hücreleri, Corti'nin dış tüneli, üç sıra dış tüy hücreleri, phalangeal çıkıntılı Deiters hücreleri, Nuel boşluğu, dış sütun hücreleri, Corti'nin iç tüneli, iç sütun hücreleri, iç tüy hücreleri, iç phalangeal hücreler ve iç sınır hücrelerinden oluşur. Retiküler lamina denen sert tabaka, Corti organı destek hücrelerinin apikal uzantıları ile duyu hücrelerinden oluşur. Corti organı bazal turdan apikal tura doğru bazı değişiklikler gösterir. Örneğin; iç ve dış titreşim tüylü hücrelerin uzunlukları, stereosilyaların uzunlukları, Corti organının genişliği, sütun hücrelerinin başlıklarının uzunluğu, Hensen hücrelerinin yüksekliği apikale doğru giderek artar (14, 102, 103,105).

3.3.1.2.9.1. Destek Hücreleri

3.3.1.2.9.1.1. Hensen Hücreleri

Corti organı'nın lateral sınırını oluşturur ancak retiküler laminanın parçası değildir. Hensen hücreleri ile dış tüy hücreleri arasında dış Corti tüneli bulunur (14, 105).

3.3.1.2.9.1.2. Deiters Hücreleri

Dış tüy hücrelerini üstten ve alttan destekleyici hücreleridir. Basilar membrana bağlıdır ve dış tüy hücrelerini alt kutbunda fincan gibi bir çıkıntı oluştururlar (14, 105).

3.3.1.2.9.1.3. Sütun Hücreleri

Dış ve iç olmak üzere iki tip sütun hücresi vardır. Sütun hücrelerinin parmaklı çıkıntıları, hem dış tüy hücrelerinin hem de iç tüy hücrelerin yan sınırlarını yapar (14, 105).

3.3.1.2.9.1.4. Phalangeal Hücreler

İç tünel ile iç tüy hücrelerinin medial yüzlerinin birbirinden ayırır (14, 105).

3.3.1.2.9.2. Duyusal Hücreler

3.3.1.2.9.2.1. Stereocilia

Hem dış hem de iç tüy hücreleri apikal uçlarında, duyu aktarımında önemli olan stereociliara sahiptirler. Uzunlukları basis cochlea'dan cupulae cochlea'ya, ayrıca dış tüy hücrelerinin lateral sıralarına gittikçe artar. İç tüy hücrelerin stereociliaları dış tüy hücrelerinin stereocilialarına göre iki kat daha kalındır ve daha çomak şeklindedir. Stereociliarlar gerçek cilia değildir. Tüy hücrelerinin kutiküler tabakasından uzanan uzun ve sert mikrovilluslardır. En uzunları en dışta bulunur ve uzunlukları içten dışa doğru artar. Stereociliarlar birbirlerine iki çeşit bağ ile bağlanmışlardır. Bunlardan birisi stereociliaları birbirine bağlayan yatay

bağlar. Bunların dışında vertikal bağlar da bulunur. Stereocilia lar ın sertliğini içindeki aktin filamanı sağlar Her tüy hücresinin apeksinde 3-4 sıra şeklinde dizilmiş 50-150 arasında stereocilia vardır. Dış tüy hücrelerinin stereocilia ları V ya da W şeklinde dizilmiştir. İç tüy hücrelerinin dizilişi ise U şeklindedir. Dış tüy hücrelerinin en uzun stereocilia ları tectorial membran'ın alt yüzüne bağlanır. Ancak kısa olan iç tüy hücrelerinin stereocilia ları tectorial membranla ilişki kurmaz (14, 105).

3.3.1.2.9.2.2. Dış Tüy Hücreleri

Dış tüy hücreleri silindir ya da test tüpü şeklindedir. Corti organı içinde, Deiters hücreleri tarafından apikal ve bazal uçlarına ve bunların phalangeal çıkıntılarına bağlı olarak bulunurlar ve elektrik stimülasyonu ile kasılıp uzayabilirler. Sayıları insanda 13.400 olarak kabul edilmektedir. Chinchilla tavşanında ise bu sayı 10.400'dür. Dış tüy hücreleri retiküler lamina içinde bulunurlar ve medial'den lateral'e doğru dizilmişlerdir. Hücrelerin boyları apex'e doğru artar. 14 mikrondan 55 mikrona ulaşır. İç plazma membranı boyunca kutikular tabakadan çekirdeğe doğru uzanan birkaç tabaka halinde yüzeyaltı sisternalar vardır. Kutikular tabaka altındaki bu sisternalarda Hensen cisimcikleri vardır. Yüzey altı sisternaların arasında boşluklar vardır ve sisterna ile hücre membranı arasında uzunluğu 30-50 nm arasında değişen bir lif ağı bulunur. Bu sisternaların görevleri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak dış tüy hücrelerinin hareketleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (14, 102, 103, 105).

3.3.1.2.9.2.3. İç Tüy Hücreleri

İç tüy hücreleri vestibular hücrelere ve dış sıra tüy hücrelerine benzerler ve bazı önemli özellikleri ile dış tüy hücrelerinden ayrılırlar. Armut ya da şişe şeklindeki hücreleri tek sıra halinde yerleşmişlerdir ve destek hücreleri ile sıkıca çevrilidirler. İnsanda sayıları yaklaşık 3.500 tanedir. Geniş ve küremsi çekirdekleri hücrenin ortasına yerleşmiştir. İç plazmalemma boyunca uzanan birkaç tabaka yüzeyaltı sisternası bulunmaktadır. Organelleri, özellikle veziküller, sitoplazma içine dağılmıştır. Bu hücrelerin taban kısmında birçok sinaptik sinir sonlanması görülür. Her afferent uca komşu sitoplazma içinde, bir presinaptik kalıp vardır. Efferent uçlar daha geniş veziküller içerir ve daha çok afferent uçlarla sinaps yaparlar (14, 102, 103, 105).

3.3.1.2.9.3. İç Sulcus

Spiral limbusun lateral kenarı, Corti organı'nın medial kenarı ve apical'de tectorial membran arasında kalan spiral üstü açık bir kanaldır (14,105).

3.3.1.2.9.4. Spiral Limbus

Lamina spiralis ossea'nın medial kenarına bağlanır. En iç kenarına ise Reissner membranı bağlanır. Vaskülarize bağ dokudan ibarettir (14,105).

3.3.1.2.9.5. Spiral Ganglion

Dış ve iç tüy hücrelerini innerve eden sinir hücrelerinin gövdeleri spiral ganglion içine yerleşmişlerdir. Rosenthal kanal olarak isimlendirilen kemiksel kanal, spiral yönde apexe doğru ilerleyen sinir hücrelerini sarar. Spiral ganglion

içinde afferent bipolar hücrelerden köken alan miyelinli sinir lifleri ve intraganglionic spiral demet olarak isimlendiren efferent sinir lifleri bulunur. Bunun dışında otonom sinirler de bulunmaktadır. Memeli spiral ganglion'unda iki tip afferent hücre gövdesi bulunmaktadır, bunlar Tip I ve Tip II hücreleridir. Spiral ganglion nöronlarının yaklaşık %90'ı Tip I hücrelerdir, geriye kalanların hepsi Tip II hücrelerdir. Tip I hücreler, bipolar şekilleriyle, geniş çekirdekleriyle ve dikkat çekici Nissle cisimcikleri ile Tip II hücrelerden ayrılırlar. Ayrıca Tip I hücreler iç tüy hücrelerini innerve ederler ve dıştan yaklaşık 50 tabaka miyelin kılıf ile sarılmışlardır. Tip II hücreler, Tip I hücrelerden daha küçüktürler, pseudounpolar şekildedirler, lobüler çekirdekleri vardır ve sitoplazması daha çok filament içerir. Dış tüy hücrelerini innerve ederler ve ya çok az miyelin kılıfla kaplıdır ya da miyelin kılıftan yoksundurlar. İnsanda Tip II hücrelerin yarısı miyelinli yarısı miyelinsizdir. Bunun yanında miyelinsiz olan bazı Tip I hücreler monopolardır ve hem iç hem de dış tüy hücrelerini innerve ederler (102, 103, 105,106).

3.4. Tüy Hücrelerinin Transdüksiyonu

İç tüy hücreleri kulağın asıl reseptörleridir, başka bir deyişle, sesin mekanik enerjisini merkezi olarak yorumlanan elektrik sinyallerine çevirir. Dinlenme halinde, üzerindeki stereocilia hücrenin orta hattından daha uzağa eğilimli olarak bulunurlar. Bu hücrelerin dinlenme potansiyeli hücrenin bazalindeki sıvı ile ilişkili olarak -45 ve -60 mV arasında değişir. Çünkü hücrelerin apexinde stria vascularis'teki iyon pompalayan hücreler tarafından üretilen potasyumdan zengin sodyumdan fakir endolympha, bazalinde scala

tympani'yi dolduran sodyumdan zengin potasyumdan fakir perilympha bulunmaktadır. Endolympa içeren kısımlar perilympha içen kısımlara göre 80mV daha pozitifdir, bu durum endocochlear potansiyel olarak bilinir. Hücrenin içi ise perilympha'dan 45mV daha negatifdir yani endolympa'dan 125 mV daha negatiflik gösterir. Stereocilialar'ın zarında oluşan bu elektriksel fark, potasyum iyonlarının transdüksiyon kanallarıyla hücre membranından içeriye doğru akışı ile sonuçlanır. Transdüksiyon uzunluk derecesine göre dizilmiş ve en uçtan birbirine uç bağlantı proteinleriyle bağlı stereociliaların yanal hareketleriyle gerçekleşir. Ses endolympa'yı dalgalandırdığında, basal membranın aşağı yukarı hareket eder ve stereocilialar normal duruş açısının ilerisine ve gerisine doğru yer değiştirirler. En uzun stereocilianın yönünde, uç bağlantılar gerilir ve arasında bulunduğu stereocilialar arasında bir gerilim oluşturur. Stereociliaların membranında bulunan gerilime duyarlı ve mekanosensitif transdüksiyon kanalları açılır. Dinlenme potansiyelinde az sayıda transdüksiyon kanalı açıkken stereocilialar'ın en uzun stereocilia yönünde yer değiştirmesiyle daha çok transdüksiyon kanalı açılır ve potasyum iyonlarının hücrenin apex'inden hücreye girmesiyle hücre içi konsantrasyonu zaten potasyumdan zengin olan hücre, depolarize olur. Meydana gelen depolarizasyonla hücrenin baseline doğru yerleşmiş olan voltaj kapılı kalsiyum kanalları ve somatik voltaj kapılı potasyum kanalları açılır. Hücre içine giren kalsiyum iyonları, hücrenin bazalindeki tip I spiral ganglion hücre sonlanmalarına glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımını sağlar. Bahsi geçen kalsiyuma bağlı egzositoz merkezi ve periferel sinir sistemindeki kimyasal ileti taşınımıyla aynıdır. Çünkü dinlenimde bazı transdüksiyon kanalları açıktır ve reseptör potansiyeli bifaziktir. Stereocilia'ların

yana doğru hareketi hücreyi depolarize ederken, ters yöne yapılan hareket hiperpolarizasyona sebep olur. Somatik potasyum kanallarının açılması potasyumun hücre dışına çıkmasına ve dolayısıyla repolarizasyona neden olur. Çünkü bazaldeki denge potansiyeli tüy hücresinin dinlenme potansiyelinden daha negatiftir. Repolarizasyon ayrıca hücre içine giren kalsiyum iyonları aracılığıyla da kolaylaştırılır. Nörotransmitter salınımını sağlamanın dışında, hücre içi kalsiyum iyonlarının artışı kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarının açılmasına ve hücre içi potasyum iyonlarının perilympa'ya geçmesine neden olur (107). İç tüy hücrelerinin aksine dış tüy hücreleri cochlear yükseltici (amplifikatör) olarak motor bir fonksiyona sahiptir. Bu yükseltme doğrusal değildir yani düşük sesler yüksek seslere göre daha fazla yükseltilir ve hücrelerin uzunluğunun değişmesiyle üretilir. Hücrelerin uzunluğunu ise prestin adı verilen özel bir membran proteini değiştirir. Dış tüy hücreleri tectorial membran içine gömülmüşlerdir, membranın uzunluğundaki değişiklik, dış tüy hücrelerini median hattın ilerisine ve gerisine hareket ettirir. Bu hareketlenme iç tüy hücrelerinin yakınındaki endolympa'nın dinamiğini de değiştirir. Sonuç olarak dış tüy hücreleri, iç tüy hücrelerinin transdüksiyonunu ayarlar (108).

3.5. Merkezi İşitme Sistemi

Yukarıda anlatıldığı gibi ses, 8. cranial sinir boyunca beyine taşınan aksiyon potansiyellerine çevirilir. 8.cranial sinirin aksonları cochlea'nın tonotopisine göre bulunur ve cochlear (koklear) nucleus'u innerve eder. İşitme sistemi, farklı sesleri yorumlayan, birbirine paralel uzanan birçok yolağa bölünmüştür. Monoaural ve biaural olarak bilinen bu yolaklar, sırasıyla, tek

kulaktan ve çift kulaktan alınan sesleri yorumlar. İşitsel yorumlanmanın beyindeki ilk basamağı beyin sapı çekirdekleri olarak bilinen nucleus cochlearis ve nucleus olivaris dorsalis (SOC) 'te gerçekleşir (99).

Binaural yolaklar, isminden de anlaşılacağı gibi, her iki cochlea'dan gelen işitsel uyarılara bağımlıdır. Bu yolaklar, gürültülü ortamda sesin lokalizasyonu ve sinyallerin tesbitiyle ilgilidir. Binaural yorumlanmanın en alt seviyesi nucleus olivaris dorsalis'ten başlar, bilateral uzantılar lemniscus lateralis ve colliculus inferioris'e geçer (99).

Monoaural yolaklar, sesin spektral özelliklerinin çıkarılması ve genliğinin ayarlanmasıyla ilgilidir. Nucleus cochlearis dorsalis'in piramidal ve dev hücrelerinden ve nucleus cochlearis ventralis'in ahtapot hücrelerinden köken alan uzantılar binaural yolaktan gelen uzantılarla colliculus inferioris'te birleştirilirler (99).

Beyin sapı çekirdekleri sesi; frekans, spektral bileşenler, yerleşim yeri ve gürültünün azaltılması gibi basit özelliklerine göre ayıran bir merkez olarak düşünülür. Bütün bu ayırımlar, orta beynin işitme ile ilgili kısımlarında gerçekleştirilir. Burdan alınan bilgiler işitsel thalamus'a, corpus geniculatum mediale'ye ve en son olarak ikincil ikincil cortex tarafından sarılan birincil işitsel cortex'e aktarılırlar (99).

3.5.1. Nucleus Cochlearis (CN)

İşitme merkezinin ilk merkezi çekirdeğidir yani periferden gelen akustik bilginin yorumlanmaya başladığı ilk noktadır. 8. cranial sinir boyunca uzanan spiral ganglion aksonlarının ilk uğrak yeridir. İşitme sinirinden gelen tüm lifler

burada zorunlu olarak sinaps yaparlar. Bu sinapslarda glutamat tarafından uyapıcı postsinaptik potansiyeller üretilir. Cochlear nucleus hücresel yapısı ve foksiyonları birbirinden farklı, dorsal ve ventral iki bölgeye ayrılmıştır. Giriş kısmında afferent lifler ascendens ve descendens olarak iki kola ayrılırlar. Bunlar anterior nucleus cochlearis ventralis (aVCN) ve posterior nucleus cochlearis ventralis (pVCN) adlandırılır. Geriye kalanlar ise nucleus cochlearis dorsalis içine dağılır(99).

3.5.1.1. Nucleus Cochlearis Dorsalis (DCN)

Nucleus cochlearis dorsalis, nöronlar arasındaki sinaptik etkileşime şekil veren çok sayıdaki ara nörona sahiptir. Gelişimsel ve hücre yapısı olarak cerebellumla benzerlik gösteren katmanlı bir yapısı vardır (99).

DCN'ye özgü beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlar fusiform, fan, radiate, cartwheel ve küçük satellite hücreleridir. Her biri DCN için morfolojik olarak tanımlanan 3 tabakaya dağılır. Bu tabakalar DCN'ye karakteristiktir ve genel olarak, moleküler, fusiform ve profund olarak isimlendirilmişlerdir. Fusiform hücreler, fusiform tabaka içine yerleşmişlerdir ve DCN'nin yüzeyine dikey olarak uzanan iki ayrı dentritik uzantısı bulunur. Apical dendritler dışta bulunan moleküler tabakadan bilgiler alırken nöron gövdesindeki ve basaldekiler işitme sinirinden alırlar. Fan hücreleri derin DCN tabası içine dağılmış orta büyüklükteki nöronlardır. Yüzeye ortogonal, paralel ya da oblik bir şekilde dizilmişlerdir. Dikensi dendritleri, bazısı granüler tabakaya dağılmak suretiyle, merkezi bölge içine doğru dallanır. Ancak moleküler bölge içine dal vermez. Fan hücrelerinin işitme sinirinden direk bilgi aldığı yönünde hiçbir kanıt yoktur. Radiate nöronlar

görünüş olarak VCN'de bulunan büyük multipolar satellite hücelere benzerdir, DCN'nin derin katmanında bulunurlar. Uzun dendritleri CN'nin geniş bir kısmına uzanır ve moleküler tabakaya ulaşmadan önce sonlanır. Bu dendritler işitme sinirinden gelen bilgilerin büyük kısmını alır. Cartwheel hücreleri, hücreleri, cerebellar Purkinje hücrelerine benzer inhibitör ara nöronlardır. DCN'un profund tabakalarına doğru iner. Moleküler tabakada bulunur ayrıca aynı zamanda fusiform tabakanın moleküler tabaka sınırında da bulunurlar, kiriş benzeri dendritleri nöron gövdesinden uzanır. Cartwheel hücrelerinin aldığı bilgiler aksodendritik sinapslar aracılığıyla granüler hücrelerden gelir. Küçük satellite hücreler, ince dendritlere sahiptir ve cartwheel hücreler gibi fusiform ve moleküler tabakalar içine yerleşmiştir. Kendilerine ulaşan bilgiler granüler hücrelerden gelir. İşitme sinirinden direk olarak bilgi alamazlar. Bazı türlerde küçük satellite hücreleri dendrodendritik ve dendrosomatik olarak sıkı bağlantılarla birbirine bağlanmıştır (106).

Dev hücreler ve granül hücreler gibi birçok hücre tipi hem DCN'de hem de VCN'de tanımlanmıştır. Buna ek olarak hücre tipine bağımlı olmak üzere, her iki bölgede de heterojen dağılımlı küçük hücre tipleri bulunmaktadır. Bu hücreler Golgi hücreleri olabilir. Dev nöronlar DCN'nin derin tabakasında az sayıda bulunmaktadır ve tüm VCN içine dağılmış durumdadır. Morfolojik kriterlere dayanarak birkaç alt hücre tipine ayrılabilirler. Den hücreler, kedide çok sayıda, rodent, primat ve insanlarda az sayıda bulunmaktadır. Genel olarak geniş dendritleri, VCN'nin granül tabakasının DCN'nin ise moleküler tabakasını içe girmiştir. Granül hücreleri ise, çok küçük küresel bir soma ile kısa ve ince dendritlerden oluşmuştur. DCN ve VCN'yi kapatan bir tabaka oluştururlar. Uzun

olan aksonları, çoğu zaman paralel olarak uzanırlar ve DCN'nin moleküler tablasının büyük kısmını oluştururlar. Ancak DCN'nin merkezi bölgesinde dağınık halde bulunan granül hücreleri de vardır. Aldığı çoğu bilginin işitme sinirinden geldiği bilinirken, tip II spiral ganglion hücresinden de bilgi aldığı yönünde kanıtlar da vardır. Süperfisiyal granül hücreleri çeşitli işitsel, vestibular ve somatosensörük bilgileri alır ve cartwheel hücrelerine ve piramidal hücrelere paralel uyarıcı uzantılar gönderir (106).Piramidal hücreler ise süperfisiyal ve profund tabakalalar arasında bir ara yüzey oluşturur (99).

3.5.1.2. Nucleus Cochlearis Ventralis (VCN)

Nucleus cochlearis ventralis, sesle ilgili bilginin binaural beyin sapma ve inferior colliculus'a iletilmesini sağlar. DCN'nin aksine, VCN'nin nöronal cevapları sinaptik etkileşimden ziyade içsel iletkenlikten oluşur. VCN nöronlarının morfolojik ve elektrofizyolojik özellikleri aksiyon potansiyellerinin hızlı ve tam taşınımına adapte olmuştur. Dört ana nöron tipi bulunmaktadır: Spherical bushy (küresel çalı) hücreleri, globular bushy (globular çalı) hücreleri, octopus (ahtapot) hücreleri, satellite/multipolar (uydu) hücreleri.

Bunların morfolojileri, aksiyon potansiyelini ateşleme şekilleri ve uzantıları birbirinden farklıdır. Bushy (çalı) hücreleri, bu şekilde adlandırılmıştır çünkü üzerindeki dendritle çalı tarzında seyrek olarak dağılım gösterir. Superior olivary complex'e (SOC) uzanan binaural uzantıları oluşturan nöronların büyük çoğunluğunu kapsar. Spherical bushy hücreleri Held calyx'i olarak adlandırılan dört dev afferent sinapsla birleşir. Globular bushy hücreleri ve spherical bushy hücreleri benzer morfolojiye sahiptir ancak aradaki fark somanın şeklinden ve

dendritik organizasyondan kaynaklanır. Globular bushy hücreleri işitme siniri lifinden 20-40 arasındaki afferent sinaptik yapar. Bu sinapslar bushy hücrelerinin gövdeleri üzerinde oluşur ve immunohistokimyasal, moleküler ve elektrofizyolojik kanıtlar gösterir ki buradaki uyarıcı cevap glutamat reseptörleri aracılığıyla oluşur. Globular bushy hücreleri ve spherical bushy hücreleri aralarındaki ana farklardan biri de çekirdek üzerindeki yerleşim yerleridir. Globular bushy hücreleri işitme sinirinin köküne bitişik olarak bulunur ve corpus trapezoideum'un nucleus medialis'ine (MNTB) contralateral olarak uzantılar gönderir. Bu uzantılar bu kısımda Held calyx'i denilen tek ve dev bir sinaps oluştururlar. Spherical bushy hücreleri ise aVCN'ye yerleşmiştir, SOC'de sesin lokalizasyonunu sağlayan diğer çekirdeklere bilateral uzantılar verir. Tip I spiral ganglion nöronlarından sinaptik sonlanmalar alırken, cochlear olmayan sinaptik sonlanmalardan gamma amino bütirik asit ve glisin tarafından sağlanan inhibitör bilgiler alırlar. Satellite ya da multipolar hücreler aVCN'de bulunur ve isminden de anlaşılacağı gibi uzun ve aralıklı dendritleri vardır. Bunlar colliculus inferioris'e contralateral olarak uzanırlar. Octopus hücreleri bir somatik kutuptan çıkan geniş dendritlere sahip olduğu için bu ismi almıştır. pVCN'de ve intermedier acustic stria boyunca yerleşmişlerdir. Dendritleri CN boyunca uzanan descendens aksonları çaprazlar. Geniş aralıktaki frekansa sahip seslerinin sinaptik bilgilerini alırlar ve aVCN'den monoaural bir yolak oluşturmak üzere lemniscus lateralis'in nucleus ventralis'ine ve colliculus inferioris'e contralateral uzantılar gönderirler (106).

3.5.2. Nucleus cochlearis'in uzantıları

CN'den yayılan iki ana ascendens yolak bulunmaktadır. Bunlardan birincisi VCN'den SOC nucleus'larına bilateral uzanan, ikincisi ise hem DCV'den hem VCN'den inferior colliculus'a ve lemniscus lateralis'e contralateral uzanan yolaktır. Ascendens yollara ilave olarak CN alt bölümlerine bağlanan ya da CN'yi contralateral olarak geçen çok sayıda içsel uzantı bulunmaktadır (106).

Binaural yolak üç uzantıdan oluşmaktadır. Bu uzantılardan başlangıç alan hücre tipleri, işitme sinirinden direkt ve yoğun bir bilgi alır ve bu uyarıcı tipteki bilgileri hızlı iletken aksonlara iletir. Spherical bushy hücreleri lateral superior olive (LSO) ve medial superior olive'e (MSO) ipsilateral olarak ascendens bilgi sağlar. Globular bushy hücreleri de aynı tipteki bilgiyi contralateral MNTB için sağlar. MNTB'nin büyük calyx sonlanmalarından sonra buraya kadar taşınmış olan bilgi, corpus trapezoideum'un contralateral dorsomedial periolivarynucleus'una (DMPO) ve corpus trapezoideum'un ipsilateral lateral nucleus'una (LNTB) gönderilir. Octopus hücreleri caudal ve dorsal periolivary hücre gruplarını bilateral, lemniscus lateralis'in nucleus ventralis'i ise contralateral innerve etmek için intermedier acustic stria aracılığıyla yayılır.

CN'den çıkıp contralateral IC'ye ve lemniscal nuclei'ye uzanan uzantıların yoğun bir kısmı VCN'deki satellite ve DCN'deki dev ve fusiform hücrelerden köken alır. VCN içinde IC'ye rostral olarak uzanan tek hücre tipi satellite hücreleridir. Bu nöronlar VCN'nin her bölümünde bulunur, LSO'yu kısmen çevreler ve periolivary nucleus'ları bilateral olarak innerve eder. Contralateral lemniscus lateralis (LL) içinde ilerlerler, VNLL'de collateral dallar vererek IC'nin merkezi çekirdeğinde sonlanırlar. Ayrıca ipsilateral VNLL'ye, IC'ye contralateral

DNLL'ye küçük uzantıları vardır. SOC'ye olan uzantılar ise bir geri bildirim mekanizmasının bileşenlerinden biri olarak fonksiyon yapıyor olabilir. Çünkü zaten periolivary grup çekirdekler CN'nin geri bildirim bölümü olarak görev yapar. DCN'nin dev hücreleri ve fusiform hücrelerinin aksonları SOC'ye uğramadan geçer ve dorsal acustic stria yoluyla contralateral IC'nin central nucleus'una ve external cortex'ine ulaşır. Dev hücreler ve fusiform hücreler ayrıca ipsilateral IC'ye küçük uzantılar gönderir. Tüm bu lifler LL boyunca geçer, contralateral VNLL'ye collateral uzantılar gönderirler (106).

Conrtalateral işitsel uyarımla, uyarılabilen ya da baskılanabilen hücreler hem DCN'de hem de VCN'de bulunurlar. Bu elektriksel cevapların conrtalateral CN'den köken alan uzantılar tarafından kontrol edildiği olası ihtimaldir. Böylece CN'de bulunan birçok hücrenin binaural bilgi aldığı ihtimali de mevcuttur. VCN'deki büyük ve orta boylu satellite hücreleri ve DCN'deki dev hücreler contralateral'deki DCN ve VCN'ye uzanırlar. Karşıda bu bilgiyi alan hücreler pVCN'de ve DCN'de bulunan hücrelerle beraber spherical busy ve octopus hücreleridir. İmmunohistokimyasal çalışmalar, her iki CN'yi birleştiren yolağın VCN'nin contralateral acustic uyarımla inhibisyonunda olduğu gibi glisinerjik olduğunu ortaya koymuştur. DCN'de ise bu bilginin süperfisiyal tabakadaki hücreler kadar fusiform hücreler tarafından alındığı bilinmektedir (106).

