

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

**FARELERDE
AKUSTİK TRAVMA İLE OLUŞTURULMUŞ
TİNNİTUS MODELİNDE
UZUN SÜRELİ GÜÇLENME ARACILI
SİNAPTİK PLASTİSİTE SÜRECİNİN
İNCELENMESİ**

DR. ASLI ÇAKIR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2012

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

**FARELERDE
AKUSTİK TRAVMA İLE OLUŞTURULMUŞ
TİNNİTUS MODELİNDE
UZUN SÜRELİ GÜÇLENME ARACILI
SİNAPTİK PLASTİSİTE SÜRECİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ASLI ÇAKIR

DANIŞMAN

DOÇ. DR. MUSTAFA CENK ECEVİT

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ.....	3
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	4
KISALTMALAR.....	5
TEŞEKKÜR.....	7
ÖZET.....	8
ASBTRACT.....	10
GİRİŞ VE AMAÇ.....	12
GENEL BİLGİLER.....	13
Tinnitus.....	13
<i>Tanım.....</i>	<i>13</i>
<i>Epidemiyoloji ve Sınıflama.....</i>	<i>13</i>
<i>Ölçüm Yöntemleri ve Hayvan Modelleri.....</i>	<i>14</i>
<i>Şartsız Refleksler.....</i>	<i>15</i>
<i>Şartlı Refleksler.....</i>	<i>17</i>
<i>BALB/c Farelerde İşitme ve Tinnitusun Ölçümü.....</i>	<i>18</i>
Sinaptik Plastisite ve Elektrofizyolojik Olarak Ölçülmesi.....	18
<i>LTP.....</i>	<i>19</i>
<i>LTP'nin Elektrofizyolojik Olarak Ölçülmesi ve Yama Kenetleme</i>	
<i>Tekniği.....</i>	<i>21</i>
Dorsal Koklear Nükleusun Yapısı ve Tinnitus İle İlişkisi.....	24
<i>Dorsal Koklear Nükleusun Yapısı.....</i>	<i>24</i>
<i>Tinnitus Patofizyolojisi, Dorsal Koklear Nükleus ve Sinaptik</i>	
<i>Plastisite.....</i>	<i>28</i>
<i>Tinnitusta Dorsal Koklear Nükleus Aracılı Sinaptik Plastisite.....</i>	<i>30</i>
1. <i>Hasarla Uyarılan Plastisite.....</i>	<i>30</i>
2. <i>Temporal Plastisite.....</i>	<i>30</i>
3. <i>Uyarana Bağlı Plastiste.....</i>	<i>31</i>

4. Modölatör Plastisite.....	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
Deney Hayvanları ve Gruplar.....	32
Davranış Deneyleri.....	33
<i>Startle Refleks Süresi ve Boşluğu Algılama Süresi Ölçümleri.....</i>	<i>33</i>
<i>Akustik Travma Protokolü.....</i>	<i>35</i>
Elektrofizyolojik Deneyler.....	35
<i>Beyin Kesitlerinin Hazırlanması.....</i>	<i>35</i>
<i>Fuziform Hücrelerin Tanınması.....</i>	<i>35</i>
<i>Solüsyonlar.....</i>	<i>36</i>
<i>Tüm Hücre Yama Kenetleme Kayıtları ve LTP Protokolü.....</i>	<i>36</i>
<i>İstatistikel Analiz.....</i>	<i>37</i>
BULGULAR.....	38
TARTIŞMA.....	43
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 1.** Dorsal koklear nükleusta bulunan bazı hücrelerin input dirençlerinin megaohm, istirahat membran potansiyellerinin ise milivolt cinsinden gösterilmesi.....25
- Tablo 2.** Kontrol grubunda ve akustik travma grubunda akustik travma öncesi ve sonrasında “startle refleks süresi” ve “boşluğu algılama süresi” değerleri.....38
- Tablo 3.** Akustik travma ve kontrol grubunda “boşluğu algılama süresi” ve “startle refleks süresi” değerlerinin ortalaması ve istatistiksel analizi.....39
- Tablo 4.** Akustik travma grubunda akustik travma öncesi ve sonrasında “startle refleks süresi” ve “boşluğu algılama süresi” değerlerinin ortalaması ve istatistiksel analizi.....39
- Tablo 5.** Yüksek frekans stimülasyonu öncesi ve sonrasındaki 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. dakikalar arasındaki ortalama “eksitator post-sinaptik akım” değerleri.....40
- Tablo 6.** Yüksek frekans stimülasyon öncesi beş dakikaya kıyasla yüksek frekans stimülasyon sonrası 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. dakikalar arasında “eksitator post-sinaptik akım” değerlerindeki artış yüzdeleri.....41
- Tablo 7.** Kontrol ve akustik travma gruplarında uzun süreli güçlenme görülen farelerin sayısı ve gruplar içindeki yüzdeleri.....42