Bunun yanında birçok araştırmacı içsel CN uzantılarının varlığını ortaya koymuştur. Horseradish peroksidaz (HRP) çalışmaları DCN'nin uzamsal olarak sınırlandırılmış tonotopik bilgileri pVCN'deki büyük satellite hücrelerden ve octopus hücrelerinden aldığını ve aVCN'deki satellite, globulae ve küçük spherical hücrelerden ise geniş dağılımlı, daha az tonotopik özellikteki bilgileri

aldığını açığa çıkarmıştır. pVCN bölgesi, hem kendinden, hem de DCN'den güçlü tonotopik, aVCN'nin caudal kısmından ise mevcut tonotopik olmayan bilgileri alır. aVCN ise ipsilateral DCN'deki var olan bilgileri ve kısıtlı içsel iletileri alırken, ipsilateralde bulunan pVCN'den herhangi bir bilgi almaz. Tek bir olası istisna olan fan hücreleri dışında bu hücre tiplerinin bu bölgelerden içsel uzantılar için kaynak olduğu belirtilmemiştir. Fan hücreleri DCN'nin aVCN'ye tonotopik olarak organize olmuş uzantılarının kaynağı olarak görülmektedir. Cartwheel ve fan hücrelerinin CN kompleksi dışına çıkması olası bir durum değildir. Bunlar muhtemelen yerel devreli nöronlardır. Sınırlandırılmış bölgelere kadar uzanabilen kısa aksonlara sahiptirler. İnhibitör nörotransmitter olan amino asitlere immunreaktiflik gösterirler. Böylelikle hedef nöronlar üzerine baskılayıcı etkilerinin olduğu söylenebilir. Diğer tarafta, küçük satellite hücreleri ve granüler hücreler tüm CN kompleksi boyunca uzanırlar ve daha uzun içsel devrelere katılırlar (106).

3.5.3. Superior Olivary Kompleks (SOC)

Superior olivary kompleks, beyin sapında yerleşmiştir ve 7. cranial sinirden pons'a doğru rostral olarak uzanır. SOC birkaç grup çekirdekçikten oluşmuştur, bunların büyük çoğunluğu binaural işitsel bilgi alır. SOC'de bulunan iki ana çekirdek vardır, bunlar medial superior olive (MSO) ve lateral superior olive'dır (LSO).BU çekirdekçilere ulaşan ana sinaptik bilgiler bilateral aVCN'deki bushy hücrelerinden gelir. MSO, her iki cochlea'dan gelen uyarıcı cevabı alır. Binaural aktif olan bu hücreler "EE" olarak adlandırılır. LSO ise ipsilateral uyarıcı bilgiyi alırken contralateral MNTB'den baskılayıcı cevabı alır.

Bu hücreler “EI” olarak isimlendirilir. MSO kulaklar arası zamanlama farkını, LSO ise kulaklar arası ses seviye farkını belirleyen yer olarak bilinir. Bu her iki özellik sesin kaynağını bulmada kullanılır, başka bir deyişle sesin geldiği yerin belirlenmesinde önemli rol oynar (99).

3.5.4. Lemniscus Lateralis (LL)

Lemniscus lateralis’in dorsal nucleus’u (DNLL) MSO’dan ve LSO’dan gelen binaural bilgiyi birleştirir ve karşı taraftaki DNLL’ye büyük contralateral bir uzantı gönderir. Böylelikle DNLL sesin yerleşimiyle ilgili önemli binaural ipuçlarını alır ve yine büyük bir binaural uzantıyla colliculus superioris’e bu ipuçlarını gönderir. Lemniscus lateralis’in intermedier nucleus’u (INLL) baskın olarak contralateral VCN’den ayrıca ipsilateral MNTB’den bilgi alır. Bu bölgenin sesin zamansal özelliklerini kodladığı düşünülmektedir. Lemniscus lateralis’in ventral nucleus’u (VNLL) baskın olarak contralateral VCN’de bulunan octopus hücrelerinden uyarıcı bilgi alır. VNLL’deki nöronlar genel olarak monoaural bilgilere cevap verir ve geniş frekans aralığındaki sesin zamansal kodlamasına katılır. Tüm lemniscus lateralis ipsilateral olarak colliculus inferioris’e bağlanır (99).

3.5.5. Colliculus Inferioris (IC)

Colliculus inferioris monoaural ve binaural yolların birleştirildiği önemli bir bölgedir. Birçok çekirdekten oluşmuştur ve bunların en büyük ve merkezde bulunan en önemlisidir. Colliculus inferioris’in merkezi çekirdeği (CIC) olarak isimlendirilir. Bu çekirdek dorsal cortex, dorsomedial nucleus ve lateral

nucleus'la çevrilmiştir. CIC contralateral CN'den direk monoaural ve MSO, LSO ve DNLL'den indirek binaural uzantılar alır. CN uzantılarının tonotopik temsili medial'den lateral'e giden afferent bantlarla burada korunur. Korunan bu ses frekansları yüksekte alçağa doğrudur. İzofrekanslı bu ses bantları dikey düzlem üzerine sıralanırlar. Monoaural ve binaural bilgilerin birleşmesinin birbiri ardına gelen uyarıcı ve baskılayıcı bantları oluşturmak ve sesin yorumlanmasında monoaural spektral ipuçlarının binaural mekanizmalarla iç içe geçmesine izin vermek için olduğu öne sürülür. Merkezi bölgede genliğin ayarlanması, cevap aralığı ve binaural etkileşimi tanımlayan birçok yolak haritası bulunmaktadır. CIC'den çıkan bilgilerin büyük çoğunluğu corpus geniculatum mediale'ye gider. Dorsal cortex, dorsomedial nucleus ve lateral nucleus'tan çıkan bilgiler ise colliculus superioris'e gider (99).

3.5.6. Colliculus Superioris (SC)

Somatosensörük, işitsel ve göresel duyuların birleştirildiği önemli bir bölgedir. Yüzeysel katmanına retinotopik, derin katmanına ise hem monoaural hem de binaural uzantılar ulaşır. Hayvanlarda sese cevap veren hücreler rostral olarak yerleşmiştir. SC'nin yine hayvanlarda gözün sesin kaynağına odaklanması gibi çoklu duyu uyarımlarına uyum sağlamasında büyük rol oynar (99).

3.5.7. Corpus Geniculatum'un Medial Nucleus'u (MGN)

Corpus geniculatum'un medial nucleus'u işitme yolağının thalamus'taki ana nucleus'udur. Ventral, dorsal, medial olmak üzere üç büyük bölümü vardır. CIC corpus geniculatum'un medial nucleus'unun ventral (vMGN) bölümüne

tonotopik uzantılar gönderir. Bu arada acustic radiatio aracılığıyla da primer işitme cortex'ine aynı uzantılardan gönderir. vMGN'nin aldığı bilgilerin en fazla CIC'den gelir. Dorsal ve medial bölümler tonotopik olmayan işitsel uyarımları ve görme ve denge ile ilgili çekirdeklerden gelen çoklu duyusal uzantıları alır (99).

3.5.8. İşitme Cortexi

İnsanlarda transversal temporal gyrus ile ilişkilidir ve fissura sylvia içini gömülmüş haldedir. Üzerinde oluşan uyarımlara göre birincil işitme cortex'i (A1) ve ikincil işitme cortex'i (A2) olarak bölümlere ayrılmıştır. Broadmann alanı (41) olarak bilinen birincil işitme cortex'i (A1) beynin superior temporal lobu üzerine yerleşmiştir. MGN uzantılarının sonlanmaları işitme cortex'inin IV. tabakasında sinapslar oluştururlar ve baskın olarak vMGN'den uyarım alır. Tonotopik olarak düzenlenmiştir, düşük frekanslar rostral bölgede bulunurken yüksek frekanslar caudal bölgede bulunur. Perpendicular mediolateral ekseninde, birbiri ardına gelen binaural sensitif hücre bantları A1'i EE ve EI sensitif bölgelere ayırır. İşitmenin daha yüksek seviyelerdeki yorumlanması A1'i çevreleyen ve tonotopik olmayan Belt ve Parabelt bölgelerinde oluşur (99, 106).

3.5.9. Descendens İşitme Yolakları

Ascendens yolaklara paralel, işitme cortex'inden başlayan ve işitmeyi yorumlayan üst merkezlerin seviyesinden daha alt seviyedeki çekirdeklere kadar inen geniş bir descendens yolak bulunmaktadır. Başka bir deyişle descendens yolak işitme cortex'inden Corti organına kademeli olarak inen bir yolaktır. Merkezden çevreye giden bu yolakların varlığı 19. yüzyıldan beri bilinmektedir.

Ancak bu sahaya olan ilgi olivocochlear demetin 1946 yılında Rasmussen tarafından açıklanmasıyla daha da artmıştır (103, 109-111).

İki zincir olarak tanımlanan bu yolakların birincisi işitme korteksinden çıkan üç descendens yolaktan oluşur. Bunlar: corticogeniculate, corticocollicular ve corticopontine yolaklardır. Corticogeniculate yolak thalamus ve cortex arasındaki karşılıklı bağlantının bir parçasıdır (112). Corticocollicular yolak Corpus geniculatum mediale'yi atlayarak colliculus inferioris'te sonlanır (113, 114). Kedilerde cortical kemer alanının colliculus superioris'e lifler sağladığı gösterilmiştir ayrıca işitme cortex'inin subcortical nucleus'lara uzantıları olduğu bilinmektedir (115, 116). İkinci zincir ise colliculus inferioris'ten çıkan sinir liflerinden oluşur. Bu lifler colliculoolivary ve colliculocochleonuclear yolakları oluşturur. Colliculoolivary lifler ECIC ve CIC'in ventral bölümünden çıkar (117) ve dış tüy hücreleriyle bağlantılı olan periolivary medial olivocochlear hücrelerde sonlanırlar. Böylece, işitme cortex'inden duyu hücrelerine giden üç nöron yolağı oluşmuş olur. Dış tüy hücrelerine lif sağlayan lateral olivocochlear hücreler üst işitme merkezlerinden doğrudan etkilenmezler (99).

Özetle descendens yolakların sonunda bulunan bir geri bildirim mekanizması beyin sapından kulağın kendisine kadar uzanır. Cochlea'ya beyin sapından olivocochlear nucleus aracılığıyla bilateral olarak medial ve lateral SOC'den uzanan iki efferent yolak mevcuttur. Lateral sistem, LSO 'nun içindeki ve çevresindeki hücrelerden köken alır ve afferent sonlanmaları iç tüy hücreleriyle ilişkili aksoaksonik sinapslar oluşturur. İsminden de anlaşılacağı gibi, medial sistem daha merkezi yerleşmiş olan MSO ve MNTB'den çıkar. Bu yolak dış tüy hücrelerini doğrudan innerve eder. Medial olivocochlear yolak nörotransmitter

olarak non-spesifik katyon geçirgen α_9 nikotirik reseptörler aracılığıyla işlev görev asetilkolini kullanır. Bu nikotirik alt ünite cochlea'da ve olfaktorik epitelde eksprese edilir. α_9 reseptörü kalsiyuma geçirgendir bu yüzden lokal kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının ikincil aktivasyonu ile bir hiperpolarizasyon oluşturur. Şaşırtıcı bu görünen bu olay, baskılayıcı bir cevap oluşmasına neden olur. Miyelinsiz lateral olivocochlear sistemin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak GABA aracılı aksoaksonik sinapslar genellikle presinaptik inhibisyonla ilişkilidir (99).

3.6. İyon Kanalları

Nöronlardaki elektriksel uyarımın oluşması için hücre zarının özel iyonlar için konsantrasyon farkları oluşturması gerekir. Bu zarlar hızlı ve seçici bir iyon geçirgenliği oluşturmak zorundadır. İyon kanalı adı verilen ve iyon konsantrasyonlarını dengede tutan bu aktif taşıyıcı yapılar bahsi geçen seçici iyon geçirgenliğini sağlar. İyon kanalları, hidrofobik hücre zarından elektriksel yüklü iyonların içeri ya da dışarı akışını sağlayan protein yapılarıdır. Bu proteinler karmaşık yapıdadırlar, hücre zarı boyunca uzanırlar, por adı verilen bir deliğe sahiptirler ve iletmekle yükümlü oldukları iyonları özgün hızlarda ve sıkı düzenlemeler altında iletirler (118).

Bu kanallardan bazıları hücre boyunca uzanan elektrik potansiyelini algılayan özelleşmiş yapılara sahiptir. Örneğin voltaj kapılı kanallar hücre zarındaki potansiyelle cevap olarak açılıp kapanırlar ve hücre zarı geçirgenliğini bu potansiyeldeki değişime göre ayarlarlar. Başka bir tip olan ligand kapılı iyon kanalları, nörotransmitterler gibi hücre dışı ya da ikinci haberciler gibi hücre içi

kimyasal sinyaller tarafından açılıp kapanır. Diğer başka tip olanlar ise mekanik uyarım, ısı değişimleri ya da bu etkilerin kombinasyonlarıyla görev yaparlar (119).

3.6.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Bu tip iyon kanalları integral zar proteinleri tarafından oluşturulur. Bu integral proteinler hücre zarı boyunca uzanır. Hem voltaj algılayıcı olarak hem de özel iyonların geçmesi için özelleşmiş çok seçici porları oluşturan α ve α_1 alt ünitelerine sahiptir. Yaklaşık 300 genin voltaj kapılı iyon kanallarının alt ünitelerini kodladığı bilinmektedir. Hücre zarındaki elektriksel değişimlere göre sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{2+}), potasyum (K^+) ve klor (Cl^-) iletimine aracı olurlar. Uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin yayılmasını sağlarken, hücre zarı potansiyelinin ayarlanmasına da katılırlar (120, 121).

3.6.1.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (Na_v)

Bu kanallar aksiyon potansiyelinin başlamasında önemli bir rol oynarlar. Aktivasyonları sodyum iyonlarının hücre dışından hücre içine hareket etmesine izin verir. Beyin ve çizgili kaslarda bulunan Na_v kanalları hetero-oligomerik α ve β alt ünitelerinden meydana gelmiştir. α alt ünitesi, Na_v kanallarının en büyük fonksiyonel özelliğini belirten 24 transmembran sarmalından oluşur (120, 122). Bu kanalların moleküler karakterizasyonu Noma ve arkadaşlarının çabalarıyla 1984 yılında yapılmıştır (123). Yapılan ilk çalışmalarda rat beyinde üç tip Na_v kanalının eksprese edildiği bulunmuştur, bunlar şimdiki isimleriyle Nav1.1 (SCN1A), Nav1.2 (SCN2A) ve Nav1.3 (SCN3A) olarak bilinen kanallardır (121).

3.6.1.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (Ca_v)

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları birçok fizyolojik olayı başlatan hücre içi kalsiyum geçişlerine karşı hücre zarındaki potansiyel değişikliklerini düzenleyen anahtar bir dönüştürücüdür. Memelilerde 10 çeşit voltaj kapılı kalsiyum kanalı bulunmaktadır. Her biri hücresel sinyal döngüsünde değişik roller üstlenir. Ca_v1 alt ailesi kontraksiyon, sekresyon, gen ekspresyonlarının düzenlenmesi, nöronlardaki sinaptik girdilerin birleştirmesi ve özelleşmiş duyu hücrelerindeki sinaptik geçişin sağlanmasını başlatır. Ca_v2 alt ailesi hızlı sinapslardaki sinaptik geçişin başlamasında birinci sorumludur. Ca_v3 ailesi ise thalamik nöronlar ve kalp miyositleri gibi ritmik ateşleme görülen hücrelerde tekrarlanan aksiyon potansiyellerinin ateşlemede önemli rol oynar (124, 125).

3.6.1.3. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (K_v)

Voltaj kapılı potasyum (K⁺) kanalları hücre zarının uyarılabilmesi için vazgeçilmez bir düzenleyicidir. Sadece merkezi sinir sistemi ve kalpte değil düz kas hücreleri ve akyuvarlar gibi birçok değişik dokuda bulunurlar. Potasyum kanalları diğer iyon kanalları arasında en iyi karakterize edilmiş, en yaygın ve çeşitli iyon kanalıdır. Elektrofizyolojik ve moleküler tekniklerle bu elzem proteinlerin yapısı ortaya konmuştur. Tipik bir voltaj kapılı potasyum (K⁺) kanalı merkezi bir poru çevreleyen 4 özdeş transmembran alt ünitenin organize olmuş halidir. Her bir alt ünite 6 transmembran (S1-S6) uzantıdan oluşur. Bu uzantıların N ve C sonlanmaları hücre zarının hücre içinde olan kısmında bulunur. Kanalın açılıp kapanması S4 segmentinin dışa doğru hareketiyle olur. Bu segment pozitif

yüklü kalıntılar taşır. S4 segmentinin bu konformasyonel hareketi hücre zarının depolarize olmuş voltajı tarafından sağlanır (126, 127).

3.6.1.4. Hiperpolarizasyonla Etkinleştirilmiş Siklik Nükleotid Kapılı Katyon Kanalları (HCN)

Hiperpolarizasyonla etkinleştirilmiş siklik nükleotid kapılı katyon kanalları (HCN) HCN1, HCN2 ve HCN4 olmak üzere kalpte ve HCN1-4 olmak üzere beyinde bulunmaktadır. Hücre içinde bulunan C- sonlanmalarına cAMP'nin direkt olarak bağlanmasıyla oluşan hiperpolarizasyonla etkinleşen katyon kanallarıdır. Örneğin, kalp atış oranını arttıran pacemaker hücrelerindeki HCN kanallarının açılması, β -adrenerjik reseptörlere bağlanan cAMP'ye bağlıdır (120, 128, 129).

Ayrıca bu kanalların, dinlenme potansiyelinin belirlenmesi, dendritik bütünleşmesi ve sinaptik geçişlerin sağlanması gibi birçok nöronal sürece katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (130,129). Belirtildiği gibi başlıca sinir sisteminde ve kalpte eksprese olurlar. HCN kanallarının mRNA ve protein seviyelerini belirleyen geniş ölçülü çalışmalar yapılmış ve HCN1'in beyin sapı, neocortex, hippocampus ve cerebellar cortex'te eksprese edildiği bulunmuştur (131, 132, 133). Ayrıca HCN1'in medulla spinalis'te de eksprese edildiği bildirilmiştir (133). HCN2 ise neredeyse tüm beyinde eksprese edilir, en yüksek eksprese edilme oranı thalamus ve beyin sapıdır (132, 134). Tam tersi olarak HCN3 merkezi sinir sisteminde dağınık bir şekilde ve az olarak eksprese edilir. Ortadan yüksek seviyede eksprese edilme oranına göre bulunduğu yerler bulbus olfactarius ve bazı hypothalamic nucleus'lardır (134, 135). HCN4 ise beyinin belli bölümlerinde fazlaca eksprese olur. Bunlardan bazıları thalamic nucleus'lar ve bulbus

olfactorius'un mitral hücre tabakasıdır. Diğer beyin bölümlerinde ise oranla çok daha az eksprese edilirler (130).

3.6.2. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları

Transient receptor potential (TRP) kanalları üst ailesi hücre alıcısı olarak rol oynayan geniş bir katyon kanalı grubudur. Birçok TRP kanalı üyesi termal, mekanik ve kimyasal uyarıcıların tespitinde yer alır ve bu uyarıların neden olduğu irritasyonu veya ağrıyı başlatır (136). Memelilerde 20'den fazla değişik TRP kanalı tanımlanmıştır. Bu geniş ailenin çeşitli üyeleri değişik aralıkta bulunan uyarıcılarla aktive olur. Memeli TRP kanal proteinleri en az 27 proteinden oluşur ve 6 alt aileye ayrılır (TRPC, TRPV, TRPML, TRPA, TRPP ve TRPM).TRP alt ailelerinin sınıflandırılması amino asit dizilimi analizlerinin sonucunda gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte fonksiyonel özelliklerine göre üç ana alt gruba ayrılırlar: klasik ya da konik TRP kanalları (TRPC), vanilloid reseptör bağlantılı TRP kanalları (TRPV), melastatin bağlantılı TRP kanalları (TRPM). TRPM kanalları değişik uyarılara karşı aktivasyon gösterir ve değişik iyon kanallarına karşı değişik geçirgenliğe sahiptir (137, 138). TRP üst ailesinin genel yapısı, membran boyunca uzanan 6 α heliksten, S5 ve S6 arasındaki bir gözenekten ve iki sitozolik kuyruktan oluşur (139).

3.6.2.1. TRPM Kanalları

TRPM kanalları hücrenin magnezyum dengesinde önemli olan TRPM6 ve TRPM7 gibi kanalları, sadece tek katyon ileten TRPM4 Ve TRPM5 gibi kanalları, ısıya hassas TRPM8 kanallarını, hücre içi kalsiyum dengesinde önemli rol

oyunayan ayrıca reaktif oksijen türleriyle bağlantılı olan TRPM2 kanallarını kapsar(137, 138, 140).

TRP kanallarının çoğu seçici olmayan katyon kanallarıdır. Ancak bazıları ikinci haberci olarak görev yapan kalsiyum iyonlarına karşı özel bir geçirgenlik gösterir. Bunlardan biri TRPM2'dir (140). TRPM2 kanal proteinlerinin N sonlanmaları yaklaşık 700 amino asitten oluşur. TRPM2'nin baskın özelliği fosfataz aktivitesi gösteren ve Nudix kutusu olarak isimlendirilen bir bölgeye sahip olmasıdır. Bu bölge gelişim evresinde diğer TRPM kanallarında kaybolmuştur. Nudix kutusu kanal proteininin sitoplazmik C-sonlanmasının kuyruğuna yerleşmiştir ve aktivasyon mekanizması adenosin 5'-difosforiboz (ADPR) kanaldan geçişiyle oluşur(139). TRPM2 kanalları hücre içi ADP-riboz konsantrasyonunun mikromolar düzeydeki değişimleriyle aktive olur. Bu aktivasyon hücre içi ADP-ribozun kanal enzimi olan Nudix kutusuna bağlanmasıyla olur (141). Ayrıca reaktif oksijen ve nitrojen (ROS ve NOS) türleri aracılığıyla oksidatif ve/veya nitrosatif stres oluşturarak aktive olduğu da bilinmektedir. TRPM2 kanallarının aktivasyonu ise hücrenin ölümüyle sonuçlanabilir (140, 142,143).

TRPM7, TRPM üst ailesinin genişçe eksprese edilen bir üyesidir. Hem iyon kanalı hem de protein kinaz görevi yapan yapısal elementlerden oluşur (144-147). Hücrenin yaşayabilmesi için gerekliliği bilinen tek iyon kanalıdır (145). TRPM7'nin kinaz bölgesi yoluyla ATP tarafından aktive olan ve seçici olmayan bir katyon kanalı olduğunun belirtilmesine rağmen (146), hücre içindeki serbest Mg^{2+} iyonlarına ve Mg- nükleotitlerine bağımlı olarak Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi iki değerlikli iyonlara karşı yüksek seçicilik gösteren katyon kanalı oldukları da

belirtilmiştir (144). TRPM7, TRPM kanallarının içinde fonksiyonel bir iyon kanalı olarak eksprese edilen ilk üyesidir. 1863 amino asitten ve PLC-b1 ile etkileşen bir proteinden oluşur. Tüm dokularda eksprese olur. İyon kanalları arasında hem kanal proteini hem de protein kinaz olan benzersiz bir iyon kanalıdır. Substratı bilinmemektedir. Proteinin C sonlanması kinaz bölgesi olarak tanımlanmıştır. TRPM7 kinaz bölgesi sekansının küçük bir bölümünün geleneksel protein kinazinkine benzemesine rağmen, yapısı şaşırtıcı bir şekilde birçok ökaryotik protein kinaza benzer. Aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir (148).

Amaç

Kulak çınlamasını tedavi etmek amacıyla birçok çalışma yapılmış ve ikna edici sonuçlar elde edilmiştir. Zheng ve arkadaşları sentetik canniboid reseptör antagonisti olan WIN55, 212-2 ve CP55, 940'yi kullanmış ve salisilatla indüklenen kulak çınlamasında azalma olduğunu bulmuşlardır. Yine aynı grubun yaptığı diğer bir çalışmada antiepileptik bir ilaç olan carbamazin'in ve Çin'e özgü bitkisel bir ilaç olan EMF01'in aynı etkiyi oluşturduğu gözlemlenmiştir.(149). Ek olarak Brozoski ve arkadaşlarının akustik travmayla oluşturdukları kulak çınlamasının γ -aminobutyric acid (GABA) agonisti vigabatrin'in ve besin katkı maddesi taurine'nin iyileştirici etkilerinin olduğu belirtilmiştir (150). Ancak kulak çınlamasını iyileştirmede bazı tedavi türlerinin ve hayvan modellerinde başarılı olduğu düşünülen antikonvülzan, antidepresan, antiglutamerjik, dopaminerjik ve antidopaminerjik ajanlar, antiepileptik ajanlar, lidokain, steroid, Ginkgo biloba, sentetik prostaglandin E1 analogu misoprostol, atorvastatin, melatonin ve çinko

gibi farmakoterapik ve bitkisel maddelerin olmasına rağmen FDA or EMEA tarafından onaylanmış hiç bir ilaç bulunmamaktadır (151).

İyon kanallarının ise birçok hastalığın patofizyolojisine katıldığı bilinmektedir. Bu sebeple bu hücre zarı proteinleri antiepileptik ilaçlardan analjezik ilaçlara kadar birçok ilacın hedef yapısı olmuştur. Yine iyon kanallarının aşırı ekspresyonunun bazı kanser hücreleri üzerinde antikanser ilaçları geliştirilmesi için yeni bir saha oluşturmuştur. Tedavi amaçlı ilgi gören iyon kanallarının başında elektriksel uyarımı sağlayan ve hücre sel sinyalde önemli rol oynayan voltaj kapılı iyon kanalları gelir (118, 152).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, farmakolojik olarak önemli olan bazı iyon kanallarının ratların cochlear çekirdeklerinde salisilatla ve aşırı gürültüyle oluşturulmuş kulak çınlaması ile ekspresyonlarının nasıl değiştiğini gözlemlemek amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen bilgilerin yeni ilaç geliştirme stratejilerinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

Çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden(FÜDAM) ağırlıkları 195-330 gr arasında değişen, 4 aylık, 48 adet adet erkek Wistar Albino cinsi rat temin edilmek suretiyle yapıldı. Ratların bakımı yine Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde standart yemlere ve suya istedikleri kadar ulaşabilecekleri, 30x40x20 cm boyutlarında, üzeri çelik tel parmaklıkla örtülü şeffaf plastik kafesler içinde yapıldı. Ratların kafeslere dağılımı en fazla dörder adet olacak şekilde düzenlendi. Ratlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamında barındırıldı. Kullanılan denekler ve sarf malzemeleri Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) birimi tarafından VF.11.10 numaralı proje kapsamında sağlandı. Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 06.12.2012 tarihli 117 numaralı izni ile gerçekleştirildi.

4.2. Yöntem

4.2.1. Deneklerin Gruplandırılması

Ratlar ilk önce floresan immunohistokimya analizi yapılacak olanlar ve Gerçek Zamanlı PZR analizi yapılacak olanlar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her iki grup için 24 adet rat belirlendi. Daha sonra bu iki grup da kendi içinde sodyum salisilatla kulak çınlaması oluşturulacak grup (SAT), aşırı gürültüyle kulak çınlaması oluşturulacak grup (NT) ve kontrol grubu olmak üzere üç alt gruba ayrıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Her analiz ve grup için kullanılan rat sayısı

	SAT Grubu (n)	NT Grubu (n)	Kontrol Grubu (n)
İmmunohistokimya (n)	8	8	8
Gerçek Zamanlı PZR (n)	8	8	8

4.2.2. Davranış Testinin Uygulanması

Hayvan davranış testlerinden Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi uygulandı (65, 66). Bu test her kulak çınlaması grubu için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Ratlara sesli ortamla sessiz ortam arasındaki farkı öğretmek için el yapımı bir koşullandırma sistemi kullanıldı. Bu sistem ses izolasyonu yapılmış bir kabin, zemini tungsten çubuklarla döşeli bir kafes, ses kaynağı, hoparlörler, kamera, elektrik şoku üretici, ses kaynağı ve elektrik şoku üreticinin uzaktan kumandaları ve bir bilgisayardan oluşmaktaydı.

Ses izolasyonu yapılmış kabin 80 cm x 45 cm x 60 cm, kafes ise 40 cm x 30 cm x 45 cm boyutlarındaydı. Video kayıtları, kafesin sol tarafında kayıt için en uygun pozisyonda yerleştirilmiş Microsoft HD5000 model bir kamerayla alındı. Aynı zamanda ratların kullanacağı su şişesi yerden 5 cm yükseklikte kamera tarafından en iyi görünecek yere yerleştirildi. Sistemin ışıklandırılması kafesin tavanına yerleştirilen lambalar tarafından sağlandı. Pavlov'un koşullandırma eğitimi için gerekli olan elektrik şoku (0,5 mA 1s) sabit akım üreten bir kaynak tarafından sağlandı ve kafese 1 cm aralıklarla dizilmiş tungsten çubuklar (4mm) aracılığıyla aktarıldı. Ses kaynağı olarak 10 kHz 60 dB SPL saf ses dosyası

kullanıldı. Bu saf ses kabinin içine kafesin tavanına yerleştirilen hoparlörler vasıtasıyla aktarıldı.

Kabinin filtreleme kapasitesi bir desibel metre ile ölçüldü. Bunun için kabinin dışındaki ortamın sesi, daha sonra kabinin içindeki ses ölçüldü. Aradaki fark 10 kHz 46 dB SPL, filtreleme kapasitesi olarak belirlendi.

Bütün hayvanlar eğitimin başlayacağı günden bir gün önce 18 saat süreyle susuz bırakıldı. Eğitimin başladığı günden itibaren ise kafeste kaldığı süre zarfında içtiği su haricinde başka su verilmedi. Ek olarak gün boyunca normal barındırılma koşullarında, arka ses olarak 10 kHz 60dB SPL saf dinletildi.

Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi üç ana eğitimden oluştu. Bunlar: başlangıç eğitimi, Pavlov'un koşullandırılmış baskılanma eğitimi ve eğitimin sönmesiydi. Her eğitimin süresi her bir rat için 30 dakikaydı. Başlangıç eğitimi ve Pavlov'un koşullandırılmış baskılanma eğitiminde toplamda 28 dakikalık bir süre boyunca arka ses olarak 10 kHz 60dB'lik saf dinletildi, geriye kalan 2 dakika ise rast gele seçilen dört tane 30 saniyelik sessiz aralıktan oluştu. Başlangıç eğitimi ve eğitimin sönmesi kısımlarında verilen sessiz aralıklarda ratlara ayak şoku verilmezken Pavlov'un koşullandırılmış baskılanma eğitimi kısmında sessiz aralığın sonuna doğru bir kere 0.5 mA ayak şoku verildi.

Başlangıç eğitiminde, ratların kafese ve su şişesine alışması sağlandı. Bu amaçla her bir rat bu eğitim bitene kadar her gün ses izolasyonu yapılmış kabindeki kafes içerisinde hayvan 30 dakika boyunca kaldı. Bu süre içinde toplam 28 dakika boyunca arka ses olarak 10 kHz 60dB'lik saf dinletildi. Ratların sessiz ortamla sesli ortamı ayırması için rastgele seçilen dört 30 saniyelik sessiz aralık

verildi. Bu sessiz aralıklar özellikle ratların su şişesinden su içtiği zamanlara denk getirildi. Bu eğitimi öğrenme ortalama 2-3 gün sürdü.

Pavlov'un koşullandırılmış baskılanma eğitimi, sesli ortamla sessiz ortamı ayırt etmeyi öğrenen ratların bu ayrımı su içme hareketiyle ilişkilendirmesi için bir koşullandırma basamağı oldu. Bir önceki eğitimdeki gibi her bir rat bu eğitim bitene kadar her gün ses izolasyonu yapılmış kabindeki kafes içerisinde hayvan 30 dakika boyunca kaldı. Bu süre içinde toplam 28 dakika boyunca arka ses olarak 10 kHz 60dB'lik saf dinletildi. Sessiz ortamla sesli ortamı ayırt edebilen ratlar için rastgele seçilen dört 30 saniyelik sessiz aralık verildi. Bu sessiz aralıkların son saniyelerine doğru ayak şoku verildi. Böylelikle sessiz ortamda bir tehlikenin olduğunu öğrenen ratlar, normal su içme hareketini sessiz ortamda gerçekleştirmedi. Bu yüzden sessiz aralıklar özellikle ratların su şişesinden su içtiği zamanlara denk getirildi. Bu eğitimi öğrenme ortalama 4-5 gün sürdü. Bu eğitimin bitmesi, baskılanma oranı denilen bir formüle göre belirlendi. Bu formüle göre sululuktan yapılan tüm yalama sayıları ile birlikte sessiz aralıktaki yalama sayıları sayıldı ve bu sayılara göre bir baskılanma oranı hesaplandı. Baskılanma oranı 0-0.4 arasında olan ratlar eğitimi öğrenmiş olarak kabul edildi. Bizim çalışmamızda baskılanma oranı 0 ile 0.2 arasında olan ratlar kullanıldı.

Eğitimin sönmesi kısmı asıl olarak kulak çınlamasının oluşturulduğu kısımdı. Sodyum salisilat ya da aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlamasının oluşup oluşmadığını anlamak için yapıldı. Bu eğitimde kullanılan ratlar baskılanma oranı 0 ile 0.2 arasında olanlardı. Sodyum salisilat ile oluşturulan kulak çınlamasında belirlenen dozlarda sodyum salisilat uygulanmasından 2 saat sonra, aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlamasında ise 3 saatlik anestezi

sonrasında ratlar tam uyandıktan sonra eğitime başlandı. Ses izolasyonu yapılmış kabindeki kafes içerisinde hayvan 30 dakika boyunca kaldı. Bu süre içinde toplam 28 dakika boyunca arka ses olarak 10 kHz 60dB SPL saf dinletildi. Ratların su içmesine denk getirilen dört 30 saniyelik sessiz aralık verildi ancak ayak şoku uygulanmadı. Bu formüle göre sululuktan yapılan tüm yalama sayıları ile birlikte sessiz aralıktaki yalama sayıları sayıldı ve bu sayılara göre bir baskılanma oranı hesaplandı.

$$\text{Baskılanma Oranı} = \frac{(\text{Sessiz Aralıktaki Yalama Sayısı}/2 \text{ dk})}{[(\text{Sessiz Aralıktaki Yalama Sayısı}/2 \text{ dk}) + (\text{Sessiz Aralıktaki Yalama Sayısı}/2 \text{ dk})]}$$

Baskılanma oranı 0,4'e eşit ya da 0,4'ten büyük olan ratlarda kulak çınlaması oluşmuştur dendi.

4.2.3. Deneklere Aşırı Gürültü Uygulanması

Hayvan davranış testi sonunda baskılanma oranları 0-0.2 arasında değişen ratlarda aşırı gürültü ile kulak çınlaması oluşturmak için, ses kaynağına bağlı bir amfi aracılığıyla 3 saat boyunca 10 kHz 110 dB SPL saf ses dinletildi (153).

Bu süreç, aşırı gürültüden kaynaklanabilecek acı hissini ortadan kaldırmak amacıyla dissosiyatif anestezi altında gerçekleştirildi. İlk önce ratların ağırlıkları ölçüldü. Vücut ağırlıklarına göre 0,1µl/100gr dozda atropin sülfat (Teknovet Atropin 20 ml) ile desteklenen ratlar, 7,5µl/100gr dozda Xylazine (Rompun %2)+ 2,5µl/100gr dozda Ketamin (Ketasol % 10) karışımı ile 3 saat süren bir dissosiyatif anestezi altına alındı. Enjeksiyonlar kas içine (IM) yapıldı. Anestezi altında gözlerin kurummasını engellemek amacıyla gözlere antibiyotikli pomad uygulanırken, vücut sıcaklığının düşmemesi için ratların yatırıldığı kafeslerin

altına sıcak su torbaları yerleştirildi. Bütün ratların anesteziye girdiği tespit edildikten sonra amfi kulak seviyesinden 70 cm yüksekliğe yerleştirildi ve ses kaynağı açıldı. 3 saat kesintisiz olarak uygulanan 10 kHz 110 dB SPL saf ses akustik travmaya sebep oldu. Kontrol grubu ratlara, deney grubundakilerde olduğu gibi aynı dozlarda dissosiyatif anestezi uygulandı.

4.2.4. Deneklere Sodyum Salisilat Uygulanması

Hayvan davranış testi sonunda baskılanma oranları 0 olan ratlarda sodyum salisilat ile kulak çınlaması oluşturmak için her rata vücut ağırlığına göre hesaplanmış 350mg/kg dozda sodyum salisilat (Sigma S2679-100G) deri altı (SC) yolla uygulandı. Kontrol grubu ratlara, deney grubundakilerden farklı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

4.2.5. Dokuların Alınması

Koklear çekirdek dokuları her rat için baskılanma oranı hesaplandıktan sonra alındı. Her rat bir önceki ratın dokuları alındıktan sonra dekapite edildi.

Gerçek Zamanlı PZR analizi için salisilatla kulak çınlaması oluşturulmuş ve kontrol grubu ratlar eter anestezisi altında, aşırı gürültüyle kulak çınlaması oluşturulmuş ve kontrol grubu ratlar dissosiyatif anestezi altında dekapite edildi.

Dekapite edilen kafatasının derisi makas yardımıyla kaldırıldı. Hemen sonra kafatası kemiğini kaldırmak için, bir mikro cerrahi makası yardımıyla foramen magnum'un sağ ve sol yanından, os temporale boyunca orbitaya kadar olmak üzere iki kesit yapıldı. Bu iki kesit sağ orbita ile sol orbitayı birleştirecek şekilde yapılan bir üçüncü kesitle birleştirildi. Kesilen kemik parçası kafatasından

ayrıldıktan sonra beyin dokusu ortaya çıktı. Bulbus olfactorius'tan başlamak üzere, beyin kafatasından çıkarılmaya başlandı. Pens yardımıyla yukarıya kaldırılan beyin serbest kalması için cranial sinirler sırasıyla kesildi. Serbest kalan beyin dokusu soğutulmuş RNA later (Invitrogen) içeren bir özel petri kabı içinde Leica CLS 100x marka mikrodiseksiyon mikroskobu altında hızlı bir şekilde diseke edildi. Diseksiyon için önce colliculus inferioris ile colliculus superioris arasından koronal bir kesit yapılarak, beyin sapı orta beyin hizasından ayrıldı. Ayrılan beyin sapı cerebellum'a batırılan iğneler yardımıyla petri kabına sabitlendi. Sabitlenen dokuda 8. cranial sinirin olduğu yer tespit edilerek koklear çekirdek dokusu mikro cerrahi makası ve pensleriyle alındı. RNase-DNase free eppendorf tüplere konarak sıvı azot içinde dondurulduktan sonra analiz edilene kadar $-80C^0$ 'de muhafaza edildi.

Floresan immunohistokimya analizi için her iki deney ve kontrol grubu ratlara dissosiyatif anestezi yapıldı. Daha sonra intrakardiyak perfüzyon yöntemiyle dokular tesbit edildi. Kafa dekapite edildi. Gerçek Zamanlı PZR analizi için yapılan doku elde etme metodu aynı şekilde uygulandı. Serbest kalan beyin dokusu saline phosphate buffer (PBS) (P-4417) içeren özel petri kabı içine alındı. Leica CLS 100x marka mikrodiseksiyon mikroskobu altında colliculus inferioris ile colliculus superioris arasından koronal bir kesit yapılarak, beyin sapı orta beyin hizasından ayrıldı. Ayrılan beyin sapı 0,1'lik sodium azide içeren % 30'lük sucrose solüsyonu içine atılarak, analize kadar $+4 C^0$ 'de muhafaza edildi.

4.2.5.1. İnrakardiyak Perfüzyonun Uygulanması

Perfüzyonun uygulanması için önce perfüzyon sistemi hazırlandı ve perfüzyonda kullanılacak olan PBS ve %4'lük paraformaldehit (PFA) (Merck 104005.1000) doğru bir şekilde sisteme bağlandı. Sistemin çalıştığına emin olduktan sonra ratlar anesteziye alındı.

Anesteziye alınan ratlar, ayak bileklerine flaster yapıştırılmak suretiyle bir mantar panoya sırt üstü sabitlendi. Daha sonra arcus costalis'ler hizasından karın kaslarına trasversal bir kesit yapıldı. Bu kesit arcus costalis'in sınırından vertebralara kadar genişletildi. Median hattan başlamak üzere diyafram'ın costalarla olan bağlantıları kesilerek göğüs boşluğu açıldı. Kanül ile hala atmakta olan kalbin ventriculus sinister'inden girildikten hemen sonra hızlı bir şekilde atrium dextrum'a bir kesit yapıldı. Ardından PBS'nin akışına izin verildi ve yaklaşık 30-40 dakika vücuttaki tüm kanın PBS solüsyonuyla giderilmesi sağlandı. Atrium dextrum'dan gelen sıvı şeffaflaştıktan sonra PBS akışı durduruldu ve %4'lük PFA'nın akışına izin verildi. Vücuttaki tüm dokuların tesbit olması için yaklaşık 40-45 dakika %4'lük PFA perfüzyonu yapıldı.

4.2.6. Floresan İmmunohistokimya Tekniği

4.2.6.1. Kesitlerin Alınması

% 30'luk sucrose içinde soğuğa karşı korunmuş (cryoprotected) dokular, trimleme yapıldıktan sonra medulla spinalis yukarı, colliculus inferioris'ler aşağı gelecek şekilde bloklara yerleştirildi, üzeri OCT ile kaplanarak frozen microtomda donduruldu. Dondurulan cryostatlar 10µm kalınlıkta kesilmeye başlandı. Doku kesitinde 7. cranial sinire ulaşıldıktan sonra kesitler polilisinli lamlara alınmaya

başlandı. Bütün Koklear çekirdek dokusu kesildikten sonra ışık mikroskobu altında hem dorsal hem de ventral cochlear çekirdek dokusu bulunan preparatlar seçildi.

Lamlara önceden deney grupları ve hangi antikorun uygulanacağı yazıldı. Kesitler alındıktan hemen sonra ise doku kesitlerinin etrafı PAP pen (Invitrogen) ile daire şeklinde sınırlandırıldı. PAP pen doku etrafında küçük bir havuz oluşturmak için kullanıldı.

4.2.6.2. Bloklama

Bloklama antikorların nonspesifik bağlanmasını engellemek için kullanıldı. PAP pen ile etrafı çevrilmiş doku kesitlerinin üzerine 50 µl bloklama solüsyonu eklendi. +4 °C'de minimum 60 dakika bekletilebilen doku kesitleri +4 °C bir gece bekletildi. Lamlar ışığı geçirmemesi için siyah renkli saklama kutuları muhafaza edildi. Ayrıca doku kesitlerinin kurumaması için lam saklama kutusu tabanı 3-5 mm derinlikte su ile kaplandı.

4.2.6.3. Primer Antikor Uygulaması

Bloklamının ertesi günü HCN1, HCN2, HCN4, Erg3 ve Erg1-2-3 anti-goat primer antikorları (Santa Cruz) primer sulandırma solüsyonu içinde 1/100 oranında ayrı ayrı sulandırıldı. Tekli boyama yapıldığı için 990 µl primer sulandırma solüsyonu için 10 µl primer antikor kullanıldı.

Bloklama süresi dolduktan sonra lamlar +4 °C'den oda ısısına alındı ve doku kesitlerinin üzerine bir önceki gün eklenen 50 µl bloklama solüsyonunun 40 µl'si geri alındı. Primer antikorlar eklenene kadar doku kesitlerinin kurumaması

için 10 µl'si alınmadı. Kurumaya imkan vermeden doku kesitlerinin üzerine primer antikor solüsyonundan 30 µl eklendi. Saklama kutularının kapakları hemen kapatılarak +4 °C'de bir gece bekletildi.

4.2.6.4. Sekonder Antikor Uygulaması

Primer antikor uygulamasının ertesi günü HCN1, HCN2, HCN4, Erg3 ve Erg1-2-3anti-goat primer antikorlarına uygun chicken-anti-goat- 488 nm sekonder antikorlar (Alexa Fluor®-Invitrogen A21467) sekonder antikor sulandırma solüsyonunun içinde 1/100 oranında sulandırıldı. Tekli boyama yapıldığı için 990 µl sekonder sulandırma solüsyonu için 10 µl sekonder antikor kullanıldı. Sulandırma işlemi, sekonder antikorlar FITZ, TRITZ gibi florasan ışığı yapan maddelerle bağlı olduğu ve gün ışığında bu maddelerin solduğu bilindiği için, karanlık bir odada gerçekleştirildi.

Hemen sonra doku kesitlerine eklenen primer antikor solüsyonu döküldü. Lamlar 45⁰ eğimle tutularak PAP pen ile sınırlandırılan alanlar bir pipet yardımıyla yaklaşık 5-6 ml PBS ile yıkandı. Sınırlanmış alanlarda, doku kesitlerinin kurumaması için az miktarda PBS solüsyonunun kalmasına izin verildi. Ancak sekonder antikorların yayılmasını önlemek için lamlarının altı ve sınırlandırılmış alanlarının etrafı kağıt havlu ile iyice kurulandı.

Sekonder antikor uygulaması tekrar karanlık oda içinde yapıldı. Her doku kesitinin üzerine 30 µl sekonder antikor solüsyonu eklendi. Saklama kutularının kapakları hemen kapatılarak +4 °C'de 4 saat bekletildi.

4.2.6.5. Doku Kesitlerin İncelenmesi

Sekonder antikor uygulamasından 4 saat sonra lamlar 45⁰ eğimle tutularak PAP pen ile sınırlandırılan alanlar bir pipet yardımıyla yaklaşık 5-6 ml PBS ile yıkandı. Sınırlı alanların üzerine lamel kapatılarak, doku kesitleri Leica DM5000B marka floresan mikroskop altında 40x objektif ile incelendi. Floresan boyayla boyanan doku kesitlerinin fotoğrafları Leica DFC425C marka bir kamera ile bilgisayara aktarıldı.

4.2.6.6. Floresan İmmunohistokimya Analizi

Boyamadan sonra elde edilen fotoğraflar her deney grubu ve kullanılan primer antikora göre gruplandırıldı ve Image J programında analiz edildi.

Seçili alandaki floresan miktarının analiz için :

1-Programın analyze menüsünden “Set measurements” kısmı seçildi. AREA, INTEGRATED DENSITY ve MEAN GRAY VALUE kısımları işaretlendi.

2- Araçlar kısmından, serbest şekil çizen ikon seçildi.

3- Analiz edilecek alan bu ikon ile sınırlandırıldı.

4-Analyze menüsünden “Measure” kısmı seçildi.

5-Arka planda sonuçların çıktığı bir pencere açıldı ve bu pencerede bulunan “Area, Mean ve Integrated Density” değerleri bir Excel dosyasına kaydedildi.

6-Analiz edilecek alanın dışındaki herhangi bir karanlık alan yani arka plan da analiz edilecek alan gibi sınırlandırılarak, “Measure” ile değerlendirme tabii tutuldu. Bu alan için geçerli olan “Area, Mean ve Integrated Density” aynı Excel dosyasına kaydedildi.

7-Tüm fotoğraflar aynı şekilde değerlendirildikten sonra düzeltilmiş toplam alan floresanları (CTCF) aşağıdaki formülle ayrı ayrı hesaplandı.

CTCF= Integrated Density-(Area of selected area x Mean fluorescence of background readings.

CTCF= Entegre Yoğunluk-(Seçili bölgenin alanı x arka planın ortalama floresanı)

4.2.6.7. Floresan İmmunohistokimya Analizi İçin Kullanılan Solüsyonlar:

4.2.6.7.1. Saline Phosphate Buffer (PBS) Solüsyonu

1 adet PBS tableti 200 ml distile su içinde çözdürülerek hazırlandı. Primer ve sekonder antikor sulandırma solüsyonu hazırlamada ve preparatları yıkamada kullanıldı.

4.2.6.7.2. Fosfat Buffer Solusyonu

0.116 gr fosfat buffer 100 ml distile su içinde çözdürüldü. Sadece paraformaldehit solüsyonu hazırlamak için kullanıldı. Diseksiyon yapılacağı sabah hazırlandı.

4.2.6.7.3. %4 Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu

80gr toz paraformaldehit 2L fosfat buffer içine eklendi. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözdürüldü. Isıtma işlemi için manyetik karıştırıcının ısıtma düğmesi 3'e ayarlandı. Solüsyon diseksiyonun yapılacağı gün hazırlandı.

4.2.6.7.4. %30'luk Sucrose

200 ml PBS

60 g sucrose

%0.1 Sodium azide

4.2.6.7.5. Bloklama Solüsyonu

200 kesit için 6ml bloklama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 6ml PBS solüsyonu içerisine:

%3 Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich A-9418)

% 0.1 Sodium-azide (Fluka)

% 0.1 TritonX-100 (Sigma-Aldrich T-8532)

% 5 Tavuk serumu eklendi.

4.2.6.7.6. Primer Antikor Sulandırma Solüsyonu

20 ml PBS solüsyonu içine:

% 3 Bovine Serum Albumin (BSA)

% 0.1 Sodium-azide

% 0.1 Tween-20 (BioRad #170-6531)

% 5 Tavuk serumu

4.2.6.7.7. Sekonder Antikor Sulandırma Solüsyonu

Primer antikor sulandırma solüsyonun aynısıdır.

4.2.7. Gerçek Zamanlı PZR Analizi

4.2.7.1. Dokuların Homojenizasyonu

Gerçek Zamanlı PZR analizi için ilk önce homojenizasyon solüsyonu hazırlandı. Bunun için 10 ml lysis buffer içine 1 µl β-merkapttoethanol eklendi. Karışım iyice vortexlendi. -80°C'de bulunan dokular oda sıcaklığına alındı. Eriyen dokular RNA later içinden alınarak PBS içinde iyice yıkandıktan sonra grupların ismi yazılmış olan RNase-free eppendorf tüplere ayrı ayrı koyuldu. Dokuların bozulmaması için bu tüpler buzlu rockların içinde tutuldu. Her tüpe 500 µl homojenizasyon solüsyonu ve dokunun ağırlığı kadar beyin dokusu homojenizasyonu için özel üretilmiş 2mm'lik zirconium oxide buncuklardan eklendi. Daha sonra tüplerin ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra tüpler Bullet Blender®50 cihazına yerleştirildi. Cihazın hızı 8'e süre 5 dakikaya ayarlanarak çalıştırıldı. 5 dakikanın sonunda dokunun tamamı homojenize oldu. Süpernatant yeni RNA izolasyonu için yeni RNase-free eppendorf tüplere aktarıldı.

4.2.7.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kit kullanıldı. Kitin protokolüne göre:

1. Homojenatlarının üzerine kendi hacmi kadar (500 µl) % 70'lik ethanol eklendi.
2. Karışımlar iyice vortexlendi.
3. Karışımların 700 µl'si kolonlu tüplere aktarıldı.

4. Tüpler oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altına geçen sıvı dökülüp aynı kolonun üzerine geriye kalan karışım ilave edildi.
5. Tüpler yine oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi.
6. Kolonlara 700 µl Wash Buffer I eklendi.
7. Tüpler oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altına geçen sıvı dökülüp kolonlar yeni tüplere aktarıldı.
8. Kolonlara 500 µl %96'lık etanol eklenmiş Wash Buffer II eklendi.
9. Tüpler oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altına geçen sıvı döküldü.
10. Kolonlara tekrar 500 µl %96'lık etanol eklenmiş Wash Buffer II eklendi.
11. Tüpler oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altına geçen sıvı döküldü.
12. RNA'ların kolondaki iyice membrana bağlanması için tüpler oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlarının altındaki tüpler atıldı ve kolonlar yeni bir tüpe aktarıldı.
13. Kolonların tam ortasına 50 µl RNase-free su eklendi.
14. Kolonlar oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
15. En son membrana yapışan RNA'ların tüpe aktarılması için tüpler oda sıcaklığında 15.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
16. Elde edilen RNA'lar RNA miktarları ölçüldükten sonra analiz edilene kadar -80°C'de muhafaza edildi.

4.2.7.3. RNA Miktarının Ölçülmesi

RNA miktarının ölçümü Qubit 2.0 Fluorometer ile yapıldı. Ölçüm için önce gerekli karışım hazırlandı. Bunun için her bir örnek başına 1 µl Qubit Reagent, 199 µl Qubit Buffer ile karıştırıldı. Son hacim 200 µl olacak şekilde bu karışımdan 199 µl alınarak, karışıma 1 µl örnek eklendi. Her örnek için aynı karışım hazırlandı. Tüpler 2-3 saniye vortexlendi ve oda sıcaklığında 2 dakika beklendikten sonra cihazda okutuldu. Bütün tüplerdeki RNA miktarı mg/mL cinsinden hesaplandı.

4.2.7.4. cDNA Oluşturulması

Her gruptaki RNA örneği sayısı fazla olduğu için her grup için bir RNA havuzu oluşturuldu. Yani salisilatla oluşturulan kulak çınlaması grubu havuzu, aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması grubu havuzu ve kontrol grubu havuzu.

Havuz oluşturmak için en az yoğunluktaki RNA miktarını içeren tüpten 9 µl alındı. Diğer tüplerdeki RNA yoğunluğunu en az miktardaki RNA miktarına eşleştirmek için bir ters orantı denklemi kuruldu. Bulunan miktar kadar RNA alınırken geriye kalan kısım toplamda 9 µl karışım oluşturacak şekilde RNase-free su tarafından tamamlandı.

Örnek:

103mg/mL'lik tüpten 9 µl RNA alınırsa 328mg/mL'lik tüpten kaç µl RNA alınmalıdır? $(103 \times 9) / 328 = 2,8 \mu l$ alınması gereken RNA miktarı, $9 - 2,8 = 6,2 \mu l$ alınması gereken RNase-free su miktarıdır.

Toplam 9 µl karışım elde edildi.

Havuzlar oluşturulduktan sonra aşağıda belirtilen protokole göre RNA'lar cDNA'ya evirildi.

Reaksiyon karışımı (Toplam 20 μ l):

10 μ l 2x Reverse Transcription Master Mix

9 μ l RNA

1 μ l Taq polymerase

10 μ l 2x Reverse Transcription Master Mix içinde :

2 μ l 10x Reverse Transcription Buffer

0.8 μ l 25x DNTP Mix (100mM)

2 μ l 10x Random Primer

1 μ l MultiScribe™ Reverse Transcriptase

4.2 μ l Nuclease free H₂O bulunmaktaydı.

Tüpler thermal cyler'a yerleştirildi. cDNA programı çalıştırıldı.

Program:

37⁰C'de 60 dakika

95⁰C'de 5 dakika

4⁰C'de 60 dakika olacak Şekilde ayarlandı.

4.2.7.5. Gerçek Zamanlı PZR'ın Oluşturulması

Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonu Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System'de gerçekleştirildi. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonunun oluşturulabilmesi için rata spesifik Applied Biosystem TaqMan primer ve probe'lar önceden alındı. Gerçek Zamanlı PZR analiz için toplam 11 iyon kanalı

genin ekspresyonuna bakıldı. Housekeeping gen olarak GAPDH seçildi. Her reaksiyon üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

10 µl 'ilk Reaksiyon için :

5 µl Taqman® Gene Expression Master Mix

2.7 µl cDNA

0,5 µl Primer-Probe

1,8 µl Nuclease free **H2O kullanıldı.**

Reaksiyon 96 kuyucuklu Gerçek Zamanlı PZR plateleri içinde oluşturuldu. Bunun için reaksiyon karışımları kuyucuklara eklendi. Plate'in üst kısmı sıkıca kapatıldıktan sonra plate cihaza yerleştirildi. Hangi kuyucuklarda hangi grupların ve hangi iyon kanallarının olduğu işaretlendikten sonra yürütme programı ayarlandı. Programın bitiminde elde edilen veriler ve grafikler kaydedildi.