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Varsayımsal bir eksitator post-sinaptik potansiyel güçlenmesinin (uzun süreli güçlenme varlığının) sayısal değerlerle grafik üzerinde şematik olarak gösterilmesi.....20
- Şekil 2.** Uzun süreli güçlenme oluşumunun sinaptik terminalde şematik olarak çizimi.....21
- Şekil 3.** Yama kenetleme düzeneğinin şematik çizimi.....23
- Şekil 4.** Dorsal koklear nükleusun çok katlı yapısı ve ventral koklear nükleus, inferior kollikulus, işitme siniri ile olan bağlantılarının şematik çizimi.....24
- Şekil 5.** Fuziform ve Cartwheel hücrelerinin elektron mikroskopisindeki görünümü ve altında sırasıyla bu hücrelerin 200 milisaniye boyunca kaydedilen elektrofizyolojik ateşleme paternlerinin akım ve voltaj değişimi şeklinde grafiksel çizimi.....26
- Şekil 6.** Dorsal koklear nükleusun hücresel düzeyde bağlantılarının şematik çizimi.....27
- Şekil 7.** Startle kafesi ve sessiz kabin.....34
- Şekil 8.** Akustik travma grubundaki altı numaralı fareden elde edilen eksitator post-sinaptik akım amplitüdlerinde, yüksek frekans stimülasyon sonrasında, öncesine göre uzun süreli sinaptik güçlenme oluştuğunun gösterilmesi.....42

KISALTMALAR

ABR : İşitsel Beyinsapı Yanıtı (Auditory Brainstem Response)

AT : Akustik Travma

BAS : Boşluğu Algılama Süresi

cm : Santimetre

dB : Desibel

dk : Dakika

DKN : Dorsal Koklear Nükleus

DTH : Dış Tüy Hücresi

EPSA : Eksitator Post-sinaptik Akım

EPSP : Eksitator Post-sinaptik Potansiyel

İTH : İç Tüy Hücresi

Hz : Hertz

K : Kontrol

kHz : Kiloherertz

LTD : Uzun Süreli Sönme (Long Term Depression)

LTP : Uzun Süreli Güçlenme (Long Term Potentiation)

mL : Mililitre

mM : Milimol

ms : Milisaniye

mV : Milivolt

MW : Megaohm

nm : Nanometre

pA : Pikoamper

SOAE : Spontan Oto Akustik Emisyon

SPL : Ses Şiddeti Düzeyi (Sound Pressure Level)

SRS : Startle Refleks Süresi

WCPC : Tüm Hücre Yama Kenetleme (Whole Cell Patch Clamp)

YFS : Yüksek Frekans Stimülasyon

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmem konusunda her zaman destek veren ve yanımda olan, çocukluğumdan beri hekimlik mesleğine derin bir hayranlık ve saygı duymamı sağlamış babam Dr. Halis Çakır ve eczacı annem Armağan Çakır'a, İngilizce çevirilerdeki yardımları ile büyük katkı sağlayan ablam Arzu Çakır'a, sevgi ve şefkat dolu biricik tatlı anneanneme, her türlü zorlukta maddi ve manevi sonsuz yardımları nedeniyle en başta tez danışmanım Dr. M. Cenk Ecevit olmak üzere, Dr. Bülent Şerbetçioğlu ve Dokuz Eylül Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı ile İşitme Konuşma Denge Ünitesi'nin saygıdeğer diğer tüm öğretim üyelerine, sevgili arkadaşım Uz. Ody Selhan Gürkan başta olmak üzere İşitme Konuşma Denge Ünitesi'ndeki çok değerli çalışma arkadaşlarıma, bu tezin yapımı sırasında büyük emeği geçen Fırat Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Ramazan Bal'a, bu tezin düşünsel anlamda ilk planlamalarını bana vermiş oldukları bakış açısı sayesinde sağladığım Hacettepe Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. E. Rüştü Onur ve Dr. M. Yıldırım Sara'ya, daha pek çok farklı konudaki katkılarından ötürü diğer bütün çok kıymetli hocalarıma, arkadaşlarıma ve teknik desteklerinden dolayı İntermedkom Elektronik ile Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'ne çok teşekkür ederim.