Yürütme Programı (Toplam x siklus):

Her siklus için:

50⁰C'de 2dakika (1siklus)

95⁰C'de 10 dakika (1 siklus)

95⁰C'de 15 saniye (40 siklus)

60⁰C'de 1 dakika (40 siklus)

Elde edilen veriler SPSS 15 programında analiz edildi. Her grupta 3 veri olduğu için analizler nonparametrik testlerle yapıldı. Bunun için kontrol, SAT ve NT grupları arasında bir farklılık olup olmadığını anlamak için Kruskal Wallis yöntemi kullanıldı. Eğer gruplar arasındaki farklılık önemli olarak değerlendirildiyse hangi gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu bulmak için Mann Whitney U testi kullanıldı.

Kullanılan iyon kanalları ve analiz için özel üretilen TaqMan primer ve problemler'in katalog numaraları:

HCN1: Rn00670384_m1

HCN2: Rn01408572_mH

HCN4: Rn00572232_m1

ERG1(Kcnh2): Rn00588515_m1

ERG3 (Kcnh7): Rn00590940_m1

Na1.1 (Scn1a): Rn00578439_m1

Na1.2(Scn2a1): Rn00680558_m1

Na1.3(Scn3a): Rn01485332_m1

Ca_v2.2(Cacna1b): Rn00595911_m1

TRPM2: Rn01429417_m1

TRPM7: Rn00586779_m1

GAPDH: [Rn01775763_g1](#)

5.BULGULAR

5.1. Hayvan Davranış Testi Sonuçları

Hayvan davranış testleri boyunca teste tabii tutulan her hayvanın her gün ağırlık ölçümü yapılmıştır. Ortalama bir hafta süren eğitimin sonunda her hayvanın yüzde ağırlık kaybı hesaplanmış, ortalama değer $\% 17,15 \pm 4.14$ olarak bulunmuştur. Tablo(2)'de kaydedilen veriler gösterilmektedir.

Tablo 2. Günlere göre hayvanların ağırlık ve % ağırlık azalışı

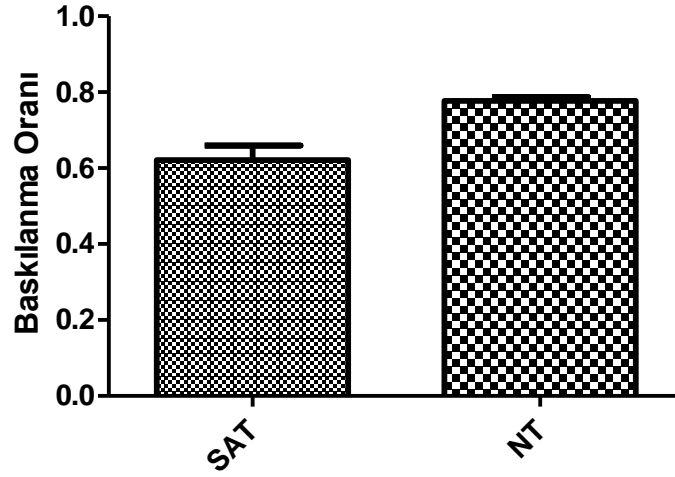
Gruplar	1.Gün/ gr	2.Gün/ gr	3.Gün/ gr	4.Gün/ gr	5.Gün/ gr	6.Gün/ gr	7.Gün/ gr	7 Gün Sonundaki % Ağırlık Azalışı
SAT	246	235	230	222	211	210	209	15,04
SAT	248	238	233	225	222	221	224	9,67
SAT	225	213	209	203	199	196	193	14,22
SAT	248	235	223	215	208	203	200	19,35
SAT	245	233	225	218	203	199	197	19,59
SAT	195	178	174	168	162	157	152	22,05
SAT	205	193	184	183	174	168	172	16,09
SAT	210	200	189	181	176	177	166	22,95
SAT	220	204	193	187	179	170	170	22,72
SAT	253	233	222	217	207	200	198	21,73
SAT	303	283	270	263	255	250	247	18,48
SAT	241	219	206	200	191	186	185	23,23
SAT	297	273	234	259	252	227	242	18,51
SAT	290	264	262	251	247	246	226	22,06
SAT	288	266	252	242	232	237	223	22,56
SAT	276	248	253	231	219	213	212	23,18
NT	238	227	218	215	210	210	203	14,70
NT	280	264	258	253	258	241	232	17,14
NT	219	214	208	207	205	197	192	12,32
NT	269	259	247	242	250	233	225	16,35
NT	260	252	245	234	237	224	217	16,53
NT	251	241	237	233	228	213	209	16,73
NT	284	273	266	262	259	239	225	20,77
NT	264	253	250	246	243	231	229	13,25
NT	226	210	209	206	202	198	195	13,71
NT	247	240	231	234	230	221	209	15,38
NT	228	218	214	215	206	208	204	10,52
NT	354	336	330	329	321	320	316	10,73
NT	257	238	236	238	233	230	226	12,06
NT	243	233	226	232	222	221	201	17,28
NT	272	268	250	252	247	244	223	18,01
NT	330	311	310	308	300	301	290	12,12

Kulak çınlaması oluşturulmadan önce yapılan hayvan davranış testinin baskılanma oranları SAT grubundaki her on hayvan için sıfır (0), NT grubundaki sekiz hayvan için sıfır (0) geriye kalan iki hayvan için ise 0,1 ve 0,2 olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu veriler kulak çınlamasının oluşturulması için gerekli olan “Baskılanma Oranı $\leq 0,4$ “ koşulunu sağladığı için her iki grupta kendi prosedürüne göre kulak çınlaması oluşturulmuştur.

Kulak çınlaması oluşturulmuş hayvanlar tekrar hayvan davranış testine tabii tutulmuş ve elde edilen baskılanma oranları Tablo (3) ve Şekil (1)’de, her iki gruba ait tanımlayıcı istatistik verileri ise Tablo (4) ve Tablo (5)’te gösterilmiştir. Elde edilen bu verilerin istatistiksel analiz yapılmış, $p < 0,05$ olmak üzere $p = 0,002$ sayısı elde edilmiş ve her iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

Tablo 3. Kulak ınlamasından sonra elde edilen baskılanma oranları

SAT GRUBU Baskılanma Oranı	NT Grubu Baskılanma Oranı
0,78	0,786
0,66	0,748
0,623	0,811
0,465	0,78
0,757	0,746
0,436	0,722
0,644	0,768
0,745	0,79
0,555	0,794
0,549	0,828



Kulak Çınlaması Oluşturulduktan Sonra Davranış Testi Sonuçları

Şekil 1. Kulak Çınlaması Oluşturulduktan Sonra Elde Edilen Hayvan Davranış Testi Sonuçları

Tablo 4. NT Grubunun Tanımlayıcı İstatistiği

	Sayı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
NT Grubu	10	0,72	0,83	0,7762	0,03170

Tablo 5. SAT Grubunun Tanımlayıcı İstatistiği

	Sayı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
SAT Grubu	10	0,44	0,78	0,6214	0,11986

5.2. Gerçek Zamanlı PZR Bulguları

Gerçek Zamanlı PZR analizi için elde edilen RNA miktarları (mg/ml) her grup için Tablo 6’te gösterilmiştir. Her rakam bir tüpten elde edilen RNA miktarlarını (mg/ml) belirtmektedir.

Tablo 6. Elde edilen RNA miktarları (mg/ml)

Tüp Numarası	RNA miktarı (mg/mL)	Tüp Numarası	RNA miktarı (mg/mL)	Tüp Numarası	RNA miktarı (mg/mL)
K1	103	SAT1	330	NT1	174
K2	195	SAT 2	394	NT2	226
K3	260	SAT 3	428	NT3	406
K4	328	SAT 4	438	NT4	476
K5	368	SAT 5	558	NT5	494
		SAT 6	1080	NT6	506
				NT7	590
				NT8	744

Gerçek Zamanlı PZR analizi için elde edilen RNA’lardan RNA havuzu oluşturulması için kullanılan RNA ve su miktarları Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. RNA havuzu oluşturulması için kullanılan RNA ve su miktarları (μl)

Tüp Numarası	Alınan RNA miktarı (μl)	Alınan su miktarı (μl)	Tüp Numarası	Alınan RNA miktarı (μl)	Alınan su miktarı (μl)	Tüp Numarası	Alınan RNA miktarı (μl)	Alınan su miktarı (μl)
K1	9	0	SAT1	2,8	6,2	NT1	5,3	3,7
K2	4,7	4,3	SAT 2	2,3	6,7	NT2	4,1	5,9
K3	3,5	5,5	SAT 3	2,1	6,9	NT3	2,2	6,8
K4	2,8	6,2	SAT 4	2,1	6,9	NT4	1,9	7,1
K5	2,5	6,5	SAT 5	1,6	7,4	NT5	1,8	7,2
			SAT 6	0,85	8,14	NT6	1,8	7,2
						NT7	1,5	7,5
						N8	1,2	7,8

Yapılan Gerçek Zamanlı PZR analizlerine göre her iyon kanalı için Kontrol grubu, SAT ve NT grubu arasında istatistiksel olarak fark olup olmadığını anlamak amacıyla bulunan ΔCT Mean değerleri analiz edilmiş, istatistiksel olarak fark bulunan gruplar daha sonra ikili gruplar halinde tekrar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre Tablo (8) HCN kanallarını, Tablo (9) Sodyum kanallarını, Tablo (10) Potasyum Kanallarını Tablo (11) TRPM kanallarını ve Tablo (12) Kalsiyum kanallarından elde edilen verileri göstermektedir.

Tablo 8. HCN kanalları

İyon Kanalı	KONTROL GRUBU			NT GRUBU			SAT GRUBU					
	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean
HCN1	3	28,03	0,066	-0,138	3	26,24	0,094	1,097	3	26,21	0,308	1,346
HCN2	3	26,10	0,253	-2,068	3	24,09	0,029	-1,050	3	23,97	0,105	-0,888
HCN4	3	29,08	0,092	0,910	3	27,46	0,043	2,321	3	27,61	0,042	2,746

HCN kanallarını genel olarak ele aldığımız zaman $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,048$ bulunmuştur. Kontrol, SAT ve NT grupları arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar ikili gruplar halinde analiz edildiğinde $p < 0,05$ olmak üzere kontrol grubu ve SAT grubu için $p=0,044$, kontrol grubu ve NT grubu için $p=0,044$ 'tür ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. SAT ve NT grubu için $p=0,227$ olduğu için bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

HCN1 kanalı için $p=0,1$ 'dir ve gruplar arasında fark yoktur. HCN2 kanalı için $p=0,211$ 'dir ve gruplar arasında fark yoktur. HCN4 kanalı için ise $p=0,018$ 'dir. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu fark, kontrol grubu ve SAT grubu, kontrol grubu ve NT grubu ve SAT ve NT grubu için $p=0,0025$ 'tir. Bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır.

Tablo 9. Sodyum Kanalları

İyon Kanalı	KONTROL GRUBU			NT GRUBU			SAT GRUBU					
	n	CT Mean	CT SD	ΔCT Mean	n	CT Mean	CT SD	ΔCT Mean	n	CT Mean	CT SD	ΔCT Mean
SCN1A	3	25,64	0,179	-4,986	3	24,32	0,078	-1,452	3	23,87	0,079	-1,807
SCN2A1	3	28,93	0,062	-1,696	3	25,82	0,098	0,049	3	26,88	0,116	1,203
SCN3A	3	29,90	0,043	-0,729	3	28,25	0,157	2,472	3	27,71	0,127	2,036

SCNA kanallarını genel olarak ele aldığımız zaman $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,018$ bulunmuştur. Kontrol, SAT ve NT grupları arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar ikili gruplar halinde analiz edildiğinde $p < 0,05$ olmak üzere kontrol grubu ve SAT grubu için $p=0,044$, kontrol grubu ve NT grubu için $p=0,044$ 'tür ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. SAT ve NT grubu için $p=0,687$ olduğu için bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Her bir SCN1A, SCN2A1 ve SCN3A kanalı için $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,018$ 'dir ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar kendi içinde analiz edildiğinde $p < 0,05$ olmak üzere kontrol grubu ve SAT grubu, kontrol grubu ve NT grubu, SAT ve NT grubu için $p=0,025$, bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır.

Tablo 10. Potasyum Kanalları

İyon Kanalı	KONTROL GRUBU			NT GRUBU			SAT GRUBU					
	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean
KCNH2	3	29,73	0,534	-0,903	3	26,39	0,256	0,617	3	25,98	0,025	0,307
KCNH7	3	31,44	0,151	0,814	3	29,24	0,108	3,463	3	28,90	0,069	3,227

KCNH kanallarını genel olarak ele aldığımız zaman $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,002$ bulunmuştur. Kontrol, SAT ve NT grupları arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar ikili gruplar halinde $p < 0,05$ olmak üzere analiz edildiğinde kontrol grubu ve SAT grubu için $p=0,003$, kontrol grubu ve NT grubu için $p=0,003$ 'tür ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. SAT ve NT grubu için $p=0,138$ olduğu için bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Her bir KCNH2 ve KCNH7 kanalı için $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,018$ 'dir ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar kendi içinde analiz edildiğinde $p < 0,05$ olmak üzere kontrol grubu ve SAT grubu, kontrol grubu ve NT grubu, SAT ve NT grubu için $p=0,025$, bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır.

Tablo 11. TRPM kanalları

İyon Kanalı	KONTROL GRUBU			NT GRUBU			SAT GRUBU					
	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean	n	CT Mean	CT SD	Δ CT Mean
TRPM2	3	30,80	0,242	0,173	3	28,58	0,281	2,806	3	28,64	0,025	2,958
TRPM7	3	29,45	0,045	-1,129	3	27,46	0,897	1,688	3	26,72	0,191	1,046

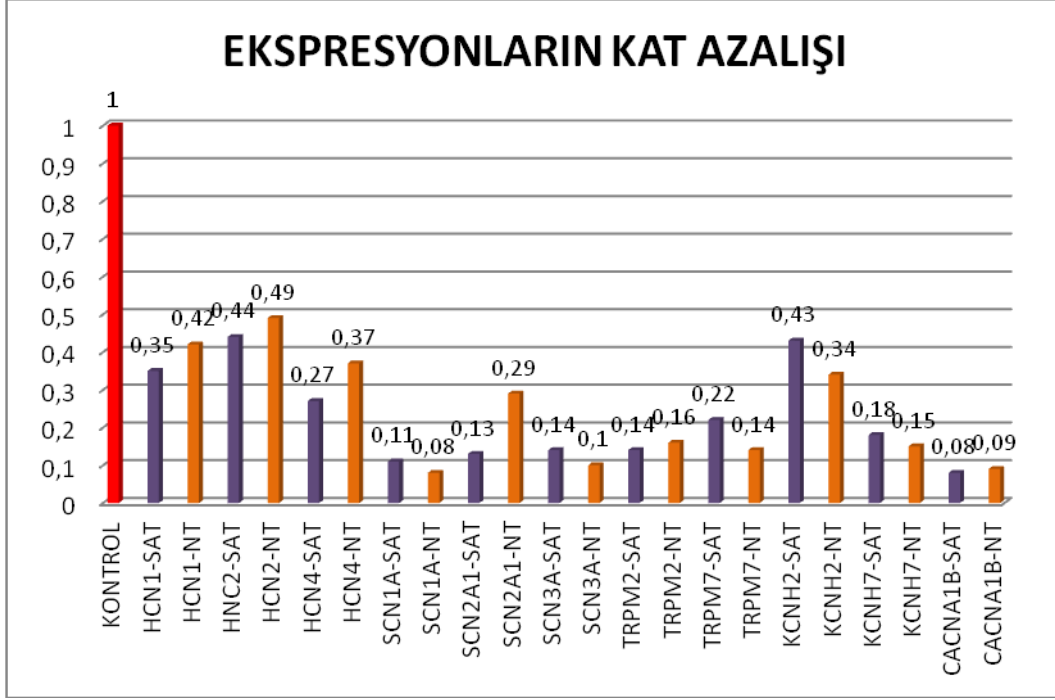
TRPM kanallarını genel olarak ele aldığımız zaman $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,003$ bulunmuştur. Kontrol, SAT ve NT grupları arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar ikili gruplar halinde $p < 0,05$ olmak üzere analiz edildiğinde kontrol grubu ve SAT grubu için $p=0,003$, kontrol grubu ve NT grubu için $p=0,003$ 'tür ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. SAT ve NT grubu için $p=1,0$ olduğu için bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Her bir TRPM2 ve TRPM7 kanalı için $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,018$ 'dir ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır. Bu gruplar kendi içinde analiz edildiğinde $p < 0,05$ olmak üzere kontrol grubu ve SAT grubu, kontrol grubu ve NT grubu, SAT ve NT grubu için $p=0,025$, bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır.

Tablo 12. Kalsiyum Kanalları

	KONTROL GRUBU			NT GRUBU			SAT GRUBU					
	n	CT	CT	Δ CT	n	CT	CT	Δ CT	n	CT	CT	Δ CT
Kanalı		Mean	SD	Mean		Mean	SD	Mean		Mean	SD	Mean
CACNA1B	3	28,45	0,064	-2,181	3	27,02	0,055	1,243	3	26,99	0,067	1,313

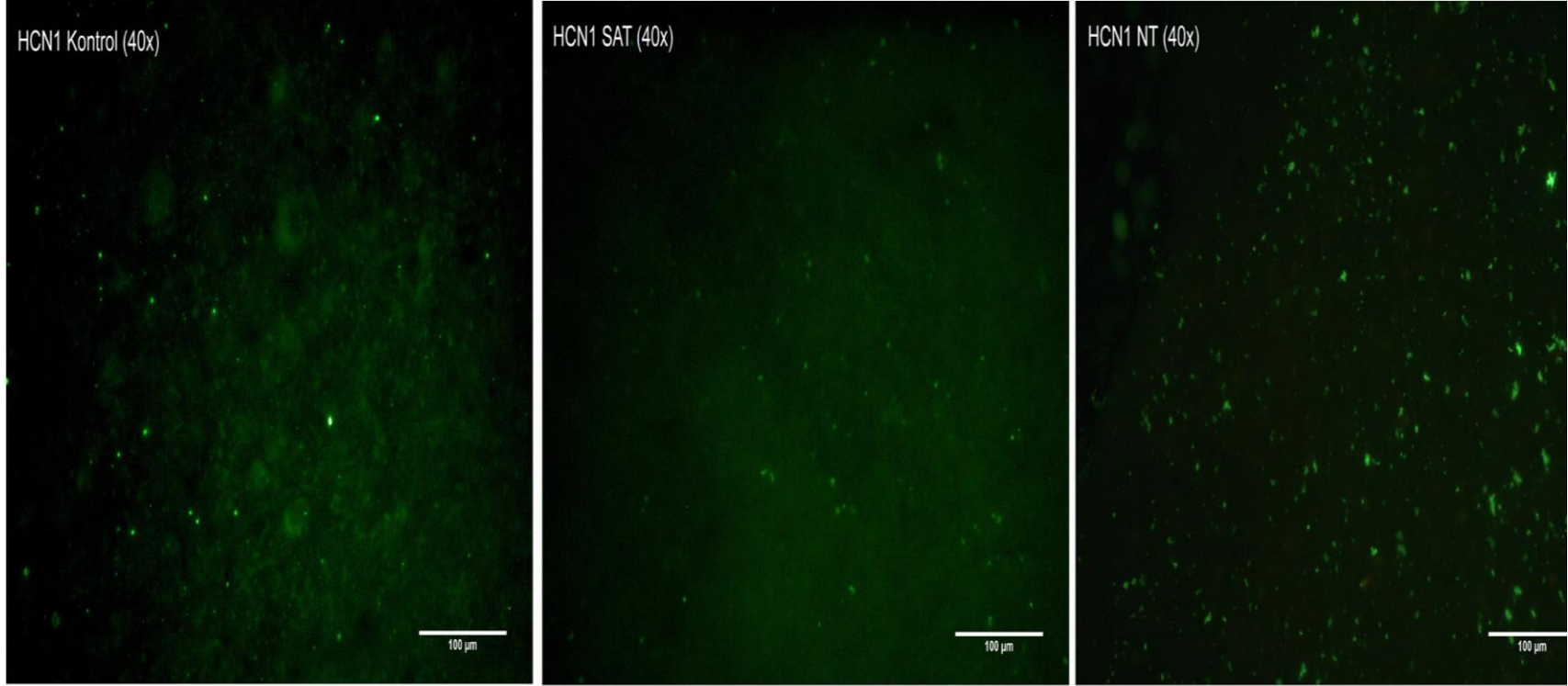
CACNA1B kanalını ele aldığımız zaman $p < 0,05$ olmak üzere $p=0,169$ bulunmuştur. Kontrol, SAT ve NT grupları arasında istatistiksel olarak fark yoktur.



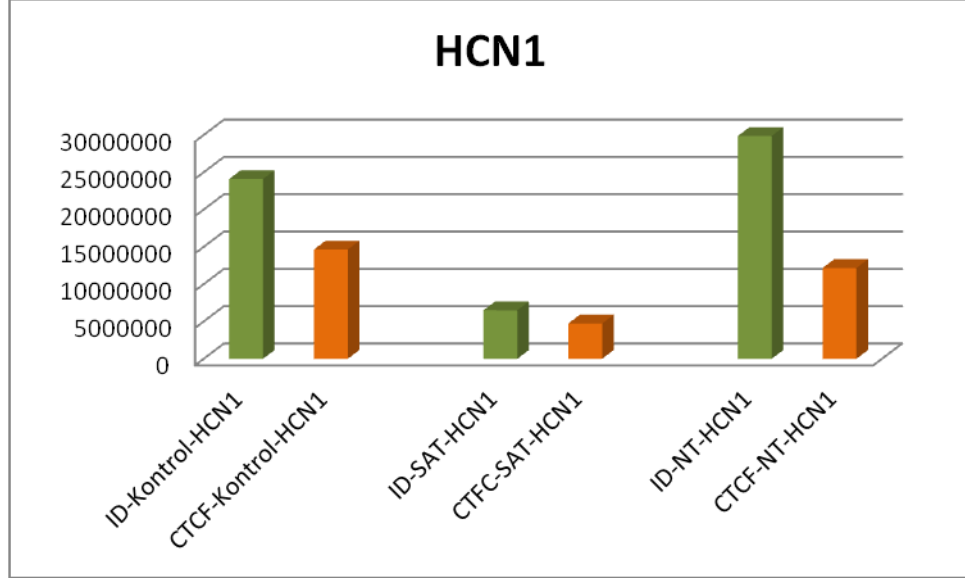
Şekil 2. Çalışmada incelenen bütün iyon kanalı ekspresyonlarının azalış grafiği

5.3. Floresan İmmunohistokimya Analizi

Yöntem bölümünde anlatıldığı gibi elde edilen fotoğraflar Şekil 3, Şekil 5, Şekil 7, Şekil 9 ve Şekil 11’de gösterilmiştir. Bu fotoğraflardan elde edilen veriler İmaj J programında elde edildikten sonra düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğuna (CTFC) göre Şekil 4, Şekil 6, Şekil 8, Şekil 10 ve Şekil 12 elde edildi.

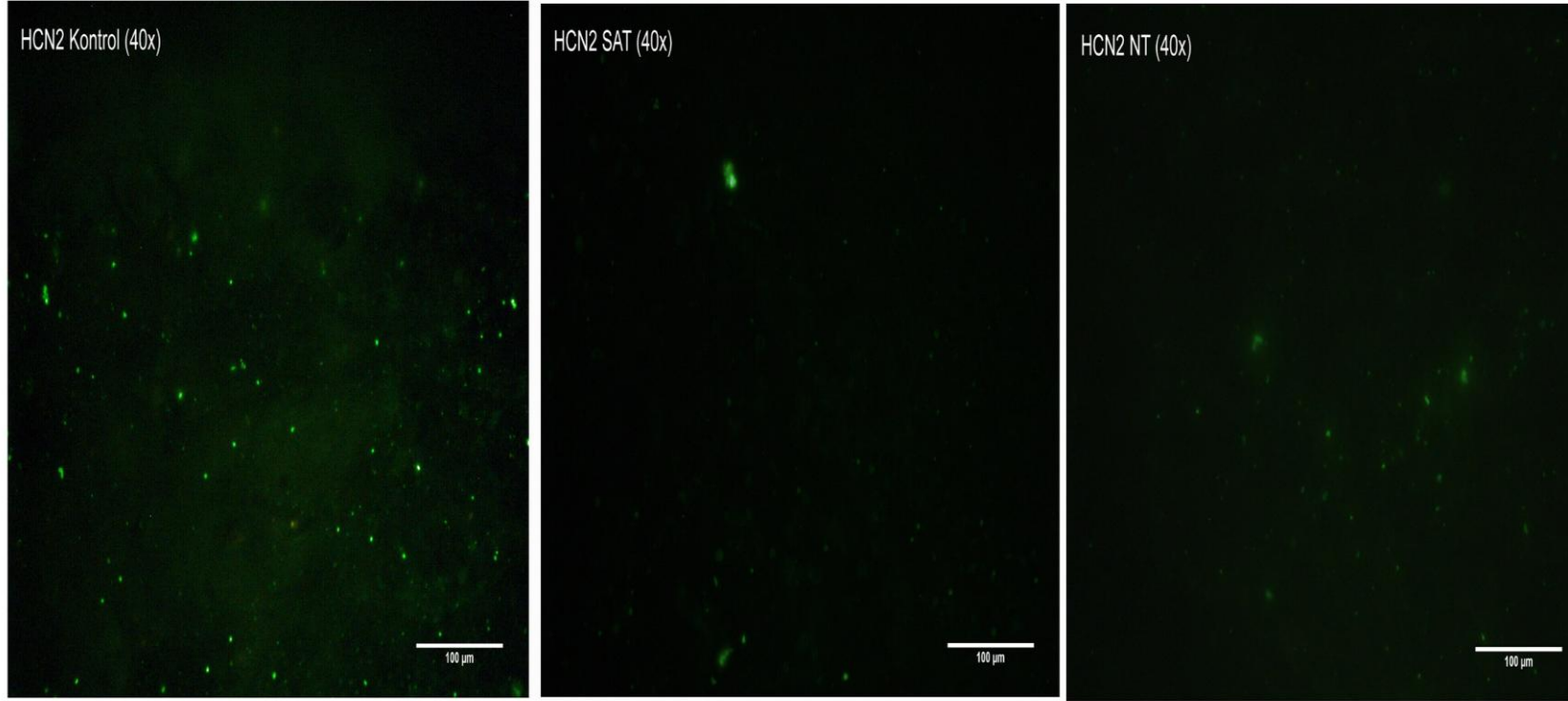


Şekil 3. HCN1 iyon kanalının 40x büyütmeli fotoğrafı

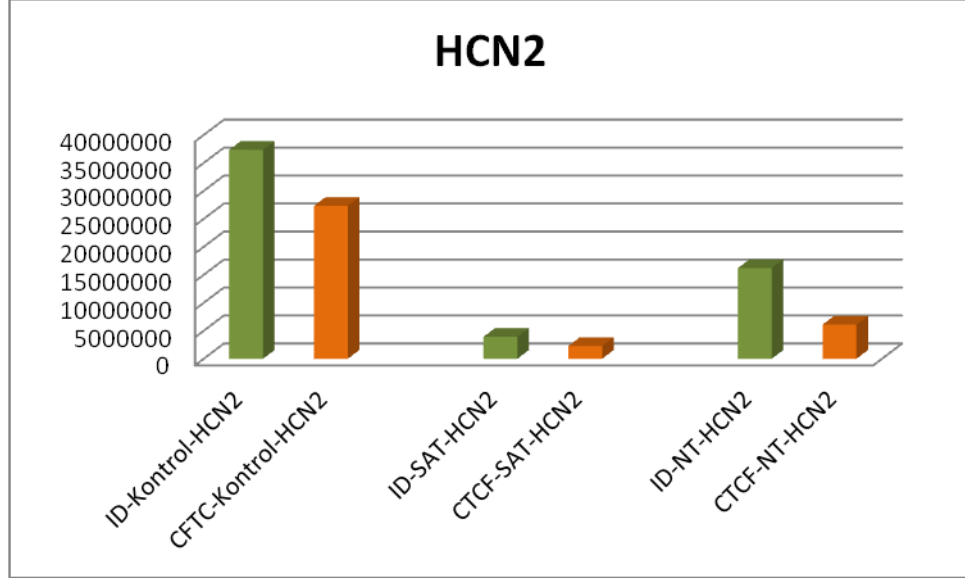


Şekil 4. HCN1 iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu

HCN1 iyon kanalı için kontrol grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu ile SAT grubu ve NT grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu karşılaştırıldığında sırasıyla 3,09 kat, ve 1,20 kat azalma olduğu görüldü.

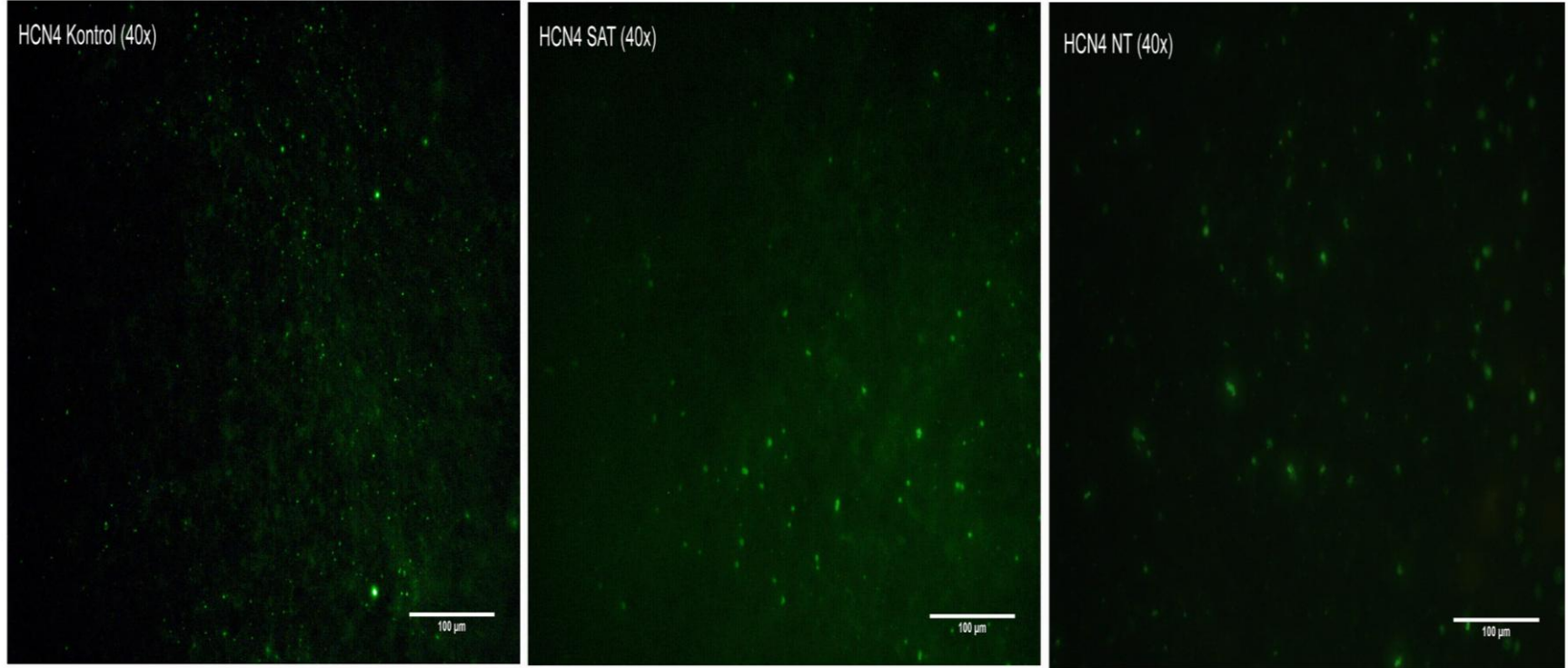


Şekil 5. HCN₂ iyon kanalının 40x büyütmeli fotoğrafı

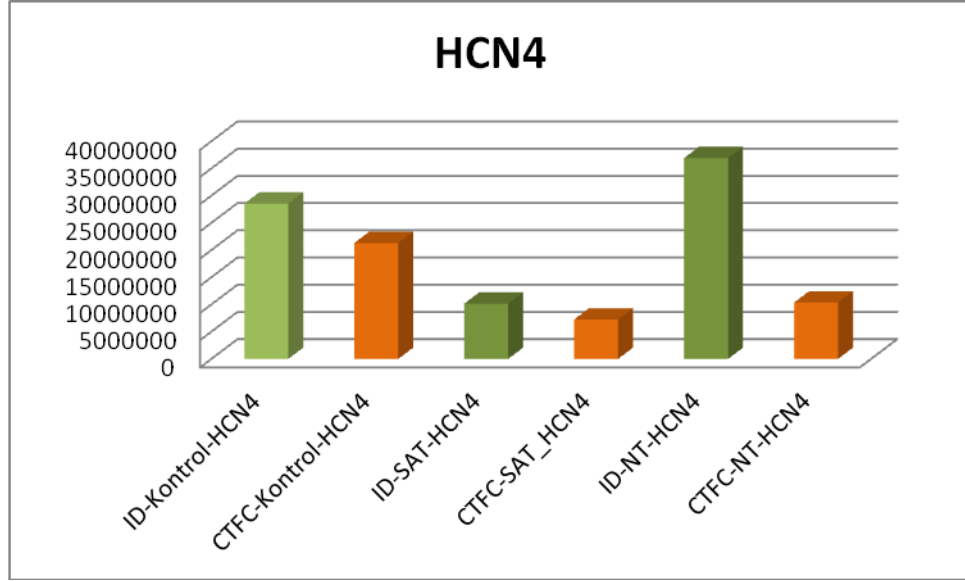


Şekil 6. HCN₂ iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu

HCN₂ iyon kanalı için kontrol gurubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu ile SAT grubu ve NT grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu karşılaştırıldığında sırasıyla 12,01 kat, ve 4,47 kat azalma olduğu görüldü.

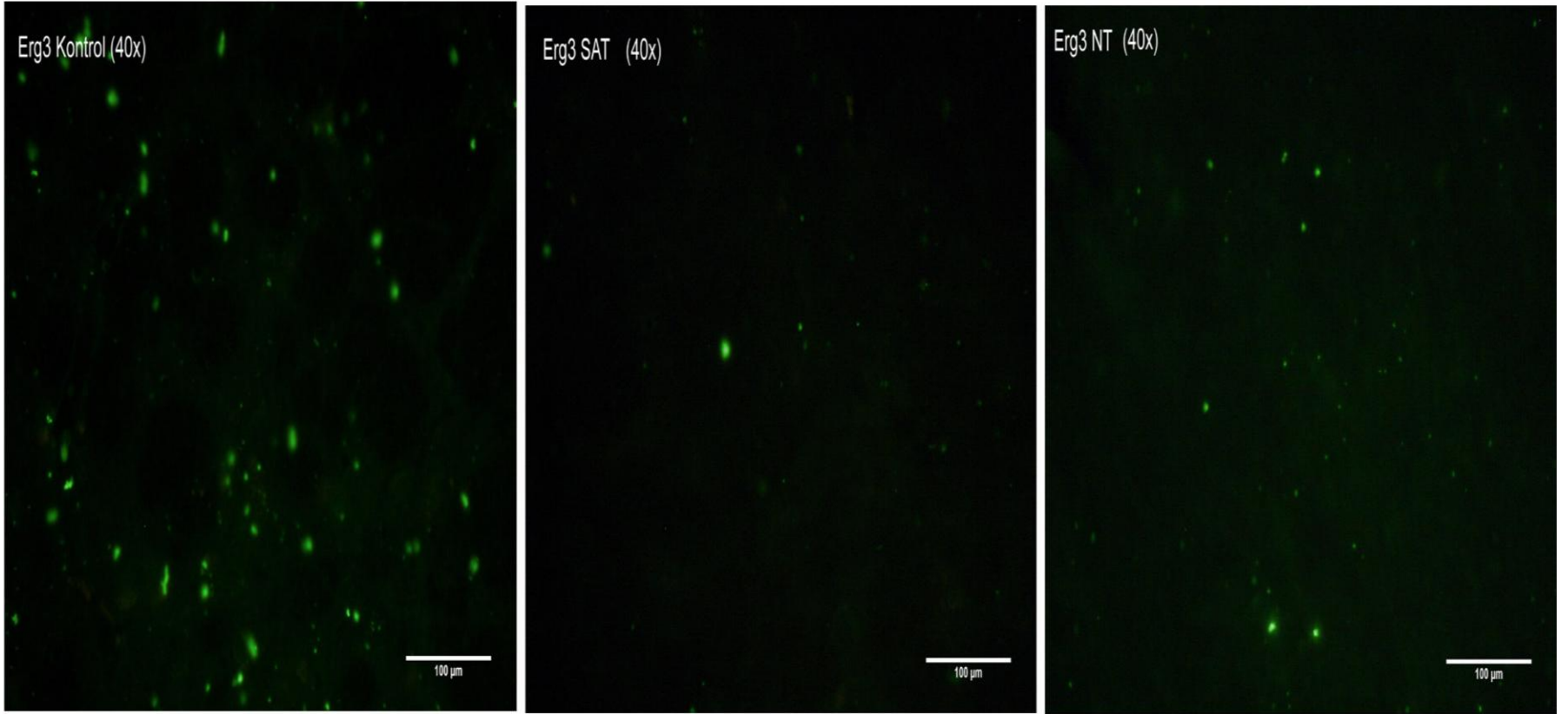


Şekil 7. HCN₄ iyon kanalının 40x büyütmeli fotoğrafı

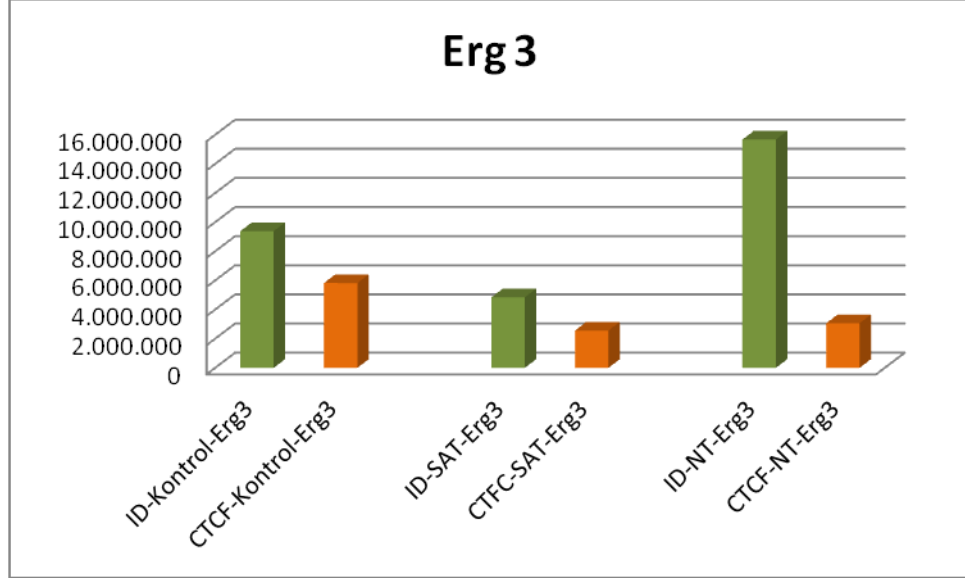


Şekil 8. HCN₄ iyon kanalının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu

HCN₄ iyon kanalı için kontrol grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu ile SAT grubu ve NT grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu karşılaştırıldığında sırasıyla 2,93 kat, ve 2,05 kat azalma olduğu görüldü.

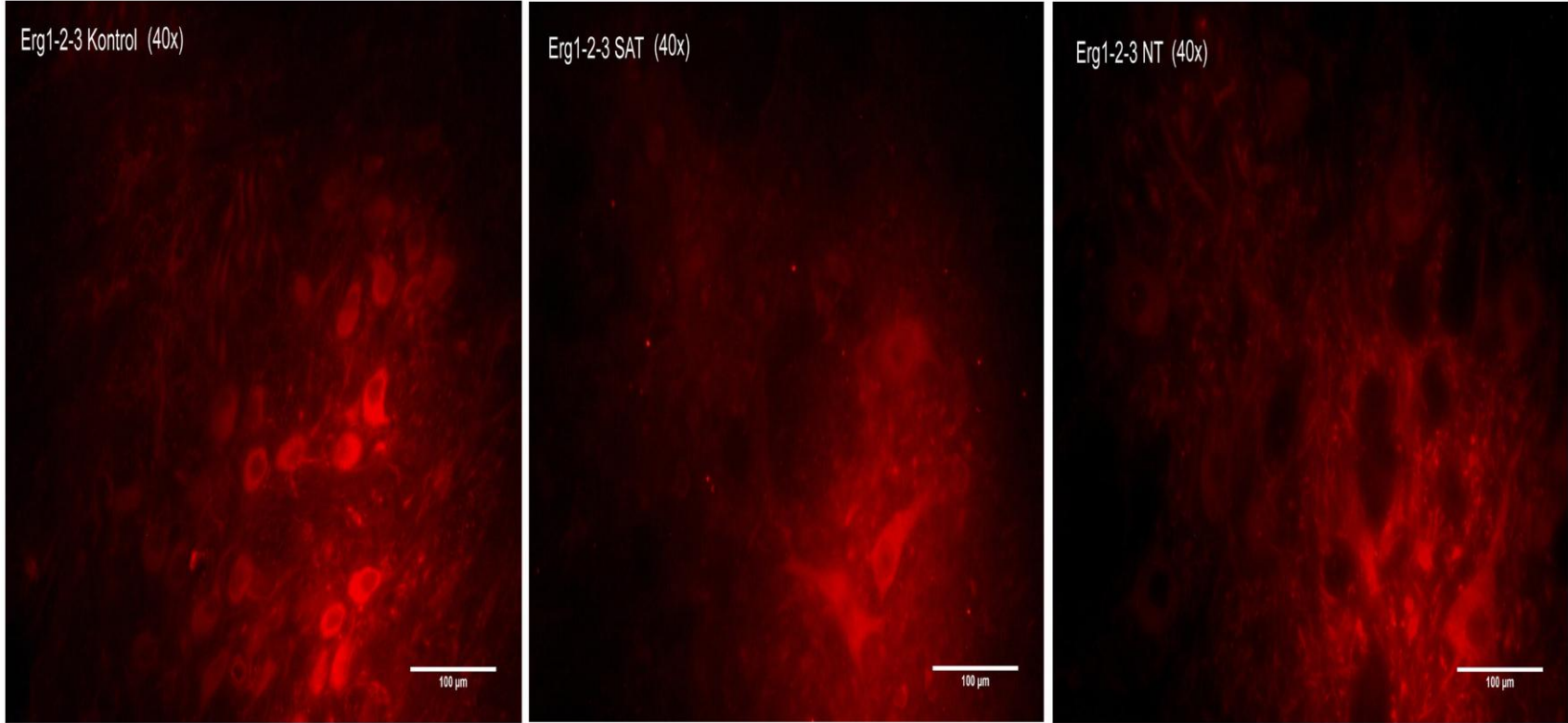


Şekil 9. Erg 3 iyon kanalının 40x büyütme fotoğrafı

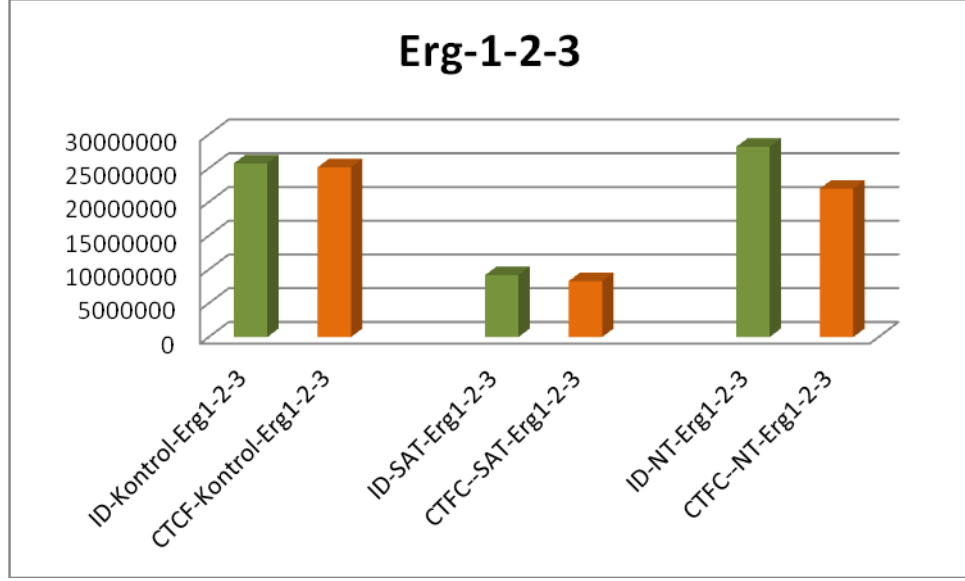


Şekil 10. Erg 3 iyon kanallarının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu

Erg3 iyon kanalı için kontrol grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu ile SAT grubu ve NT grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu karşılaştırıldığında sırasıyla 2,27 kat ve 1,9 kat azalma olduğu görüldü.



Şekil 11. Erg 1-2-3 iyon kanallarının 40x büyütme fotoğrafı



Şekil 12. Erg 1-2-3 iyon kanallarının gruplara göre düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu

Erg1-2-3 iyon kanalı için kontrol grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu ile SAT grubu ve NT grubunun düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu karşılaştırıldığında sırasıyla 3,03 kat ve 1,143 kat azalma olduğu görüldü.

6. TARTIŞMA

6.1. Kulak Çınlamasının Nüfusla İlişkisi

Kulak çınlaması, her hangi bir akustik kaynak ya da elektriksel uyarım olmadığı durumlarda hayali seslerin algılanmasıdır. Merkezi nöropatik ağrı gibi kulak çınlaması da işitme sisteminin hayali bir fenomeni olarak kabul edilir (154). Genel yetişkin nüfusun ortalama % 5-15'i bu durumu yaşamaktadır. Bunun yanında Avrupa nüfusunun %7-14'ünde (155), Amerika yetişkin nüfusunun % 25,3'ünde (50 milyonda) görülmektedir ve % 7,9 'da (16 milyon) ise bu durumu sıklıkla yaşandığı belirtilmektedir (6-8, 10, 156-158). Yaşlanmayla beraber prevalansının arttığı bilinirken cinsiyete göre de değiştiği bilinmektedir. Johansson ve arkadaşları tarafından erkeklerde kadınlardan daha fazla görüldüğü tesbit edilmiştir (157). Ancak Baigi ve arkadaşları ise gürültünün genç yaştaki insanları da etkilediği ve hatta İskoçya'da yaşayan genç bayanlarda kulak çınlamasının yine genç yaştaki erkeklere oranla iki kat daha fazla görüldüğünü bildirmiştir (159). Yapılan bazı çalışmalarda kulak çınlamasına sahip olan bireylerin %17,5'inin 60 yaş ve üzeri bireyler olduğu bildirilirken(160), bazılarında ise 40'lı yaşlardan (%6,6) 50'li yaşlara (12,5) doğru görülme sıklığının iki katına çıktığı ve 60'lı yaşlarda (14,3) pik seviyesine ulaştığı bildirilmiştir (158). Bununla birlikte, % 1-3'lük kısmın önceden de belirtildiği gibi yaşam koşulları olumsuz yönde önemli derecede etkilendiğine değinen çalışmalar da mevcuttur (156, 157, 159).

6.2.Hayvan Davranış Testinin Değerlendirilmesi

Kulak çınlamasının oluşum mekanizması tam olarak çözülememiştir. Ancak birçok araştırmacı tarafından patofizyolojisine yönelik çeşitli hipotezler ortaya konmuştur. Yapılan literatür taramasına göre nörobiyolojik temellerinin altında merkezi sinir sisteminin anormal spontan aktivite ve yeniden düzenlenme göstermesi yatmaktadır (161-165). Ancak beyinin dorsal prefrontal cortex, anterior cingulate cortex ve hippocampus gibi işitme sistemiyle ilgili olmayan yapılarının da kulak çınlamasının oluşumunda yer alabildiği belirtilmiştir (166-169).

Lenarz ve arkadaşlarına ve Stolzberg arkadaşlarına göre kulak çınlaması işitme sisteminde değişmiş spontan aktivitenin bir sonucudur. Genellikle periferik işitme sisteminde meydana gelen patolojik olayların sonucunda merkezi sinir sisteminde değişmiş spontan girdilerin oluşması ile tetiklenir. Ayrıca patolojik olarak zarar görmemiş işitme sistemi yapıları da ilişkili olabilir (156, 170).

Turner ve arkadaşlarına göre ise plastik değişikliklerin görüldüğü merkezi sinir sisteminde azalan afferent girdilerin sonucunda oluşur. Spiral ganglion hücrelerinin kademeli olarak azaldığı bilinen cochlear nucleus çalışmalarında fizyolojik ve davranışsal olarak kulak çınlaması olduğu bilinen hayvanlarda görülen kulak çınlaması kaybolan baskılanmayla ve ya artan uyarıcı olaylarla ilişkilidir (158, 171-173). Periferik girdilerin değişen profili ve algılanan hayali seslerin frekansı arasındaki ilişki hala belirsizliğini korumaktadır. (156)

Hayvan kulak çınlaması modelleri, akustik travma ya da ilaç ile oluşturulan kulak çınlamasının patofizyolojik mekanizmaların araştırılması, bunların altında yatan nedenlerin ortaya çıkarılması ve bu rahatsızlığa karşı yeni

ilaç tedavilerinin denenmesi için geliştirilmiştir (46, 174). Bunlardan biri işitilen hayali seslerin fizyolojik temellerinin araştırılmasını kolaylaştırmak için Jastreboff ve arkadaşları tarafından geliştirilen ratlarda farmakolojik olarak oluşturulan kulak çınlaması modelidir (65). Bu modelde tek ve yüksek doz salisilatın sistemik olarak uygulanmasından sonra ratlarda güvenilebilir geçici bir kulak çınlaması oluşur (31, 95,175, 176).

Çeşitli hayvan davranış testi kullanılarak Sprague-Dawley ratlarda salisilatla oluşturulan kulak çınlamasının yaklaşık 16 kHz frekansta olduğu belirlenmiştir. (3, 95, 175). Ancak çalışmamızda Wistar Albino ratlara tek doz 350mg/kg salisilat intra peritoneal yolla uygulanarak 10 kHz frekansa sahip 60 dB SPL saf ses kullanılmış ve ortalama 0,62 SR oranıyla 10 kHz frekansta kulak çınlaması olduğu gözlemlenmiştir.

Salisilatla oluşturulan kulak çınlaması modelinde kulak çınlaması daha kolay oluşturulurken, aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması modelinin Cooper, Bauer ve Brozoski'ye göre insanlarda oluşan kulak çınlaması ile daha yakın ilişkili olduğuna inanılmaktadır (35, 177). Ek olarak tek kulaktan aşırı gürültüye maruz kalan ratların 17 ay kadar uzun süren bir kulak çınlaması yaşadığı bilinmektedir (178).

Çeşitli frekans aralıklarında 110 dB SPL ve üzerinde sesin cochlea ve merkezi sinir sistemi üzerinde etkilerine bakılmış olmasına rağmen Kujawa ve Liberman fareleri 2 saat boyunca 8–16 kHz frekans aralıklarında 100 dB SPL sese maruz bırakmış ve bu sesin spirial ganglion üzerinde negatif etki gösterdiğini bulmuştur. Çalışmamızda Wistar Albino ratlar 3 saat süreyle 10 kHz 110 dB SPL

aşırı gürültüye maruz bırakılmış ve ortalama 0,77 SR gibi yüksek bir oranda kulak çınlaması olduğu belirlenmiştir (179).

6.3. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının İyon Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Aspirinin aktif bileşeni olan sodyum salisilat analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar olarak çokça kullanılan bir ilaçtır(155, 180). Yüksek dozda salisilat kullanımının insanlarda geriye dönüşümlü bir kulak çınlaması oluşturduğu bilinmektedir (181). Zaten yüksek dozdaki salisilatın işitme sistemi üzerine olan ana etkisi doza bağımlı, geriye dönüşümlü bir işitme kaybına ve kulak çınlamasına neden olmaktadır. Asıl mekanizması prostaglandin sentezini engelleyerek, prostaglandin tarafından ortaya çıkan ateşi ve yangıyı bloke etmektir (155, 180). Bununla birlikte salisilat ototoksitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların birçoğunda araşidonik asidi prostaglandin H₂'ye çeviren siklooksijenaz enziminin (COX) bloke edildiği gösterilmiştir (155, 182-185). Yine literatür bilgilerine dayanarak salisilatın COX aktivitesi engellenmesinden dolayı ortamda araşidonik asit birikimi meydana geldiğini ve araşidonik asit artışının ise NMDA reseptör akımını etkileyerek işitme sinirinde artmış bir spontan aktivite oluşturduğunu görmekteyiz.

Bunun dışında hem periferik hem merkezi fizyolojik etkiler gösterir. Dış tüy hücrelerinin fonksiyonunu bozarak işitme sistemi üzerinde dönüşümlü işitme kaybını tetiklemesi en önemli ve özgün özelliklerinden birisidir (186). İşitme kaybına neden olan mekanizma salisilatın motor proteini olan prestin ile direkt

etkileşmesi ve dış tüy hücrelerinin elektromotilitesinde hasar oluşturarak başka bir deyişle bu hücrelerin hareket yeteneğini azaltarak işitme sinirine sinyal geçişini azaltmasıdır (74, 155, 187-191).

Salisilatın merkezi sinir sisteminin hangi bölümünü nasıl etkilediğini araştırmak amacıyla, cochlea, işitme siniri, cochlear nucleus, inferior colliculus ve işitme korteksini kapsayan bir çok çalışma yapılmıştır (181). Bu çalışmalar sonunda ortaya çıkan bilgi birikiminden ortaya farklı sonuçlar çıkmıştır. Bunlardan bazıları nöronal aktivitenin hem periferde hem de merkezi işitme sisteminde arttığını belirtir (181). Örneğin Manabe ve arkadaşlarının kobay inferior colliculus nöronlarından yaptıkları ekstrasellüler kayıtlarda spontan uyarımın arttığını bulmuşlardır. Bu sonuç Eggermont'un uyanık kedilerin işitme korteksinden, Stypulkowski'nin kedilerin işitme sinirinden aldığı sonuçları desteklemektedir (72, 87, 192). Diğerleri ise salisilatın periferal işitme sistemine olan etkisinin beyine giden sinyallerin transdüksiyonunu azaltması olduğunu, buna rağmen akut sistemik salisilat uygulamasına maruz kalan işitme cortex'inin paradoksal olarak aşırı uyarım gösterdiği yönündedir (193). İşitme korteksindeki bu uyarım artışı salisilatın direkt olarak baskılayıcı mekanizmayı azaltmasına bağlanmaktadır (194, 195). Zhang ve arkadaşlarının çalışması baskılayıcı mekanizmanın azalmasını destekleyici niteliktedir. Elde ettikleri bulgulara göre salisilat işitme korteksinde inhibitör (GABAerjik) nörotransmisyonunu azaltmıştır. Ayrıca yaptıkları in vivo ekstrasellüler kayıtlarda nöronlar arası cevap sıklığının azalması gibi bu bilgiyi destekleyici kanıtlar elde etmişlerdir (181). Ayrıca gerbillere uygulanan sistemik salisilat sonrasında bileşik aksiyon potansiyeli eşiklerinde artış görülmüştür. Bu bilgiler beraber gözden geçirilirse

periferden gelen uyarıların salisilat tarafından azaltılması yüksek doza bağımlı işitme kaybını işaret eder. Diğer taraftan artan aktivitenin en çok AC'de olduğu insanlarda ve ratlarda gösterilmiştir. Gerbillerde sistemik salisilat uygulanması merkezi işitme sistemindeki aktivitenin değişik şekilde oluştuğu izlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırılan deney grubu gerbillerin beyinsapı ve orta beyin nucleus'larında aktivitenin azaldığı, beyin korteksinde arttığı görülmüştür (186). Ancak Wei ve arkadaşları DCN fusiform hücreleri üzerine tinnitusta görülen konsantrasyonda salisilat uygulandığında ateşleme oranının azaldığını görmüşlerdir (196).