ÖZET

Farelerde akustik travma ile oluşturulmuş tinnitus modelinde uzun süreli güçlenme aracılı sinaptik plastisite sürecinin incelenmesi

Aslı Çakır

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, İzmir

aslicakir84@hotmail.com

Amaç ve Hipotez

Tinnitus herhangi bir dış uyarı olmaksızın ses algılanmasıdır. Tinnitusun patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, sinaptik plastisite ile olan ilişkisi bu açıdan üzerinde durulan bir konudur.

Sinaptik plastisite, iki nöron arasındaki sinapsın dış veya iç ortam değişikliklerine bağlı olarak farklılaşmasıdır. Sinaptik plastisitenin bazı elektrofizyolojik ölçümlerle değerlendirilebilmesi mümkündür. Bu amaçla kullanılabilen düzeneklerden bir tanesi yama kenetlemedir ve bu şekilde uzun süreli güçlenme ortaya konabilmektedir.

Bu çalışmada, akustik travma modeli ile oluşturulan tinnitusun patogenezinde uzun süreli güçlenme aracılı sinaptik plastisitenin varlığının gösterilmesi amaçlandı.

Yöntem

Çalışmada 15'i kontrol, 15'i akustik travma grubu olmak üzere toplam 30 adet postnatal 16 günlük BABL/c fare kullanıldı. Hayvanlarda akustik travma modeli ile tinnitus oluşturuldu. Deney hayvanlarında tinnitusun varlığı ve işitme düzeyinin saptanması startle refleks süresi ve boşluğu algılama süresi ölçümleriyle gerçekleştirildi.

Postnatal 17. Günde farelerin dorsal koklear nükleuslarından izole edilen fuziform hücrelerde tüm hücre yama kenetleme tekniği kullanılarak uzun süreli güçlenmenin varlığı araştırıldı.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm deney hayvanlarının postnatal 16. Günde 90 dB SPL saf ses ile yapılan ölçümlerinde Startle refleks süreleri beş saniyenin altında saptandı. Kontrol grubu ile akustik travma öncesi akustik travma grubunun boşluğu algılama süreleri arasında

istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,604$). Akustik travma grubunda akustik travma sonrası 100 dB SPL saf ses ile yapılan ölçümlerde, deney hayvanlarının startle refleks süreleri beş saniyenin altında elde edilirken, akustik travma öncesine göre boşluğu algılama sürelerinde istatistiksel olarak belirgin artış saptandı ve böylece tinnitusun oluştuğu görüldü (akustik travma öncesi $9,58\pm1,65$ sn, akustik travma sonrası $36,89\pm5,08$ sn, $p=0,001$). Tinnitus oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre uzun süreli güçlenme görülme sıklığı da anlamlı derecede yüksek bulundu (akustik travma grubunda %86,7 ve kontrol grubunda %13,3 $p=0.000$).

Sonuç

Tinnitusta sinpatik plastisitenin varlığı, tinnituslu hastalarda ve hayvan deneylerinde, bazı kortikal ve subkortikal işitme merkezlerinde aktivite artışının saptanmasıyla dikkati çekmiştir. Farklı merkezlerle bağlantılara olanak veren çok katlı anatomik yapısı ve fizyolojik özellikleri ile dorsal koklear nükleusun, tinnitusta sinpatik plastisitenin kilit noktası olabileceği düşünülmektedir. Sinaptik plastisite göstergelerinden biri olan uzun süreli güçlenmenin bazı hücrelerinde gözlenebilmesi, dorsal koklear nükleus ile ilgili bu konudaki şüpheleri arttırmaktadır.

Bu çalışmada, tinnitusu olan farelerin dorsal koklear nükleuslarında, uzun süreli güçlenmenin kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla saptanması, tinnitusun patogenezinde sinaptik plastisitenin varlığına dair güçlü bir kanıt oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler

Tinnitus, sinaptik plastisite, dorsal koklear nükleus, uzun süreli güçlenme

ABSTRACT

Evaluation of the synaptic plasticity via long term potentiation in the acoustic trauma tinnitus model of mice

Aslı Çakır

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, İzmir

aslicakir84@hotmail.com

Aim and Hypothesis

Tinnitus is the perception of a sound in the absence of any external stimulus. Though its pathophysiological process still remains obscure, tinnitus has been under investigation for its association with synaptic plasticity in recent years.

Synaptic plasticity is the differentiation of a synapse between two neurons due to the changes in external or internal environment. Synaptic plasticity can be evaluated by some electrophysiological measurements. Patch clamp is among the procedures, which are used for this purpose, and the long term potentiation is the electrical activity which is observed as the change.