Ayrıca diğer elektrofizyolojik çalışmalar göz önüne alındığında işitme korteksi nöronlarından yapılan whole cell patch clamp ile salisilatın post sinaptik akımları azalttığı görülmüştür (197).

Im ve arkadaşlarının salisilat ototoksitesi oluşturulmuş farelerin cochlea'larından yapılan DNA microarray çalışmasında, 32, 381 genin ekspresyonu incelenmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırılan deney grubunda biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan 87 gen ekspresyonunun arttığı, 140 tanesinin ise iki ya da daha fazla kat azaldığı bulunmuştur. Özellikle Kcne2 ve Aqp11 genlerinin iki kat arttığı belirtilmiştir (198). Ancak yaptığımız çalışmada HCN1, HCN2, HCN4, SCN1A, SCN2A1, SCN3A, TRPM2, TRPM7, KCNH2, KCNH7, CACNA1B genlerinin sırasıyla 0.35, 0.44, 0.27, 0.11, 0.13, 0.14, 0.14, 0.22, 0.43, 0.18 ve 0.08 kat azaldığı bulunmuştur. Bu da salisilatın periferik sinir sisteminde ve merkezi sinir sisteminde farklı yapılar üzerine farklı etkilerinin olduğunu ayrıca farklı mekanizmalarla etki gösterdiği fikrini destekler. Bunun dışında salisilatla oluşturulan kulak çınlaması modellerinde merkezi sinir

sisteminin özellikle değişik bölgelerinde, iyon kanalı ekspresyonu ya da uyarıcı/baskılayıcı mekanizma ile dolaylı yoldan ilişkili bazı genlerin ekspresyonunun değiştüğünü gösteren literatür bilgi mevcuttur. Örneğın salisilat uygulamasından sonra Basta ve arkadaşları ve Mahlke ve arkadaşlarının hem fikir olduğu gibi c-fos ekspresyon artışı prefrontal cortex ve limbic yapılarda görülür (186,199). Zheng ve arkadaşlarına göre ise normal rat cochlear nucleus'unda cannabinoid CB1 reseptörlerine sahip principal nöronların fazla sayıda olmasına rağmen, salisilat uygulamasından sonra kulak çınlaması hayvan davranış testiyle kanıtlanmış hayvanların ventral cochlear nucleus'unda CB1 reseptörünü eksprese eden principal nöronların önemli derecede azaldığı, bunun aksine dorsal cochlear nucleus'taki CB1-pozitif principal nöronları sayıca değişikliğe uğramadığı belirtilmiştir (200). Literatür bilgilerin ışığı altında merkezi sinir sistemindeki plastik değişiklikleri incelerken birbirleri ile bağlantılı olabilecek yapı ve ekspresyon değişikliğinin beraber bir bütün olarak incelenmesi gerektiği sonucunu çıkarıyoruz.

6.3.1. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Potasyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Yapılan literatür taramasında elektrofizyolojik bulguların, salisilatla oluşturulan kulak çınlamasının aydınlatılmasında öncül basamak görevi yaptığı görülmüştür. Şöyle ki salisilatın sistemik uygulanmasından sonra merkezi işitme sisteminde iyon kanalları aracılığıyla oluşturabileceği etkiler, yapılan doku kesitlerine belirli dozlarda perfüze edilen salisilat solüsyonu yardımıyla önceden

gözlemlenmiştir. Bu amaçla özellikle aksiyon potansiyelinin oluşumu ve devamı için önemli olan voltaj kapılı iyon kanalları üzerine çalışılmıştır.

Voltaj kapılı potasyum kanalları bütün beyin bölgelerinde genişçe eksprese edilir ve nöronlarda çeşitli hücrel olayların düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bunlardan bazıları hücre zarı dinlenim potansiyelini ayarlamak, repolarizasyonu oluşturmak, aksiyon potansiyelinin zamanını ayarlamak ve ilk aksiyon potansiyelinden sonra gelen uyarım arasındaki gecikmeyi sağlamaktır (201). Liu ve Li IC nöronları üzerine uyguladıkları farklı dozlarda salisilatın etkilerine bakmış ve 1mM salisilatın voltaja bağımlı dengeli durum aktivasyonunu ya da dengeli durum inaktivasyonunu önemli derecede değiştirmedeğini görmüşlerdir. Bununla birlikte potasyum akımının zayıfladığını ve inaktivasyon kinetiğinin değişmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar dört şekilde yorumlanmıştır. Bu yorumlardan biri IC nöronlarındaki bazı potasyum kanallarının sayısı azalmasına bağlanmıştır. Diğer muhtemel sonuç bazı kanalların özelliğinin salisilat tarafından değiştirilmesidir. Hiperpolarizasyonda görülen kaymaların nedeni ise potasyum kanallarının sayısının azalmasından ziyade bu kanalların biyofiziğinin değişmesi olarak yorumlanmıştır. Potasyum akımlarının azalmasının IC nöronlarındaki uyarılmayı arttırdığı yorumuna varılmıştır (202). Yaptığımız çalışmada yukarıda bahsi geçen bilgilere uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Voltaj kapılı potasyum kanallarından olan $K_{V11.1}$ -Erg1 (KCNH2) ve $K_{V11.3}$ -Erg3 (KCNH7) kanalı mRNA'larının kontrol gruplarına göre sırasıyla 0.43 ve 0.18 kat azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan floresan immunohistokimya analizine göre deney grubuyla kontrol grubu arasında düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu $K_{V11.1}$ için 3,03, $K_{V11.3}$ için 2,27 kat azalmıştır. Her iki analizden elde edilen

sonuçlar dinlenim potansiyelinin bozulduğuna ve cochlear çekirdek bölgesinde bir ağırı uyarımın olduğuna işaret eden bulgulardır. Elde edilen bulguların literatürle uyumlu olduğunu görülmektedir.

6.3.2. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak ınlamasının Voltaj Kaplı Kalsiyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Liu ve arkadaşlarının inferior colliculus nöronlarında yaptığı elektrofizyolojik çalışmada doza bağımlı olmak üzere L tipi kalsiyum kanallarının akımlarını azalttığı bulunmuştur. 1mM konsantrasyondaki salisilat inaktivasyon eğrisini hiperpolarizasyon ynnne kaydırmaştır. Salisilatın bu tür bloke edici etkisi inaktif ya da dinlenim halindeki L tipi kalsiyum kanallarına bağlanmasına yorulmuştur. Ayrıca kulak ınlamasındaki rolünün, azalmış L tipi kalsiyum kanalı akımı aracılığıyla GABA salınımının azalması ve dolaylı olarak GABA aracılı inhibisyonun azalması olduğu belirlenmiştir (203). Yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanalları L, N, P/Q ve R tipi kalsiyum kanallarıdır. L tipi kalsiyum kanalları uyarılabilir hücrelerde depolarizasyona cevap olarak uzun süreli kalsiyum akımlarının oluşturur. Bu kanalların sağladığı kalsiyum hücre içi sinyallerin başlamasına neden olurken, aynı zamanda nöronlarda aksiyon potansiyelini takiben hiperpolarizasyonun oluşmasından sorumludur. Başka bir özellik olarak GABA gibi nörotransmitterlerin salınımını düzenleyen en önemli kalsiyum kanalı tipidir (203). N tipi kalsiyum kanalları ise özellikle presinaptik sinir ularına lokalize olmuştur ve sinaptogenez ve nörotransmisyonunda anahtar olaylara aracı olur. Özellikle *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) reseptör (SNARE) proteini, syntaxin-1A ve SNAP-25'in bağlanma

bölgelerine sahiptir (204, 205). Yaptığımız çalışmada salisilat ve aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlamasında $Ca_v2.2$ (Cacna1B) iyon kanalı mRNA'larının kontrol grubuna göre sırasıyla 0.08 ve 0.09kat azaldığını görüyoruz. Bu sonuç Chen ve arkadaşlarının inferior colliculus nöronlarında yaptığı elektrofizyolojik değerlendirmelerde, dışarıdan uygulanan kalsiyum takviyesinin spontan aktivitedeki artışı iptal etmesini destekler niteliktedir (59).

6.3.3. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Voltaj kapılı sodyum kanalları ise tüm nöronlarda iletim ve uyarım için hayati öneme sahiptir. Çoğu uyarılabilir hücrede aksiyon potansiyelinin hızlı yükselen fazının ve inen fazının ilk bileşenidir. Aksonlar üzerindeki aksiyon potansiyelinin eşik değerini belirler. Tekrarlanan ateşlemelerin frekansını ve zamanını etkiler. Sodyum tarafından aktive edilen presinaptik sinir uçlarından nörotransmitter salınımını ayarlar. Hiperpolarize durumda kapalı olarak bulunurlar. Hücre zarı depolarize olduğunda kanal kısa bir süre açık kalır ve sonra inaktif duruma geçer. İnaktif durumda tekrar açılmazlar. Tekrar açılabilmesi için bir dinlenme süresine ihtiyaçları vardır. Açılma yeteneğini tekrar kazanmaları için hücre zarının hiperpolarize zar potansiyeline geçmesi gerekmektedir. Liu ve arkadaşlarına göre salisilatın bloke edici etkisi muhtemelen bu dönemde yani hücre zarı dinlenme durumundayken gerçekleşir. Kanallara açık oldukları zaman da bağlanabilmesine rağmen aktivasyon sürecinin voltaja bağımlılığını etkilemez. Ayrıca rat inferior colliculus kesitlerine değişik dozlarda (0.1, 0.3, 1, 3 ve 10 mM)

salisilat uygulandığında sodyum akımlarının genliğinde doza uygun olarak azalmalar görülmektedir (206).

Liu ve arkadaşlarının aksine, Zheng ve arkadaşları antiepileptik bir ilaç olan carbamazine'nin doza bağımlı olarak insanlarda kulak çınlamasını iyileştirdiğini göstermişlerdir. Mekanizma olarak da voltaj kapılı sodyum kanallarının bloke ederek bu iyileşmeyi sağladığını bildirmişlerdir (207). Bizim çalışmamızda salisilata oluşturulan kulak çınlamasında SCN1A, SCN2A1 ve SCN3A mRNA'larında sırasıyla 0.11, 0.13 ve 0.14 oranında azalma görülmüştür. Bu bulgular Liu ve arkadaşlarının sonuçlarını desteklerken, Zheng ve arkadaşlarınıninkine ters düşmektedir. Eğer salisilat ile oluşan kulak çınlamasının nedeni voltaj kapılı sodyum kanallarının bloke edilmesi ise, aynı mekanizma ile çalışan carbamazin'in salisilata karşı koruyucu etki göstermesini anlamak biraz güçtür.

6.3.4. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak Çınlamasının HCN Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

HCN kanallarının yetişkin fare ve rat beyinlerinin değişik bölgelerinde değişik ekspresyon şekline sahiptir. Yapılan immunohistokimyasal analizlerde HCN1-2 cochlear nucleus'ta, HCN3-4 ventral cochlear nucleus'ta eksprese olduğu görülmüştür. Bununla birlikte HCN2 mRNA'larının ekspresyonu tüm beyinde fazla miktarda görülürken, diğer üç HCN kanalının sınırlı ve genellikle birbirini tamamlayıcı tarzda eksprese edilir. Örneğin HCN1 mRNA'ları en fazla neocortex, hippocampus, cerebellar cortex ve superior colliculus'ta eksprese edilirken HCN3 mRNA'ları hypothalamus ve HCN4 mRNA'ları medial habenula,

thalamus ve ventral cochlear nucleus'ta eksprese edilir (208, 134). Wilson ve Garthwaite, DCN'de nitrik oksit reseptör ilişkili guanil siklaz ve nitrik oksit sentetazın varlığını immunohistolojik olarak göstermişlerdir. Her iki bileşenin NO-cGMP sinyal yolağındaki varlığı ve aynı zamanda HCN kanallarının aynı yaştaki DCN nöronlarında bulunması nitrik oksitle aktive olan cGMP sinyallerinin HCN kanallarını çalıştırarak nöronal fonksiyonları değiştirdiği hipotezini savunmuşlardır. Dolaylı olarak nitrik oksitin değişik nöron tiplerinde dinlenim potansiyeline katkıda bulunduğu söylenebilir (209). Basta ve arkadaşları yaklaşık % 50 CN nöronunun değişen spontan ateşleme oranının nitrik oksit sentetaz eksprese eden nöronların sayısının % 50 oranında artmasıyla uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sistemik salisilat uygulamasından sonra c-fos pozitif hücre sayısının arttığı bildirilmiştir (199). Ayrıca Zheng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sistemik salisilat uygulanmış ratların hem VCN'da hem de DCN'da nitrik oksit sentetaz üreten hücrelerin sayısının arttığı bulunmuştur (210). Bizim çalışmamızda bulduğumuz immunohistokimya ve Gerçek Zamanlı PZR bulguları, normal şartlarda beyinsapında eksprese edilen HCN1-2-4 iyon kanalı mRNA'larının 0.35, 0.44 ve 0.27 kat oranında azaldığı yönündedir. Ayrıca yapılan floresan immunohistokimya analizine göre SAT grubuyla kontrol grubu arasında düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu HCN1-2-4 iyon kanalı için sırasıyla 3,09, 12,01, 2,93 kat azalmıştır. Bu sonuçtan salisilatla oluşturulan kulak çınlaması durumunda HCN kanallarının azalmasıyla dinlenim potansiyeli için geçen sürenin artabileceğini ya da dinlenim potansiyeline tam yaklaşmadığını ek olarak bu kanalların aktivitesini kompanze edebilmek için nitrik oksit sentetaz üreten hücrelerin arttığını ya da nitrik oksit sentetazın arttığını düşünebiliriz.

6.3.5. Sodyum Salisilatla Oluşturulan Kulak ınlamasının TRPM Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Salisilatın siklooksijenaz aktivitesini baskı altına alıcı etkisinin TRPV1 aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak Kizawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sistemik salisilat uygulamasından sonra spiral ganglion'da, DCN'de ve AC'de TRPV1 mRNA'larının ve proteinlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Şöyle ki salisilat uygulamasından 2 saat sonra TRPV1 mRNA miktarı spiral ganglion'da 2.39, DCN'de 0.53 artarken AC'de herhangi bir artış görülmemiştir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında salisilatla oluşan kulak çınlamasında spiral ganglion'da TRPV1 aktivasyonun katkısı olduğu anlaşılmıştır.

(3) Yaptığımız çalışmada serbest radikal grupları tarafından aktive olan TRPM2 kanallarının kontrol grubuna göre 0.14 kat azaldığı bulunmuştur. Uddasin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan esinlenerek salisilatla oluşturulan kulak çınlamasında, salisilatın bir tuzak görevi yaptığını ve böylece ortamdaki serbest radikalleri bağlayarak uzaklaştırmış olduğu sonucuna gidebiliriz. Ortamdaki serbest radikal azalması ise TRPM2 kanal ekspresyonlarını azaltıcı etki yapmış olabilir. Ayrıca çalışmamızda TRPM7 kanallarının kontrol grubuna göre 0.22 kat azaldığını görmekteyiz. TRPM7 kanallarının aktivasyon mekanizmasının tam olarak bilinmemesinden dolayı siklooksijenaj aktivitesinin azalmasının bu kanalların aktivasyonunu azaltabileceğini düşünebiliriz.

6.4. Farmakolojik Olarak Oluşturulan Kulak Çınlama Modellerinin Karşılaştırılması

Farmakolojik olarak oluşturulan kulak çınlama modellerinden salisilatla, kinin ve carboplatin modelleri karşılaştırıldığında oluşturdukları klinik tablonun aynı, gösterdikleri ototoksik etki mekanizmalarının birbirinden farklı olduğu görülür. Kininin etki mekanizmalarından biri cochlea'da vasokontrikson oluşturarak kan akımını hızı ve miktarını değiştirmektir. Diğerleri ise iyon kanalları ile ilgilidir. Kalsiyum ve kalsiyuma bağlı potasyum kanallarıyla etkileşime girdiği bilinmektedir. (155) Ochi ve Eggermont'a göre ise kinin voltaj kapılı potasyum kanallarının etkili bir blokörüdür ve spiral ganglion hücrelerine giden aksiyon potansiyelini azalttığı için spiral ganglionu direkt etkiler. Çünkü hem hücre içine hem de hücre dışına olan potasyum akımı etkilenir (211). Kenmochi ve Eggermont'a göre ise kortikal hücrelere uygulanan kinin ve sodyum salisilatın kalsiyum ve potasyum kanallarının iyon geçirgenliğini birbirinden farklıdır. Salisilat kalyuma bağımlı potasyum kanallarını aktive ederken hücre içi serbest kalsiyum miktarını arttır, kinin ise kalsiyuma bağımlı potasyum kanalları bloke ederken hücre içi serbest kalsiyum miktarını arttır. Her iki ilaç da doza bağlı olmak üzere birincil işitme korteksindeki ateşleme oranını arttırır (212). Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulgular Ochi ve Eggermont'un bulgularını destekleyen, Kenmochi ve Eggermont'un salisilat ile bulgularına ters düşen niteliktedir.

Salisilat ile platin tabanlı antikanser ilacı carboplatinin karşılaştırıldığında ise her ikisinin de tüy hücrelerine sitotoksik olduğu görülür. Hem periferik hem de merkezi sisteminde yapmış oldukları hasarın doza bağımlı olduğu ve merkezi sinir

sistemindeki baskılayıcı nörotransmitter salınımını azalttığı bulunmuştur. Şöyle ki carboplatin Chinchilla tavşanına sistemik olarak uygulandığında doza bağımlı olarak tüy hücrelerini yıkımlar. Yüksek kabul edilen, 200 mg/kg'lık dozun sistemik olarak uygulanması hem iç tüy hücrelerini hem de dış tüy hücrelerinin dejenerasyonuna sebep olur. Tam tersi olarak, orta dozda 75–150 mg/kg uygulandığı zaman seçici olarak iç tüy hücrelerine zarar verirken, dış tüy hücrelerine zarar vermez. Carboplatin ayrıca cochlear nucleus'a sinir lifleri gönderen tip I spiral ganglion hücre sayılarını azaltır. Bu liflerde görülen kayıp cochlear nucleus'un hacminde değişime neden olmazken, ventral cochlear nucleus'ta glutamat, aspartat ve GABA konsantrasyonlarını, dorsal cochlear nucleus'ta ise GABA konsantrasyonunu azaltır. Nörotransmisyonunda görev yapan uyarıcı ve baskılayıcı sinir liflerinin kaybı ve bunlarla ilişkili amino asitlerin azalmasının nöronal yeniden organizasyonu nasıl etkilediğine bakılmış ve sinir liflerinin ve presinaptik uçların büyümesi ile ilgili bir markır olan GAP-43 ekspresyonu araştırılmıştır. Carboplatin ile oluşturulan tüy hücresi kaybıyla, ipsilateral VCN'de GAP-43 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Ancak bu artış ilaç uygulanmasından sonraki 3. ve 7. değil, 15. ve 31. günde görülmüştür (213).

6.5. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının Değerlendirilmesi

Merkezi sinir sisteminin düzenli olarak çalışması uyarıcı ve baskılayıcı girdilerin dengeli bir şekilde idare edilmesiyle mümkündür. Bu dengenin herhangi bir nedenden dolayı bozulması fizyolojik olarak önemli sonuçlar doğurur. Örneğin akustik travmadan sonra bu sistemde oluşan dengesizlik tonotopinin

organizasyonunu etkileyerek spontan aktivitenin değişmesine neden olur (48, 56, 214,215).

Aşırı gürültüyle oluşturulan işitme kaybının sıklıkla tüy hücreleri kaybı ve ya stereocilia hasarı gibi cochlear patolojilerle ilişkili olduğu bilinse de, kulak çınlamasındaki yapısal değişlikleri neyle ilgili olduğu henüz çok iyi anlaşılammıştır. Aşırı gürültüye maruz kalmanın neden olduğu periferel işitme eşiği kaybının, cochlear nucleus, inferior colliculus and cortex gibi merkezi işitme sistemi seviyelerinde spontan aktivite artışı oluşturduğu açıkça gösterilmiştir. Bu spontan hiperaktivite dış kaynaklı sesin yokluğunda işitilen sesin bir substratı olarak önerilmiştir (216).

Kulak çınlamasının oluşumunda önemli bir yer tuttuğu varsayılan yapılardan biri de DCN'dir. Fizyolojik olarak kulak çınlaması olduğu kanıtlanan hayvanların DCN'unda yükselmiş bir spontan nöronal aktivite rapor edilmiştir. Bununla birlikte, aynı hayvanlarda DCN'nin cerrahi olarak uzaklaştırıldığı durumlarda kulak çınlamasının azalmadığı tesbit edilmiştir. DCN'de meydana gelen birçok fizyopatolojik değişikliğin kulak çınlamasının oluşmasında önemli anahtar bir nokta olduğu hipotezi ortaya çıkar. Ancak elektrofizyolojik bulgular ve lezyonlardan elde edilen veriler DCN'nin kulak çınlamasını üreten yer olmaktan ziyade bu sürecin başlaması için gerekli tetikleyici bir bölge olduğu fikrini savunur. Diğer araştırmacıların da hem fikir olduğu gibi DCN'de görülen nöronal aktivite artışının merkezi sinir sistemindeki baskılayıcı mekanizmanın ve yeniden düzenlenmenin azalmasına bağlı olduğu düşünölmektedir. Ayrıca bu hiperaktivitenin azalan baskılanmayla uyumlu olarak artan somatosensorik uyarımla ilgili olabileceği olası bir düşüncedir (9).

Kulak çınlaması oluşturan ajanların DCN nöronlarını hiperaktif duruma getirdiği göz önüne alınınca, DCN ile kulak çınlaması arasındaki ilişki daha resmi bir boyut kazanmaktadır. Orijinal gözlemler yoğun sese maruz bırakılan hamsterlarda yapılmıştır. Buna benzer aşırı gürültüyle oluşturulan aktivite artışının rat, fare, chinchilla tavşanı ve kobayları da içeren başka türlerde de oluştuğu bulunmuştur. Kaltenbach ve arkadaşlarının 10 kHz 125–130 dB SPL yoğun sese 4 saat maruz bıraktıkları rat ve hamsterların DCN’sinden 1 ay sonra aldıkları elektrofizyolojik kayıtlarda kontrol hayvanlara oranla gözle görülür derecede yüksek genlikte ve daha sık aksiyon potansiyeli oluştuğunu göstermişlerdir (217). Aynı durumdaki hiperaktivite cisplatin uygulanmış hayvanlarda da 1 ay sonra gözlemlenmiştir (21).

Ancak belirtilen varsayımların yanında cochlear çekirdeğin aşırı gürültüyle oluşan kulak çınlamasının oluşum mekanizmasındaki yeri henüz belirsizliğini korumaktadır. Bu sebepten yaptığımız çalışmada CN’de meydana gelen bazı moleküler değişiklerin DCN’de meydana geldiği literatürde belirtilen değişikliklerle karşılaştırılarak olası mekanizmadaki yerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bilindiği gibi sinir sisteminde elektriksel ve kimyasal sinyal sistemi i ve dış uyarımların birleştirilmesinde önemli rol oynar. Tam sinyalleşme iyon kanalı aracılı olayların düzenli bir şekilde sıralanmasına ve sinapslardaki transdksiyona bağlıdır. İyon kanalı özelliklerindeki kk değişiklikler nöronların normal fizyolojik fonksiyonlarında şiddetli bir şekilde değişimine neden olur (206). Bu bilgi göz önüne alındığında Akustik travmadan sonra subkortikal bölgede meydana gelen plastik değişikliklerin nörotransmisyon ve intrinsik nöronal zar

proteinlerinin gen ekspresyonlarıyla ilişkili olduğunu gösteren birçok sağırılık çalışması vardır (48, 218-223).

Plastisitede meydana gelen değişikliklerin nedeninin merkezi nöronal aktivitenin artışı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte aşırı gürültüye maruz kalmanın ardından meydana gelen uyarım artışının nedenleri henüz keşfedilememiştir. Aynı nedenlerin aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması için de geçerli olduğu bilinmektedir (48, 224).

Örneğin Tan ve arkadaşları, yüksek sesle bilateral sağırılık oluşturdukları ve hayvan davranış testinde kulak çınlaması pozitiflik gösteren ratların inferior colliculus'unda BDNF'nin gen artışı gösterdiğini ve immunohistokimyasal olarak da GABA immunpozitif sinyaller alındığını rapor etmişlerdir (60). Dong ve arkadaşları ise kobaylardan elde ettikleri periferal işitme kaybı ölçümleri ve IC tek hücre spontan aktivite kaydı ile yine aynı hayvanlara tek taraflı aistik travma uygulayarak IC ve CN'den ana baskılayıcı ve uyarıcı nörotransmisyon, presinaptik transmitter salınımını düzenleyici ve intrinsik nöronal zar uyarılabilirliği ile ilgili genlerden elde ettikleri mRNA ölçümlerini birleştirerek, akustik travmanın neden olduğu hiperaktivitenin uyarıcı sistem mRNA'larının artışı ve/ veya baskılayıcı sistem mRNA'larının azalmasından kaynaklandığı hipotezini savunmuştur (48). Wang ve arkadaşlarının hipotezine göre ise kulak çınlaması, merkezi işitme sistemindeki baskılayıcı amino asit nörotransmisyonunun azalmasına karşı gösterilen bir plastik adaptasyondur. Olası mekanizması DCN'deki glisinerjik baskılanmanın ve/ veya IC'daki GABAerjik baskılanmanın kaybı olabilir. Bu hipotezi desteklemek için, periferal işitme sisteminden alınamayan uyarımlara cevap olarak iki merkez işitme yapısındaki

nöronal plastisite değişikliğine odaklanmışlar ve davranışsal, elektrofizyolojik ve nörokimyasal çalışmalarla DCN ve IC'nin kulak çınlaması oluşumunda önemli yerler olduğu kanıtlanmıştır (171, 225).

6.6. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının İyon Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Akustik travmanın uyarıcı ve baskılayıcı transmitter sistemini moleküler düzeyde değiştirdiğini gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Bu değişiklikler beyin sapı, orta beyin ve kortikal seviyede olmaktadır. Basitleştirilmiş bir şekilde anlatmak gerekirse, beyinsapında glutamat aracılı AMPA reseptör sistemi, orta beyinde GABA reseptör sistemi genleri az eksprese edilirken, kortekste diğer bir glutamat aracılı reseptör sistemi olan NMDA reseptörleri fazla eksprese edilir (226). Sun ve arkadaşlarının yaptığı benzer çalışmada ise, 1 saat 12 kHz 120 dB SPL aşırı gürültüye maruz bırakılan ratların AC'sinden elde edilen mRNA microarray analizinde 96'sı genel sinyal transdüksiyonuyla ilgili olmak üzere toplam 112 genin ekspresyonuna bakılmıştır. Kontrol grupları ile karşılaştırıldıklarında ise genel olarak ekspresyon artışı görülmektedir. Bunlardan baskılayıcı mekanizmayı baskılayan HSP-1, HSP-86, CDKN-1A ve CTSD genleri sırasıyla 1,8 (%80), 1,85 (%85), 1,85 (%85) ve 1,87 (87%) kat artmıştır (62). Bu sonuç literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir.

Mekanizmanın bozulmasına sebep olarak gösterilen NMDA reseptör alt ünitesi 2A (NR2A) mRNA'sı (227), GABA (60, 228), GABAA reseptör alfa 1 alt ünitesi (GABAA α 1) (229), Glutamic-Acid Decarboxylase (GAD-67) (228, 229), Calbindin (Calb1) (230) and GAP-43 (231) gibi uyarıcı ve baskılayıcı

nörotransmsyon ilişkili proteinlerin ekspresyonlarında birçok değişiklik bildirilmiştir. Bu çalışmalar birbirinden, kullanılan hayvan türü ve yaşına, akustik travmanın metoduna ve metodların değerlendirilme yöntemine göre çeşitlilik gösterir (215).

6.6.1. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Browne ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada kalsiyum bağlayan proteinlerden Calb1'in seviyesinin akustik travmaya maruz bırakılmanın hemen ardından ipsilateral DCN'de düştüğünü ancak 32 gün sonra tekrar iyileşerek normal seviyesine döndüğünü, işitme korteksinde ise az bir düşüş gösterdikten 16 gün sonra normal seviyeye geldiğini görmüşlerdir (215). Bu değişim Calb1'in bozulan hücre içi kalsiyum dengesine karşı nöronları koruyucu bir etkisinin olduğunu gösterir. Çünkü eksitotoksistide hücre içi kalsiyum seviyesinin aşırı derecede yükselmesi kalsiyum dengesini geriye dönüşümsüz olarak bozar ve nöronların ölümüne sebep olur. Yine aynı çalışmada ipsilateral DCN ve AC'de azalmasının sitoplazmik kalsiyum tamponunu etkileyerek hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada CN'de Calb1 gibi kalsiyum dengesinde önemli rol oynayan $Ca_v2.2$ ve TRPM2 mRNA'larının sırasıyla 0.09 ve 0.16 azaldığı görülmüştür. Browne ve arkadaşlarının düşüncesinin aksine aşırı gürültünün CN'de kalsiyum kanal proteinleri üzerine negatif etkili olduğunu ve dolaylı olarak Calb1'in ekspresyonun etkilendiği ortaya çıkar.

6.6.2. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Bunun dışında diğer önemli iyon kanallarının ekspresyonuna bakıldığında akustik travmayı takiben periferde ve merkezde değişik ekspresyon şekillerine sahip olduğu görülür. Örneğin nöronal uyramın düzenlenmesinde önemli rolü olan voltaj kapılı sodyum kanallarının α -alt üniteleri ($Na_v1.1-1.9$), ekspresyon şekline göre merkezi ($Na_v1.1, 1.2, 1.3, 1.6$) ve periferal ($Na_v1.7, 1.8, 1.9$) olmak üzere sınıflandırılır. Aşırı gürültüye maruz kalan ve kontrol grubu ratların modiolus dokusundan yapılan PCR analizinde $Na_v1.1, Na_v1.6$ ve $Na_v1.7$ için ortaya çıkan ürünler, önceden yapılan RT-PCR deneylerinde elde edilen voltaj kapılı sodyum kanalı mRNA ekspresyonları izoformlarıyla uygunluk göstermektedir. Kontrol grubuyla aşırı gürültüye maruz kalan grup karşılaştırıldığında $Na_v1.1$ 'nin gen ekspresyonunda %29'luk, $Na_v1.6$ 'ninkinde ise %56'lık bir azalma görülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir azalmadır. Ek olarak, $Na_v1.7$ gen ekspresyonunda %20'lik bir artış belirlenmiştir. Periferal işitme sisteminde yapılan bu çalışmanın bir kısmı yaptığımız çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Aşırı gürültüye maruz bırakılmış ratların cochlear çekirdek dokusundan elde ettiğimiz $Na_v1.1, 1.2, 1.3$ mRNA'lar, kontrol grubununkilerle karşılaştırıldığında sırasıyla 0.08, 0.29, 0.1 kat azalma bulunmuştur (153).

6.6.3. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının Voltaj Kapılı Potasyum Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Pilati ve arkadaşlarının akım ve voltaj clamp kayırlarına göre fusiform hücrelerdeki aşırı ateşlemenin nedeni yüksek voltajla aktive olan potasyum akımlarının azalmasıdır. Ayrıca erken safhalarda aşırı gürültüye maruz kalma sağırılığı tetikler ve bu DCN'de bulunan fusiform hücrelerden çıkan sinyallerin ateşleme biçimininde ve sıklığındaki derin değişikliklerle ilişkilidir. Tanımlanan bu değişiklikler kulak çınlamasının oluşumundan önceki ilk denge bozulması ağını temsil eder (224). Yaptığımız çalışmada aşırı gürültüye maruz kalan CN'de $K_{V11.1}$ -Erg1 ve $K_{V11.3}$ -Erg 3 mRNA'larının kontrol gruplarına göre sırasıyla 0.34 ve 0.15 azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan floresan immunohistokimya analizine göre deney grubuyla kontrol grubu arasında düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu $K_{V11.1}$ -Erg1 için 1,14 kat, $K_{V11.3}$ -Erg3 için 1,9 kat azalmıştır. Bu bulgular literatürde belirtilen bulguları destekler niteliktedir.

6.6.4. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının HCN Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Literatürde aşırı gürültünün HCN kanalları üzerinde nasıl etki gösterdiğini gösteren bir bilgiye ulaşılamamıştır. Ancak yaptığımız çalışmada aşırı gürültünün HCN1-2-4 mRNA'larını 0.42, 0.49, 0.37 kat azalttığı görülmüştür. Yine yapılan floresan immunohistokimya analizine göre deney grubuyla kontrol grubu arasında düzeltilmiş toplam alan floresan yoğunluğu HCN1 için 1,20 kat, HCN2 için 4,47 kat, HCN4 için ise 2,05 kat azalmıştır.

6.6.5. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlamasının TRPM Kanallarına Göre Değerlendirilmesi

Bauer ve arkadaşlarının aşırı gürültü uyguladıktan 2 sonra spiral gangliyonlardan elde ettikleri immunohistokimya analizlerinin sonucunda TRPV1 iyon kanalının ekspresyonunun değişmediğini, ancak 24 saat sonra bir artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir (232). Yaptığımız çalışmada bu bilgilerin aksine TRPM2 ve TRPM7 iyon kanallarının aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlamasında sırasıyla 0.16 ve 0.14 kat azaldığını görmekteyiz. Kulak çınlamasının genel oluşum mekanizmasını göz önüne aldığımızda elde ettiğimiz sonuçlar birbirine paralellik gösterdiğinden periferde meydana gelen bir dizi değişikliğin merkezi sinir sisteminin bazı bölümlerinde değişikliklerin oluşmasına sebep olmaktadır.

Aşırı gürültüyle oluşturulmuş kulak çınlaması için bulduğumuz veriler literatürle karşılaştırıldığında genel olarak literatürle uyumludur. Şöyle ki periferden gelen afferent sinyal azalmasına bağlı olarak merkezi sinir sisteminde buna uygun değişiklikler meydana gelmiştir. Bazı hayvan deneylerinin de savunduğu gibi kulak çınlaması kaybedilmiş afferent uyarımları aşırı telafi etme süreci olabilir. Örnek olarak Wang ve arkadaşlarının 1 saat aşırı gürültüye maruz bıraktıkları ratların DCN'dan 1 hafta sonra elde ettikleri nörokimyasal bulgular, postsinaptik GlyR alt ünite protein miktarının azaldığı yönündedir (225). Anlaşılacağı üzere glisinerjik sinaptik transmisyonun azalması, periferel işitme sisteminden gelen uyarımların azalmasını kompanze etmek amacıyla meydana gelen tepkidir. Browne ve arkadaşlarının çalışması bu bilgiyi destekleyici niteliktedir. Yaptıkları çalışmada aşırı akustik travmadan 1 ay sonra uyarıcı tipteki

nörotransmisyon ilişkili proteinlerden NR2A proteinin seviyesi contralateral IC'de düşme eğilimde bulunmuştur. Bu düşüşün işitme sistemindeki aşırı uyarımı telafi etmek için olduğu savunulmuştur (215). Marianowski ve arkadaşlarının çalışmasında ise genç ratlar aminoglikozit intoksikasyonuna maruz bırakılmış ve IC ve CN'larında NR2A mRNA ekspresyonunun azaldığını görmüşlerdir (227). NMDA resptörleri nöronların canlılığını devam ettirmeleri için önemli sinyal yapılarıdır. NR2A mRNA ekspresyonunun azalması ise akustik travma sırasında hasar gören nöronların canlılığını devam ettirebilme yeteneğini azaltmıştır çünkü akustik travmayı takiben CN'de apoptotik markırların arttığı (233), CN'de, IC'de (234), MGB'de ve AC'de (235) dejenerasyon ve ölü hücre sayılarının arttığı gösterilmiştir. Bu bilgiler göz önüne alındığında özellikle nöronların aşırı uyarılabilirliğini engelleyici iyon kanallarının belli bölgelerde azalması, işitme kortksinin aşırı uyarılmasına neden olan bir etki oluşturmaktadır.

Yine Browne ve arkadaşlarının çalışması ele alındığında, bu çalışma aşırı gürültünün ipsilateral ve contralateral AC'deki GABAA α 1 ekspresyonu üzerine yapılan ilk çalışmadır (215). Akustik travmayı takiben GABAA α 1 ekspresyonu ilk önce ipsilateral AC'de, daha sonra contralateral AC'de düşüş göstermiştir. Bundan önceki çalışmalarda CN ve IC'de düşüş gösterdiği belirtilmiştir.(229, 48) Baskılayıcı mekanizmada görülen bu önemli düşüş sonuç olarak AC'deki uyarım artışına ve spontan aktivitenin değişmesine yol açar. Ayrıca işitme sisteminin hem ipsilateral hem de contralateral bölgelerinde görülür. Akustik travmadan sonra oluşan spontan aktivite ve nöronal uyarılabilirlikteki değişiklikler sırasıyla DCN, IC ve AC'de görülür (48, 50, 214, 229, 236).

Ayrıca bazı uyarıcı nörotransmitterlerin ve voltaj kapılı iyon kanallarının azalması kulak çınlamasının karmaşık bir mekanizmayla oluştuğunu ortaya koyar. Örnek olarak Wang ve arkadaşları DCN'de glisinerjik reseptörlerin azaldığını belirtmişlerdir (171). Bu bilgi de çalışmamızın bulgularını destekleyen nitelikte bir bilgidir. Çünkü özellikle HCN kanallarındaki azalma beklenmeyen bir etkidir ve glisinerjik reseptörlerin azalmasıyla benzerlik gösterir.

6.7. Aşırı Gürültüyle Oluşturulan Kulak Çınlaması ile İlaçla Oluşturulan Kulak Çınlamasının Karşılaştırılması:

Son olarak aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlaması ilaçla oluşturulan kulak çınlamasıyla karşılaştırıldığında düşük doz indükleyicilerin işitme siniri üzerinde etkisinin olmadığı ve spontan ateşleme oranını azaltmadığı görülür. Stolzberg ve arkadaşlarının kullandığı bir prosedürde kedilere 200 mg/kg dozda uygulanan salisilatın 20 dB'lik bir işitme kaybı oluşturduğu ancak birincil işitme korteksindeki nöronlarda ateşleme oranının değişmezken ikincil işitme korteksinde değiştiği görülmüştür. Benzer etkilerin kinin düşük ve yüksek dozda kinin kullanımı sonucu oluştuğu görülür. 50 mg/kg dozda kullanılan kininin işitme sistemi üzerine etkisi görülmezken 100mg/kg dozda kullanılan kininin salisilatın etki gösterdiği bölgelerde aynı etkiyi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak ilaçla oluşturulan kulak çınlamasıyla, aşırı gürültüyle oluşturulan kulak çınlamasının değişik yollarda meydana geldiği ve merkezi sinir sisteminde farklı değişikliklere neden olduğu yorumu yapılır (237).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak özellikle aksiyon potansiyelinin oluşması ve devamı için önemli olan bazı iyon kanallarının sodyum salisilat ve aşırı gürültü uygulamasından sonra ratların cochlear çekirdeklerinde azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın periferden gelen uyarımların azalması ile ilişkili olabileceği ve daha üst merkezlerde görülen aşırı uyarım nedenlerinden biri olabileceği sonucuna varabiliriz. Çünkü işitme kaybı merkezi sinir sisteminin uyarılma ve baskılanma sistemindeki dengeyi sağlayan girdilerin aktivitesini düşürür. Bu ikili sistemdeki dengesizlik işitme sistemi ve işitme ile ilgili olan beyin bölgeleri arasında bir geri bildirim ve telafi etme mekanizma oluşmasına neden olur. Zaten kulak çınlamasının periferde meydana gelen hasarı telafi etmek için oluşan süreçler esnasında oluştuğu bilinmektedir. CN ise periferden gelen uyarımların merkezi işitme sistemine girdiği ilk bölüm olmasından dolayı bu hasarı giderebilmede görevli olacak ilk bölgedir.

Ayrıca CN'nin tek başına kulak çınlaması için bir jeneratör görevi yaptığını söyleyemeyiz çünkü aşırı gürültüyle DCN'de oluşturulan hiperaktivitenin cochlear ablasyonla giderilmediği bilinmektedir. Bu bulgular DCN'deki hiperaktivitenin periferal hiperaktivitenin bir yansıması olmadığını gösterir. Ancak cochleadan bağımsız oluştuğu anlamına da gelmemektedir (217).

Bunun dışında özellikle salisilat üzerine yapılmış elektrofizyolojik literatür incelendiğinde elde ettiğimiz bulgulara ters düşen bilgiler göze çarpmaktadır. Bu bağlamda elektrofizyolojik verilerin doku kesitlerine uygulananmış salisilatın sistemik etkilerini tam olarak yansıtmamış olabileceğini düşünüyoruz.

Periferik işitme sistemi ve merkezi işitme sisteminde meydana gelen değişikliklerin kademeli olarak incelenmesi, birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi ve bu ilişkilerin bir bütün olarak yorumlanmasının kulak çınlamasının oluşum mekanizmasını ortaya çıkaracağı fikrindeyiz.

7.KAYNAKLAR

- [1]. Wilson JP, Sutton GJ. Acoustical correlates of tonal tinnitus. CIBA Foundation Symposium 1981; 85: 82-107.
- [2]. Heller AJ. Classification and epidemiology of tinnitus. The Otolaryngologic Clinics of North America 2003; 36: 239–248.
- [3]. Kizawa K, Kitahara T, Horii A, et al. Behavioral assessment and identification of a molecular marker in a salicylate-induced tinnitus in rats. Neuroscience 2010; 165: 1323-1332.
- [4]. Bauer CA, Brozoski TJ. Tinnitus: Theories, Mechanisms, and Treatments. In: Schacht J, Popper AN, Fay RR. (Editors). Auditory Trauma, Protection and Repair. New York: Springer Science+Business Media, LLC 2008: 101-125.
- [5]. Holmes S, Padgham ND. “Ringing in the Ears”: Narrative Review of Tinnitus and Its Impact. Biological Research for Nursing 2011; 13(1): 97-108.
- [6]. Schecklmann M, Landgrebe M, Poepl TB, et al. Neural Correlates of Tinnitus Duration and Distress: A Positron Emission Tomography Study. Human Brain Mapping 2013; 34(1): 233-240.
- [7]. Mao JC, Pace E, Pierozynski P, et al. Blast-Induced Tinnitus and Hearing Loss in Rats: Behavioral and Imaging Assays. J Neurotrauma 2012; 29(2): 430-444.
- [8]. Vanneste S, Van De Heyning P, De Ridder D. Contralateral Parahippocampal Gamma-Band Activity Determines Noise-like Tinnitus Laterality: A Region of Interest Analysis. Neuroscience 2011; 199: 481-490.
- [9]. Brozoski TJ, Wisner KW, Sybert LT, Bauer CA. Bilateral Dorsal Cochlear Nucleus Lesions Prevent Acoustic-Trauma Induced Tinnitus in an Animal Model. JARO 2012; 13(1):55-66.
- [10]. Zheng Y, Vagal S, McNamara E, Darlington CL, Smith PF. A dose-response analysis of the effects of L-baclofen on chronic tinnitus caused by acoustic trauma in rats. Neuropharmacology 2012; 62(2): 940-946.
- [11]. Noble W, Tyler R. Physiology and phenomenology of tinnitus: implications for treatment. Int J Audiol 2007; 46(10):569-575.
- [12]. Wilson EC, Schlaug G. Listening to filtered music as a treatment option for tinnitus: A review. Music Perception 2010; 27(4): 327-330.
- [13]. Adjajian P, Sereda M, Hall DA. The mechanisms of tinnitus: Perspectives from human functional neuroimaging. Hearing Research 2009; 253: 15-31.
- [14]. Møller, RA. Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system. 2nd Ed. Elsevier 2006; 3; 253-262.
- [15]. Andersson G. Psychological aspects of tinnitus and the application of cognitive–behavioral therapy. Clinical Psychology Review 2002; 22: 977-990.

- [16]. Baldo P, Doree C, Lazzarini R, Molin P, McFerran DJ. Antidepressants for patients with tinnitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4):CD003853.
- [17]. Han BI, Lee HW, Kim TY, Lim JS, Shin KS. Tinnitus: Characteristics, Causes, Mechanisms, and Treatments. *J Clin Neurol* 2009; 5: 11-19.
- [18]. Folmer RL, Griest SE. Tinnitus and insomnia. *American Journal of Otolaryngology* 2000; 21: 287-293.
- [19]. Goto Y, Matsuchim, T, Natori Y, Inamura T, Tobimatsu S. Delayed effects of the microvascular decompression of hemifacial spasm: A retrospective study of 131 operated cases. *Neurosurgical Research* 2002; 24: 296-300.
- [20]. Jastreboff PJ, Gray W, Gold S. Neurophysiological approach to tinnitus patients. *American Journal of Otology* 1996; 18: 236-240.
- [21]. Kaltenbach JA, Rachel JD, Mathog TA, et al. Cisplatin-Induced Hyperactivity in the Dorsal Cochlear Nucleus and Its Relation to Outer Hair Cell Loss: Relevance to Tinnitus. *J Neurophysiol* 2002; 88: 699-714.
- [22]. Kazmierczak H, Doroszewska G. Metabolic disorders in vertigo, tinnitus and hearing loss. *International Tinnitus Journal* 2001; 7: 54-58.
- [23]. Kraft JR. Hyperinsulinemia: A merging history with idiopathic tinnitus, vertigo and hearing loss. *International Tinnitus Journal* 1998; 4: 127-130.
- [24]. Yorgason JG, Fayad JN, Kalinec F. Understanding drug ototoxicity: Molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opinion on Drug Safety* 2006; 5: 383-399.
- [25]. Lin X, Chen S, Tee D. Effects of quinine on the excitability and voltage-dependent currents of isolated spiral ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 1998; 79: 2503-2512.
- [26]. Wegel RL. A study of tinnitus. *Archives of Otolaryngology* 1931; 14: 715-728.
- [27]. McFadden D. Tinnitus: Facts, theories and treatments. National Academies Press. Washington, DC. 1982.
- [28]. Penner MJ, Jastreboff PJ. Tinnitus: Psychophysical observations in humans and an animal model. In: Water TR, Popper AN, Fay RR (Editors). *Clinical aspects of hearing*. Newyork: Van De Springer 1996: 258-304.
- [29]. Heffner HE, Hefner RS. Behavioural test for tinnitus in animals. In: *Tinnitus, Springer handbook of auditory reasearh* 47. Newyork: Springer Science+Bussiness Media 2012: 21-58.
- [30]. Jastreboff PJ, Brennan JF. Evaluating the loudness of phantom auditory perception (tinnitus) in rats. *Audiology* 1994; 33: 202-217.
- [31]. Jastreboff PJ, Sasaki CT. An animal model of tinnitus: a decade of development. *Am J Otol* 1994; 15: 19-27.
- [32]. Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M. Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 1999; 121: 457-462.

- [33]. Estes WK, Skinner BF. Some quantitative properties of anxiety. *J Exp Psychol* 1941; 29: 390-400.
- [34]. Kaltenbach JA, Afman CE. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear Res* 2000; 140:165–172.
- [35]. Bauer CA, Brozoski TJ. Assessing tinnitus and prospective tinnitus therapeutics using a psychophysical animal model. *J Assoc Res Otolaryngol* 2001; 2: 54–64.
- [36]. Brozoski TJ, Bauer CA, Caspary DM. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci* 2002; 22: 2383–2390.
- [37]. Heffner HE, Harrington IA. Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound. *Hearing Research* 2002; 170(12):83–95.
- [38]. Loeb M, Smith R. Relation of induced tinnitus to physical characteristics of the inducing stimuli. *J Acoust Soc Am* 1967; 42: 453–455.
- [39]. Axelsson A, Sandh A. Tinnitus in noise-induced hearing loss. *Br J Audiol* 1985; 19: 271-276.
- [40]. Leske MC. Prevalence estimates of communicative disorders in the U.S. Language, hearing and vestibular disorders. *ASHA* 1981; 23: 229-237.
- [41]. Penner MJ. Tinnitus Synthesis: Fluctuant and Stable Matches to the Pitch of Tinnitus. *Int Tinnitus J* 1995; 1: 79-83.
- [42]. Atherley GR, Hempstock TI, Noble WG. Study of tinnitus induced temporarily by noise. *J Acoust Soc Am* 1968; 44(6):1503-1506.
- [43]. Liberman MC, Beil DG. Hair cell condition and auditory nerve response in normal and noise-damaged cochleas. *Acta Oto-Laryngologica*. 1979; 88(3-4):161-176.
- [44]. Salvi RJ, Hamernik RP, Henderson D. Auditory nerve activity and cochlear morphology after noise exposure. *Arch Otorhinolaryngol* 1979; 224(1-2):111-116.
- [45]. Kaltenbach JA. Tinnitus: Models and mechanisms. *Hearing Research* 2011; 276: 52-60.
- [46]. Eggermont JJ, Roberts LE. The neuroscience of tinnitus. *Trends Neuroscience* 2004; 27: 676-682.
- [47]. Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, et al. Ringing ears: the neuroscience of tinnitus. *J Neurosci* 2010; 30: 14972-14979.
- [48]. Dong S, Mulders WH, Rodger J, Woo S, Robertson D. Acoustic trauma evokes hyperactivity and changes in gene expression in guinea-pig auditory brainstem. [European Journal of Neuroscience](#) 2010; 31(9): 1616-28.
- [49]. Kimura M, Eggermont JJ. Effects of acute pure tone induced hearing loss on response properties in three auditory cortical fields in cat. *Hearing Research* 1999; 135: 146-162.
- [50]. Seki S, Eggermont JJ. Changes in spontaneous firing rate and neural synchrony in cat primary auditory cortex after localized tone-induced hearing loss. *Hearing Research* 2003; 180: 28-38.

- [51]. Norena AJ, Eggermont JJ. Enriched acoustic environment after noise trauma reduces hearing loss and prevents cortical map reorganization. *J Neurosci* 2005; 25: 699-705.
- [52]. Kaltenbach JA, McCaslin DL. Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to high intensity sound, a possible neural correlate of tinnitus. *Auditory Neuroscience* 1996; 3: 57-78.
- [53]. Zhang JS, Kaltenbach JA. Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus of the rat following exposure to high-intensity sound. *Neurosci Lett* 1998; 250: 197-200.
- [54]. Kaltenbach JA, Godfrey DA, Neumann JB, et al. Changes in spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to intense sound: relation to threshold shift. *Hearing Research* 1998; 124: 78-84.
- [55]. Bauer CA, Turner JG, Caspary DM, Myers KS, Brozoski TJ. Tinnitus and inferior colliculus activity in chinchillas related to three distinct patterns of cochlear trauma. *Journal of Neuroscience Research* 2008; 86: 2564–2578.
- [56]. Mulders WH, Robertson D. Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity. *Neuroscience* 2009; 164: 733-746.
- [57]. Liberman MC, Kiang NY. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl* 1978; 358: 1-63.
- [58]. Finlayson PG, Kaltenbach JA. Alterations in the spontaneous discharge patterns of single units in the dorsal cochlear nucleus following intense sound exposure. *Hearing Research* 2009; 256: 104-117.
- [59]. Chen GD, Jastreboff PJ. (1995). Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats. *Hearing Research*.82: 158-178.
- [60]. Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, et al. Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1 / arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience* 2007; 145: 715–726.
- [61]. Sun W, Zhang L, Lu J, et al. Noise exposure-induced enhancement of auditory cortex response and changes in gene expression. *Neuroscience* 2008; 156: 374–380.
- [62]. Eggermont JJ. Hearing loss, hyperacusis or tinnitus: What is modeled in animal research?. *Hearing Research* 2013; 295:140-149.
- [63]. Samlan SR, Jordan MT, Chan SB, Wahl MS, Rubin RL. Tinnitus as a measure of salicylate toxicity in the overdose setting. *West J Emerg Med* 2008; 9(3):146-149.
- [64]. Boettcher FA, Salvi RJ. (Salicylate ototoxicity: review and synthesis. *Am J Otolaryngol* 1991; 12: 33-47.
- [65]. Jastreboff PJ, Brennan JF, Coleman JK, Sasaki CT. Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus. *Behav Neurosci* 1988; 102(6):811-822.
- [66]. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT. An animal model for tinnitus. *Laryngoscope* 1988 ; 98(3):280-6.
- [67]. Day RO, Graham GG, Bieri D, et al. Concentration-response relationships for salicylate-induced ototoxicity in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28: 695- 702.

- [68]. Jastreboff, PJ, Issing W, Brennan JF, Sasaki CT. Pigmentation, anesthesia, behavioral factors, and salicylate uptake. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 114: 186-191.
- [69]. Rüttiger L, Ciuffani J, Zenner HP, Knipper M. A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hear Res* 2003; 180: 39-50.
- [70]. Deer BC, Hunter-Duvar I. Salicylate ototoxicity in the chinchilla: a behavioral and electron microscope study. *J Otolaryngol* 1982; 11: 260–264.
- [71]. Jastreboff PJ, Sasaki CT. Salicylate-induced changes in spontaneous activity of single units in the inferior colliculus of the guinea pig. *J Acoust Soc Am* 1986; 80: 1384–1391.
- [72]. Manabe Y, Saito T, Saito H. Effects of lidocaine on salicylate induced discharges of neurons in the inferior colliculus of the guinea pig. *Hear Res* 1997; 103: 192–198.
- [73]. Jastreboff PJ, Sasaki CT. An animal model of tinnitus: a decade of development. *Am J Otol* 1988; 15: 19–27.
- [74]. Guitton MJ, Caston J, Ruel J, et al. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci* 2003; 23(9):3944–3952.
- [75]. McCabe PA, Dey FL. The effect of aspirin upon auditory sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1965; 74, 312-324.
- [76]. Dieler R, Shehata-Dieler WE, Brownell WE. Concomitant salicylate-induced alterations of outer hair cell subsurface cisternae and electromotility. *J Neurocytol* 1991; 20: 637-653.
- [77]. Tunstall MJ, Gale JE, Ashmore JF. Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 1995; 485: 739-752.
- [78]. Russell IJ, Schauf C. Salicylate ototoxicity: effects on stiffness and electromotility of outer hair cells isolated from the guinea pig cochlea. *Aud Neurosci* 1995; 1: 309-319.
- [79]. Lue AJ, Brownell WE. Salicylate induced changes in outer hair cell lateral wall stiffness. *Hear Res* 1999; 135: 163-168.
- [80]. Kakehata S, Santos-Sacchi J. Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge. *J Neurosci* 1996; 16: 4881–4889.
- [81]. Zheng J, Shen W, He DZ, et al. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 2000; 405: 149–155.
- [82]. Muller M, Klinke R, Arnold W, Oestreicher E. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hear Res* 2003; 183: 37–43.
- [83]. Ermilov SA, Murdock DR, El-Daye D, Brownell WE, Anvari B. Effects of salicylate on plasma membrane mechanics. *J Neurophysiol* 2005; 94: 2105–2110.
- [84]. Drexler M, Lagarde MM, Zuo J, Lukashkin AN, Russell IJ. The role of prestin in the generation of electrically evoked otoacoustic emissions in mice. *J Neurophysiol* 2008; 99: 1607–1615.
- [85]. Huang ZW, Luo Y, Wu Z, et al. Paradoxical enhancement of active cochlear mechanics in long-term administration of salicylate. *J Neurophysiol* 2005; 93: 2053-2061.