This study aimed to indicate the existence of the synaptic plasticity by figuring out the long term potentiation in the pathophysiology of tinnitus which was induced by the acoustic trauma model.

Method

A total of 30 postnatal 16-day BABL/c mice consisting of 15 mice as the control group and 15 mice as the tinnitus induced group were used in the study. Tinnitus was induced in the mice through the acoustic trauma model. The induction of tinnitus in the mice and the hearing level was found by the startle reflex time and gap detection time measurements.

The probability of the long term potentiation was searched by using the whole cell patch clamp technique in the fusiform cells which were isolated from the dorsal cochlear nucleus of the mice on their postnatal day 17.

Results

The measurements, which were made on all experiment mice on their postnatal day 16 by using 90 dB SPL pure tone, gave the startle reflex time less than 5 seconds. No statistical difference was found between the control group and the pre-trauma acoustic trauma group with regard to gap detection time ($p=0,604$). The experiments performed by using 100 dB SPL pure tone after acoustic trauma. While the startle reflex time of the experiment mice was found to be less than 5 seconds with 100 dB SPL pure tone in the acoustic trauma group, a statistically significant increase was found in their gap detection times compared to the pre-trauma period and tinnitus was observed to have been induced, so ($9,58\pm 1,65$ sec. in the pre-trauma period?? and $36,89\pm 5,08$ sec. in the post-trauma period $p=0,001$).

In the tinnitus induced group, the long term potentiation was found to be meaningfully higher than the control group (86,7 % in the acoustic trauma group and 13,3 % in the control group $p=0.000$).

Conclusion

The existence of synaptic plasticity in tinnitus drew attention as a result of the increased activity some cortical and subcortical areas of patients complaining about tinnitus and experiment mice. It is considered that dorsal cochlear nucleus, with its multilayer anatomical structure and physiological characteristics that allow associations with various cortical and subcortical regions, can be the key point of synaptic plasticity in tinnitus. The fact that the long term potentiation, which is one of the key indicators of synaptic plasticity, can be observed in some cells raise concerns about dorsal cochlear nucleus in this subject.

The long term potentiation, which was found to be meaningfully higher in the dorsal cochlear nuclei of the mice with tinnitus than the control group ($p=0.000$), constitutes a strong evidence of the existence of synaptic plasticity in the pathophysiological mechanism of tinnitus.

Key Words

Tinnitus, Synaptic Plasticity, Dorsal Cochlear Nucleus, Long Term Potentiation

GİRİŞ VE AMAÇ

Tinnitus ortamda bir ses kaynağı olmadığı halde algılanan sestir (1). Günümüzde, giderek çoğalan bir popülasyonda görülmesi ve kişilerin hayat standartlarını olumsuz yönde etkiliyor olması nedeniyle tinnitus ile ilgili araştırmalar artmaktadır (1,2). Bu çalışmaların ortak noktası tinnitust patogenezinde moleküler mekanizmaların ortaya koyularak tedavi için etkin yöntemlerin geliştirilmesinin sağlanmasıdır.

Literatürde tinnitus tedavisinde ile ilgili farklı tedavi seçenekleri olmakla beraaber çeşitli ilaçlar, botox uygulamaları, işitme cihazları, koklear implantlar, transkranial manyetik stimülasyon, cerrahi yaklaşımlar, ses terapisi, lazer uygulamaları ve bilişsel davranışçı terapilerin yer aldığı gözlenmekle birlikte günümüzde tinnitus için orta ve uzun vadede kalıcı başarı sağlayan bir tedavi yöntemi henüz bulunmadığı belirtilmektedir (3,4). Bu noktada tinnitusun patogenezinin aydınlatılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Konu ile ilgili bilimsel çalışmaların yapılabildiği çeşitli hayvan modelleri tanımlanmıştır (1,5-7). Akustik travma modeli insanda görülen tinnitusun etiyolojik olarak büyük kısmını oluşturması ve kalıcı tinnitusa yol açması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (5,8).

Tinnitusun patogenezi ile ilgili son yıllarda üzerinde durulan teorilerden biri, tinnitusta sinaptik plastisitenin varlığı ve bazı anatomik yapıların bu duruma olan etkisi ile ilgilidir. Bu açıdan en çok dikkat çeken anatomik yapı dorsal koklear nükleustur (DKN). Pek çok araştırmacı tinnitus varlığında bu çekirdeğin spontan ateşleme düzeyinde anlamlı artışlar saptarken, bazı araştırmacılar da çekirdeğin serebelluma benzeyen çok tabakalı ve farklı sinaptik bağlantılar içeren yapısıyla nöroplastik bir süreçte görevli olabileceğini iddia etmektedirler. DKN’de uzun vadeli sinaptik plastisite mekanizmalarından uzun süreli güçlenme (LTP) ve uzun süreli sönmenin (LTD) gösterilmesi sayesinde, bu çekirdeğin pek çok plastisite modelinde kilit nokta işaret edildiği bildirilmektedir (9-12).