- [86]. Ruel J, Chabbert C, Nouvian R, et al. Salicylate enables cochlear arachidonic-acid sensitive NMDA receptor responses. *J Neurosci* 2008; 28: 7313-7323.
- [87]. Stypulkowski PH. Mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear Res* 1990; 46: 113-146.
- [88]. Evans EF, Wilson JP, Borerwe TA. Animal models of tinnitus. *Ciba Found Symp* 1981; 85: 108-138.
- [89]. Bauer CA, Brozoski TJ, Holder TM, Caspary DM. Effects of chronic salicylate on GABAergic activity in rat inferior colliculus. *Hear Res* 2000; 147:175-182.
- [90]. Caperton KK, Thompson AM. Activation of serotonergic neurons during salicylate-induced tinnitus. *Otol Neurotol* 2011; 32: 301-307.
- [91]. Klump GM, Dooling RJ, Fay RR, Stebbins WC. *Methods in comparative psychoacoustics*. Birkhäuser. Basel. 1995.
- [92]. Brennan JF, Jastreboff PJ. Generalization of conditioned suppression during salicylate-induced phantom auditory perception in rats. *Acta Neurobiol Exp* 1991; 51: 15-27.
- [93]. Brozoski TJ, Spires JD, Bauer CA. Vigabatrin, a GABA transaminase inhibitor, reversibly eliminates tinnitus in an animal model. *Journal of the Association for the Research in Otolaryngology* 2007; 8: 105-118.
- [94]. Guitton MJ, Dudai Y. Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma. *Neural Plasticity* 2007; 80904: 1-11.
- [95]. Lobarinas E, Sun W, Cushing R, Salvi R. A novel behavioral paradigm for assessing tinnitus using schedule-induced polydipsia avoidance conditioning (SIP-AC). *Hearing Research* 2004; 190(12):109–114.
- [96]. Turner JG, Brozoski TJ, Bauer CA, et al. Gap detection deficits in rats with tinnitus: A potential novel screening tool. *Behavioral Neuroscience* 2006; 120: 188–195.
- [97]. Heffner HE, Koay G. Tinnitus and hearing loss in hamsters exposed to loud sound. *Behavioural Neuroscience* 2005; 119: 734-742.
- [98]. Heffner HE. Two-choice sound-localisation procedure for detecting lateralized tinnitus in animals. *Behaviour Research Methods* 2011; 43(2): 577-589.
- [99]. Forsythe ID. *Auditory Processing encyclopedia of life sciences* 2002.
- [100]. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister L. *Gray's Anatomy*. 37th Edition. Churchill Livingstone. 1989; 1219-X
- [101]. Dursun N. *Veteriner Anatomi III*. Medisan Yayın Evi. Ankara. 2006.
- [102]. Malmierca MS, Ryugo DK. Auditory System. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L. (Editors). *The Mouse Nervous System*. Academic Press of Elsevier 2012: 607-637.
- [103]. Malmierca MS, Merchán MA. Auditory System. In: Paxinos G. (Editor). *Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press 2004: 995-1060.
- [104]. Taşbaş M. *Veteriner Aesthesiologia*. Tamer yayınları. Ankara. 1996: 67-93.

- [105]. Santi PA, Mancini P. Cochlear Anatomy and Central Auditory Pathways. In: Cumming CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Schuller DE. (Editors). *Otolaryngology-Head Neck Surgery*. St. Louis; Mosby Year Book 1993.
- [106]. Helfert RH, Snead CR, Altschuler RA. The Ascending Auditory Pathways. In: RA Altschuler et al. *Neurobiology of Hearing: The Central Auditory System*. Newyork: Raven Press Ltd 1991.
- [107]. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. The Auditory System. In: *Neuroscience 3rd Edition*, Sunderland (MA): Sinauer Associates 2001: 294-300.
- [108]. Ashmore, J. Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiological Reviews* 2006; 88(1): 173-210.
- [109]. Held, H. Die centrale Bahnen des Nervus acusticus bei der Katz. *Arch Anat Abtheil* 1893; 15, 190–271.
- [110]. Rasmussen GL. The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 1946; 99: 61–74.
- [111]. Rasmussen GL. Further observations of the efferent cochlear bundle. *J Comp Neuro*. 1953; 99, 61–74.
- [112]. Winer JA, Larue DT. Patterns of reciprocity in auditory thalamocortical and corticothalamic connections: Study with horseradish peroxidase and autoradiographic methods in the rat medial geniculate body. *J Comp Neurol* 1987; 257: 282–315.
- [113]. Herbert H, Aschoff A, Ostwald J. Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neuro*. 1991; 304: 103–122.
- [114]. Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E. Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 1996; 371: 15–40.
- [115]. Paula-Barbosa MM, Sousa-Pinto A. Auditory cortical projections to the superior colliculus in the cat. *Brain Res* 1973; 50: 47–61.
- [116]. Feliciano M, Saldaña E, Mugnaini E. Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemiscal regions, superior olivary complex and cochlear nuclei. *Aud Neurosci* 1995 1: 287–308.
- [117]. Saldaña, E. Descending projections from the inferior colliculus to the cochlear nuclei in mammals. In: Merchán M, Juiz J, Godfrey DA, Mugnaini E. (Editors). *The Mammalian Cochlear Nuclei: Organization and Function*, New York: Plenum Press 1993: 153–166.
- [118]. Ballester GF, Carvajal AF, Ros JMG, Montiel AF. Ionic Channels as Targets for Drug Design: A Review on Computational Methods. *Pharmaceutics* 2011; 3: 932-953.
- [119]. LaMantia AS. Channels and Transporters. In: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. (Editors.). *Neuroscience 3rd Edition*, Sunderland, Massachusetts U.S.A. : Sinauer Associates Inc. Publishers 2004.
- [120]. Landry Y, Gies JP. Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2008; 22: 1–18.

- [121]. Trimmer JS. Localisation of voltage gated ion- channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 477–519.
- [122]. Camerino DC, Tricarico D, Desaphy JF. Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 184–198.
- [123]. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984; 312:121–127.
- [124]. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. In: Bootman M, Berridge MJ, Putney JW, Llewellyn Roderick H. (Editors). *Additional Perspectives on Calcium Signaling*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2011.
- [125]. Van Petegem F, Minor DL. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochemical Society Transactions* 2006; 35(5): 887-893.
- [126]. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology* 2000; 1(4): 0004.1-0004.5.
- [127]. Yallen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419: 35-42.
- [128]. Ruzyllo W, Tendera M, Ford I, Fox KM. Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial. *Drugs* 2007; 67: 393–405.
- [129]. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. Hyperpolarization- Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiol Rev* 2009; 89: 847-885.
- [130]. Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(3):470-94.
- [131]. Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 14815–14820.
- [132]. Santoro B, Chen S, Luthi A, et al. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 2000; 20: 5264–5275.
- [133]. Petrecca K, Miller DM, Shrier A. Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *J Neurosci* 2000; 20: 8736–8744.
- [134]. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1–4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 2004; 471: 241–276.
- [135]. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 1999; 380: 975–980.
- [136]. Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, et al. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* 2008; 28(3):576-86.

- [137]. Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic Acid (ACA): A Phospholipase A₂ Inhibitor and TRP Channel Blocker. *Cardiovascular Drug Reviews* 2007; 25(1): 61-75.
- [138]. Moran MM, Xu H, Clapham DE. TRP ion channels in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 2004; 14: 362–369.
- [139]. Dietrich A, Gudermann T. Another TRP to Endothelial Dysfunction: TRPM2 and Endothelial Permeability. *Circulation Research* 2008; 102: 275-277.
- [140]. Hill K, Tigue NJ, Kelsell RE, et al. Characterisation of recombinant rat TRPM2 and a TRPM2-like conductance in cultured rat striatal neurones. *Neuropharmacology*. 2006; 50(1):89-97.
- [141]. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res* 2008; 33: 1256-1262.
- [142]. Chung KK, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol*. 2011; 106(6):2865-75.
- [143]. Olah ME, Jackson MF, Li H, et al. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol*. 2009; 587(5):965-79.
- [144]. Demeuse P, Penner R, Fleig A. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domains. *J Gen Physiol* 2006; 127(4): 421-434.
- [145]. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, et al. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 2001; 411:590–595.
- [146]. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 2001; 291:1043–1047.
- [147]. Ryazanova LV, Pavur KS, Petrov AN, Dorovkov MV, Ryazanov AG. Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked with ion channels. *Mol Biol* 2001; 35: 271–283.
- [148]. Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D. The TRP ion channel family. *IUPHAR Compendium. TRP Channels*. 2002.
- [149]. Zheng Y, Stiles L, Hamilton E, Smith PF, Darlington CL. The effects of the synthetic cannabinoid receptor agonists, WIN55,212-2 and CP55,940, on salicylate-induced tinnitus in rats. *Hearing Research* 2010; 268: 145-150.
- [150]. Brozoski TJ, Caspary DM, Bauer CA, Richardson BD. The effect of supplemental dietary Taurine on Tinnitus and auditory discrimination in an animal model. *Hearing Research* 2010; 270: 71-80.
- [151]. Langguth B, Salvi R, Elgoyhen AB. Emerging pharmacotherapy of tinnitus. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009; 14(4): 687-702.
- [152]. Terlau H, Stuhmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 1998; 85: 437–444.

- [153]. Fryatt AG, Mulheran M, Egerton J, Gunthorpe MJ, Grubb BD. Ototrauma induces sodium channel plasticity in auditory afferent neurons. *Mol Cell Neurosci* 2011; 48(1):51-61.
- [154]. Moller AR. Similarities between severe tinnitus and chronic pain. *J Am Acad Audiol* 2000; 11: 115–124.
- [155]. Ralli M, Lobarinas E, Fetoni AR, et al. Comparison of salicylate- and quinine-induced tinnitus in rats: development, time course, and evaluation of audiologic correlates. *Otol Neurotol* 2010; 31(5):823-31.
- [156]. Stolzberg D, Chen GD, Allman BL, Salvi RJ. Salicylate-induced peripheral auditory changes and tonotopic reorganization of auditory cortex. *Neuroscience* 2011; 180: 157-64.
- [157]. Johansson MS, Arlinger SD. Prevalence of hearing impairment in a population in Sweden. *Int J Audiol* 2003; 42: 18–28.
- [158]. Turner J, Larsen D, Hughes L, Moechars D, Shore S. Time Course of Tinnitus Development Following Noise Exposure in Mice. *Journal of Neuroscience Research* 2012; 90: 1480–1488.
- [159]. Baigi A, Oden A, Almlid-Larsen V, Barrenäs ML, Holgers KM. Tinnitus in the general population with a focus on noise and stress: a public health study. *Ear Hear* 2011; 32(6):787-789.
- [160]. Malouff JM, Schutte NS, Zucker LA. Tinnitus-related distress: A review of recent findings. *Curr Psychiatry Rep* 2011; 13(1):31-36.
- [161]. Vanneste S, van de Heyning P, De Ridder D. The neural network of phantom sound changes over time: a comparison between recent-onset and chronic tinnitus patients. *Eur J Neurosci* 2011; 34(5):718-731.
- [162]. Weisz N, Wienbruch C, Dohrmann K, Elbert T. Neuromagnetic indicators of auditory cortical reorganization of tinnitus. *Brain* 2005; 128:2722– 2731.
- [163]. Weisz N, Dohrmann K, Elbert T. The relevance of spontaneous activity for the coding of the tinnitus sensation. *Prog Brain Res* 2007; 166: 61–70.
- [164]. Weisz N, Muller S, Schlee W, et al. The neural code of auditory phantom perception. *J Neurosci* 2007; 27: 1479–1484.
- [165]. Moazami-Goudarzi M, Michels L, Weisz N, Jeanmonod D. Temporo-insular enhancement of EEG low and high frequencies in patient with chronic tinnitus. QEEG study of chronic tinnitus patients. *BMC Neurosci* 2010; 11: 40.
- [166]. Mirz F, Gjedde A, Ishizu K, Pedersen CB. Cortical Networks subserving the perception of tinnitus—a PET study. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000; 543: 241–243.
- [167]. De Ridder D, Vanneste S, Adriaenssens I, et al. Microvascular decompression for tinnitus: significant improvement for tinnitus intensity without improvement for distress. A4-year limit. *Neurosurgery* 2010; 66: 656–660.

- [168]. Landgrebe M, Langguth B, Rosengarth K, et al. Structural brain changes in tinnitus: grey matter decrease in auditory and non-auditory brain areas. *Neuroimage* 2009; 46: 213–218.
- [169]. Muhlau M, Rauschecker JP, Oestreicher E, et al. Structural brain changes in tinnitus. *Cereb Cortex* 2006; 16: 1283–1288.
- [170]. Lenarz T, Schreiner C, Snyder RL, Ernst A. Neural mechanisms of tinnitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993; 249(8):441-446.
- [171]. Wang H, Brozoski TJ, Caspary DM. Inhibitory neurotransmission in animal models of tinnitus: maladaptive plasticity. *Hear Res* 2011; 279(1-2):111-117.
- [172]. Shore SE, Koehler S, Oldakowski M, Hughes LF, Syed S. Dorsal cochlear nucleus responses to somatosensory stimulation are enhanced after noise-induced hearing loss. *Eur J Neurosci* 2008; 27: 155-168.
- [173]. Zeng C, Nannapaneni N, Zhou J, Hughes LF, Shore S. Cochlear damage changes the distribution of vesicular glutamate transporters associated with auditory and nonauditory inputs to the cochlear nucleus. *J Neurosci* 2009; 29: 4210–4217.
- [174]. Darlington CL, Smith PF. Drug treatments for tinnitus. *Prog Brain Res* 2007; 166:249–262.
- [175]. Yang G, Lobarinas E, Zhang L, et al. Salicylate induced tinnitus: behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. *Hear Res* 2007; 226:244–253.
- [176]. Turner JG, Parrish J. Gap detection methods for assessing salicylate induced tinnitus and hyperacusis in rats. *Am J Audiol* 2008; 17:S185–S192.
- [177]. Cooper JC. Health and nutrition examination survey of 1971– 75: part II. Tinnitus subjective hearing loss and well-being. *J Am Acad Audiol* 1994; 5: 37–43.
- [178]. Zheng Y, Hamilton E, Stiles L, et al. Acoustic trauma that can cause tinnitus impairs impulsive control but not performance accuracy in the 5-choice serial reaction time task in rats. *Neuroscience* 2011; 180: 75-84.
- [179]. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2009; 29: 14077–14085.
- [180]. Cazals Y. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 583–63.
- [181]. Zhang X, Yang P, Cao Y, Qin L, Sato Y. Salicylate induced neural changes in the primary auditory cortex of awake cats. *Neuroscience* 2011; 172:232-245.
- [182]. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232–235.
- [183]. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React* 1998; 20: 3–15.
- [184]. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11693–11697.

- [185]. Thiernemann C. Biosynthesis and interaction of endothelium-derived vasoactive mediators. *Eicosanoids* 1991; 4: 187–202.
- [186]. Mahlke C, Wallhäusser-Franke E. Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry. *Hear Res* 2004; 195(1-2):17-34.
- [187]. Fitzgerald JJ, Robertson D, Johnstone BM. Effects of intra-cochlear perfusion of salicylates on cochlear microphonic and other auditory responses in the guinea pig. *Hear Res* 1993; 67: 147–156.
- [188]. McMahon CM, Patuzzi RB. The origin of the 900 Hz spectral peak in spontaneous and sound-evoked round-window electrical activity. *Hear Res* 2002; 173:134–152.
- [189]. Martin WH, Schwegeler JW, Scheibelhoffer J. Salicylate-induced changes in cat auditory nerve activity. *Laryngoscope* 1993; 103:600–604.
- [190]. Oliver D, He DZ, Klocker N, et. al. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin the outer hair cell motor protein. *Science* 2001; 292: 2340–2343.
- [191]. Zhang PC, Keleshian AM, Sachs F. Voltage-induced membrane movement. *Nature* 2001; 413: 428–432.
- [192]. Eggermont JJ. Salicylate-induced changes in the spontaneous activity in cat auditory cortex. In: Aran J, Dauman R. (Editors.). *Tinnitus 9*. Amsterdam: Kugler 1992: 293-298.
- [193]. Sun W, Lu J, Stolzberg D, et. Al. Salicylate increases the gain of the central auditory system. *Neuroscience* 2009; 159:325–334.
- [194]. Su YY, Luo B, Wang HT, Chen L. Differential effects of sodium salicylate on current-evoked firing of pyramidal neurons and fastspiking interneurons in slices of rat auditory cortex. *Hear Res* 2009; 253: 60–66.
- [195]. Wang HT, Luo B, Huang YN, Zhou KQ, Chen L. Sodium salicylate suppresses serotonin-induced enhancement of GABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents in rat inferior colliculus in vitro. *Hear Res* 2008; 236: 42–51.
- [196]. Wei L, Ding D, Sun W, Xu-Friedman MA, Salvi R. Effects of sodium salicylate on spontaneous and evoked spike rate in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 2010; 267: 54–60.
- [197]. Wang HT, Luo B, Zhou KQ, Xu TL, Chen L. Sodium salicylate reduces inhibitory postsynaptic currents in neurons of rat auditory cortex. *Hear Res* 2006; 215: 77–83.
- [198]. Im GJ, Jung HH, Chae SW, Cho WS, Kim SJ. Differential gene expression profiles in salicylate ototoxicity of mouse. *Acta Oto-Laryngologica* 2007; 127: 459-469.
- [199]. Basta D, Goetze R, Ernst A. Effects of salicylate application on the spontaneous activity in brain slices of the mouse cochlear nucleus, medial geniculate body and primary auditory cortex. *Hear Res* 2008; 240(1-2):42-51.
- [200]. Zheng Y, Baek JH, Smith PF, Darlington CL. Cannabinoid receptor down-regulation in the ventral cochlear nucleus in a salicylate model of tinnitus. *Hear Res* 2007; 228(1-2):105-11.

- [201]. Liu Y, Zhang H, Li X, et al. Inhibition of voltage-gated channel currents in rat auditory cortex neurons by salicylate. *Neuropharmacology* 2007; 53(7):870-880.
- [202]. Liu Y, Li X. Effects of salicylate on transient outward and delayed rectifier potassium channels in rat inferior colliculus neurons. *Neurosci Lett* 2004; 369(2):115-120.
- [203]. Liu Y, Li X, Ma C, Liu J, Lu H. Salicylate blocks L-type calcium channels in rat inferior colliculus neurons. *Hearing Res* 2005; 205: 271-276.
- [204]. Su SC, Seo J, Pan JQ, et al. Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5. *Neuron* 2012; 75(4):675-687.
- [205]. Snutch TP. Targeting Chronic and Neuropathic Pain: The N-type Calcium Channel Comes of Age. *NeuroRx* 2005; 2(4): 662–670.
- [206]. Liu Y, Li X. Effects of salicylate on voltage-gated sodium channels in rat inferior colliculus neurons. *Hear Res* 2004; 193(1-2):68-74.
- [207]. Zheng Y, Hooton K, Smith PF, Darlington CL. Carbamazepine reduces the behavioural manifestations of tinnitus following salicylate treatment in rats. *Acta Otolaryngol* 2008; 128(1):48-52.
- [208]. Milligan CJ, Edwards IJ, Deuchars J. HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res* 2006; 1081(1):79-91.
- [209]. Wilson GW, Garthwaite J. Hyperpolarization-activated ion channels as targets for nitric oxide signalling in deep cerebellar nuclei. *Eur J Neurosci* 2010; 31(11):1935-1945.
- [210]. Zheng Y, Seung Lee H, Smith PF, Darlington CL. Neuronal nitric oxide synthase expression in the cochlear nucleus in a salicylate model of tinnitus. *Brain Res* 2006; 1123(1):201-206.
- [211]. Ochi K, Eggermont JJ. Effects of quinine on neural activity in cat primary auditory cortex. *Hear Res* 1997; 105(1-2):105-118.
- [212]. Kenmochi M, Eggermont JJ. Salicylate and quinine affect the central nervous system. *Hear Res* 1997; 113(1-2):110-116.
- [213]. Kraus KS, Ding D, Zhou Y, Salvi RJ. Central auditory plasticity after carboplatin-induced unilateral inner ear damage in the chinchilla: up-regulation of GAP-43 in the ventral cochlear nucleus. *Hear Res* 2009; 255(1-2): 33-43.
- [214]. Noreña AJ, Eggermont JJ. Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus. *Hearing Research* 2003; 183: 137–153.
- [215]. Browne CJ, Morley JW, Parsons CH. Tracking the expression of excitatory and inhibitory neurotransmission-related proteins and neuroplasticity markers after noise induced hearing loss. *PLoS One* 2012; 7(3):e33272
- [216]. Mulders WH, Ding D, Salvi R, Robertson D. Relationship between auditory thresholds, central spontaneous activity, and hair cell loss after acoustic trauma. *J Comp Neurol* 2011;519(13):2637-2647.

- [217]. Kaltenbach JA, Godfrey DA. Dorsal cochlear nucleus hyperactivity and tinnitus: are they related?. *Am J Audiol* 2008; 17(2):S148-61.
- [218]. Asako M, Holt AG, Griffith RD, Buras ED, Altschuler RA. Deafness-related decreases in glycine-immunoreactive labeling in the rat cochlear nucleus. *J Neurosci Res* 2005; 81: 102–109.
- [219]. Mossop JE, Wilson MJ, Caspary DM, Moore DR. Downregulation of inhibition following unilateral deafening. *Hear Res* 2000; 147: 183–187.
- [220]. Holt AG, Asako M, Lomax CA, et al. Deafness-related plasticity in the inferior colliculus: gene expression profiling following removal of peripheral activity. *J Neurochem* 2005; 93: 1069–1086.
- [221]. Holt AG, Asako M, Duncan RK, et al. Deafness associated changes in expression of two-pore domain potassium channels in the rat cochlear nucleus. *Hear Res* 2006; 216–217: 146–153.
- [222]. Argence M, Saez I, Sassu R, et al. Modulation of inhibitory and excitatory synaptic transmission in rat inferior colliculus after unilateral cochleectomy: an in situ and immunofluorescence study. *Neuroscience* 2006; 141: 1193–1207.
- [223]. Cui YL, Holt AG, Lomax CA, Altschuler RA. Deafness associated changes in two-pore domain potassium channels in the rat inferior colliculus. *Neuroscience* 2007; 149: 421–433.
- [224]. Pilati N, Large C, Forsythe ID, Hamann M. Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hear Res* 2012; 283(1-2):98-106.
- [225]. Wang H, Brozoski TJ, Turner JG, et al. Plasticity at glycinergic synapses in dorsal cochlear nucleus of rats with behavioral evidence of tinnitus. *Neuroscience* 2009; 164(2):747-59.
- [226]. Eggermont JJ. Role of auditory cortex in noise- and drug-induced tinnitus. *Am J Audiol* 2008; 17(2):S162-S169.
- [227]. Marianowski R, Liao WH, Van Den Abbeele T, Fillit P, Herman P. Expression of NMDA, AMPA and GABA(A) receptor subunit mRNAs in the rat auditory brainstem. I. Influence of early auditory deprivation. *Hear Res* 2000; 150:1–11.
- [228]. Milbrandt JC, Holder TM, Wilson MC, Salvi RJ, Caspary DM. GAD levels and muscimol binding in rat inferior colliculus following acoustic trauma. *Hear Res* 2000; 147: 251–260.
- [229]. Dong S, Mulders WH, Rodger J, Robertson D. Changes in neuronal activity and gene expression in guinea-pig auditory brainstem after unilateral partial hearing loss. *Neuroscience* 2009; 159: 1164–1174.
- [230]. Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Canlon B. Sound stimulation increases calcium-binding protein immunoreactivity in the inferior colliculus in mice. *Neurosci Lett* 1999; 259: 49–52.
- [231]. Illing RB, Horvath M, Laszig R. Plasticity of the auditory brainstem: effects of cochlear ablation on GAP-43 immunoreactivity in the rat. *J Comp Neurol* 1997; 382: 116–138.

- [232]. Bauer CA, Brozoski TJ, Myers KS. Acoustic injury and TRPV1 expression in the cochlear spiral ganglion. *Int Tinnitus J* 2007;13(1):21-28.
- [233]. Coordes A, Groschel M, Ernst A, Basta D. Apoptotic Cascades in the Central Auditory Pathway after Noise Exposure. *J Neurotrauma* 2012; 29(6):1249-1254.
- [234]. Groschel M, Gotze R, Ernst A, Basta D. Differential impact of temporary and permanent noise-induced hearing loss on neuronal cell density in the Mouse central auditory pathway. *J Neurotrauma* 2010; 27: 1499–1507.
- [235]. Basta D, Tzschentke B, Ernst A. Noise-induced cell death in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex. *Neurosci Lett* 2005; 381:199–204.
- [236]. Kaltenbach JA, Zhang J, Finlayson P. Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 2005; 206: 200–226.
- [237]. Stolzberg D, Salvi RJ, Allman BL. Salicylate toxicity model of tinnitus. *Front Syst Neurosci* 2012; 6: 28.

ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Yasemin ÜSTÜNDAĞ

Doğum Yeri ve Yılı: Elazığ, 1985

E-posta:

yaseminustundag@firat.edu.tr

yaseminustundag@yahoo.com

Eğitim Bilgileri

Üniversite/ Fakülte/Okul	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Anatomi	Doktora	2009-2013
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Hekimliği	Lisans	2003-2008

Akademik ve Mesleki Deneyim

Kurum/Kuruluş	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Fırat Üniversitesi	Elazığ	Veteriner Fakültesi	Arş. Gör.	2009-2013
Leicester Üniversitesi	Leicester	Department of Cell Biology and Pharmacology	Staj	2012

Yayınları

Ulusal ve uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler

- 1-Karan M, **Üstündağ Y**, Aydın M. Saanen ırkı bir oğlakta rastlanılan cyclopia, arhinia ve hermafroditizm olgusu. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17(1): 147-150.
- 2-Atalar Ö, **Üstündağ Y**, Yaman M, Özdemir D. Comparative anatomy of the neurocranium in some wild carnivora. Journal of Animal and Veterinary Advances 2009; 8(8): 1542-1544.

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan tebliğ ve posterler

- 1-Karan M, **Üstündağ Y**, Aydın M. Saanen ırkı bir oğlakta rastlanılan cyclopia, arhinia ve hermafroditizm olgusu. VI. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, Afyonkarahisar, 16-19 Eylül 2010.
- 2-**Üstündağ Y**, Karan M, Doğan H. Bir ivesi kuzuda görülen çoklu kongenital anomaliler. VII. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, Antalya, 27-29 Ekim 2011.
- 3-**Üstündağ Y**. Salisilat ile indüklenen kulak çınlama modelinde flufenamik asitin etkisi. 3. Hücrel Sinirbilim Günleri, Samsun, 26 Mayıs 2012.
- 4-Bal R, Önalın E, Bulut F, **Üstündağ Y**, Öz E. Developmental changes of TRPM2 and TRPM7 expressions in mouse cochlear nucleus and inferior colliculus. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, 26-29 Haziran 2012.
- 5-**Üstündağ Y**, Dinç G, Bal R. Kulak çınlaması oluşturulmuş ratların koklear çekirdeklerinde bazı iyon kanalı ekspresyonlarının incelenmesi. VIII. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, İstanbul, 25-29 Haziran 2013.
- 6-**Üstündağ Y**, Dinç G, Bal R, Önalın E. Ratlarda oluşturulan kulak çınlaması ile koklear çekirdekdeki sinaptogenezin Real Time PCR ile incelenmesi. VIII. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, İstanbul, 25-29 Haziran 2013.
- 7- **Üstündağ Y**. Sodyum salisilat'ın MNTB (medial nucleus of trapezoid body) nöronları üzerindeki etkisinin elektrofizyolojik olarak incelenmesi. VIII. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, İstanbul, 25-29 Haziran 2013.