Bu çalışmada, farelerde akustik travma ile oluşturulmuş tinnitus modelinde DKN’de LTP oluşumunun kontrol grubuyla kıyaslanarak incelenmesi ve tinnitusun LTP üzerinden sinaptik plastisiteyle olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Tinnitus

Tanım

Tinnitus, dışarıdan gelen bir ses olmadığı halde tek veya bazen her iki kulaktan duyulan ses algısıdır (1,2,13). Kelimenin kökeni Latince’de zil sesi veya çalmak anlamına gelen Tinnire’dir (14). Tinnitus bir hastalık değil, bir semptomdur ancak geçirilmiş bazı hastalıkların neden olduğu farklı patofizyolojik süreçler ile ortaya çıkmış bir sekel olarak da görülebilmektedir (1).

Epidemiyoloji ve Sınıflama

Tinnitusun görülme sıklığı değişik çalışmalarda farklı rakamlarla ifade edilir. 1978’de Medical Council’s Institute of Hearing Research tarafından İngiltere’de yapılan bir çalışma 19000’in üzerinde katılım ile ilk geniş tabanlı tinnitus prevalans çalışması olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışma, 17 yaş üstü insanların % 15,8-18,6’sının beş dakikanın üzerinde devam eden bir tinnitus deneyimi yaşadığını ortaya koymuştur. Bu grubun % 8’i tinnitusun orta veya ağır boyutta rahatsız edici ya da uykudan uyandırıcı nitelikte olduğunu belirtirken, % 0,5’i normal yaşamlarını olumsuz etkileyecek boyutta ağır bir tinnitus ifade etmişlerdir (15). Daha sonra tekrar İngiltere’de yapılan bir çalışmada genel erişkin popülasyonunda spontan tinnitus prevalansı % 9,7 ve farklı çalışmalarda İsveç’te % 14,2, İtalya’da ise % 14,5 olarak ifade edilmiştir (16-18). 1972’de 2000’in üzerinde okul çağı çocuğunda yapılan bir başka çalışmada ise, bu yaş grubu çocukların % 13’ünde tinnitus görüldüğü belirlenmiştir (19). ABD’de 1996’da yapılan araştırmada tüm yaşlar dahil edildiğinde bu oran % 3,45 yaş altında %1 ve 45 yaş üstünde % 9 olarak gösterilmiştir (20).

Epidemiyolojik faktörler ile tinnitus arasında karmaşık bir bağlantı söz konusudur. Yaş arttıkça, işitme düzeyi kötüleştikçe ve kadın cinsiyette erkeklere oranla tinnitus görülme sıklığı artmaktadır. Ayrıca düşük sosyoekonomik düzey ve mesleki gürültüye maruz kalanlarda da prevalans daha yüksektir (14).

Günümüzde tinnitus için başlıca iki sınıflama mevcuttur. Bunlardan birisi daha çok etiyolojiye, diğeri ise tinnitus sesinin şekline göre yapılır. Bu bağlamda bir ayırım, tinnitusun subjektif ve objektif olmasıdır. Subjektif (diğer sıkça kullanılan adıyla idiyopatik) tinnitus yalnızca hasta tarafından fark edilirken, objektif tinnitus hem hasta hem doktor tarafından duyulur; bu nedenle muayene sırasında kulağın ve çevre damar yapılarının oskültasyonu önemlidir. Diğer bir sınıflama ise tinnitusun pulsatil veya non-pulsatil olmasına göre yapılmaktadır. Non pulsatil tinnitus hafif ve ağır olarak derecelendirilebilirken, pulsatil tinnitus etiyolojisine göre vasküler (arteriyel veya venöz malformasyonlar - fistüller, hipertansiyon vb) ve non-vasküler (palatal, stapes kası ve tensor timpani kası miyoklonusları vb) olarak ikiye ayrılır (2).

Nodar ve Goodhill tarafından çeşitli sınıflamalar yapılmış olsa da 1980'lerin başlarında yapılan bir sınıflama sisteminde tinnitus ilk defa otolojik ve nörootolojik olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Dış ve orta kulak kaynaklı tinnituslar otolojik sınıf içine alınırken, daha önceden subjektif idiyopatik tinnitus olarak adlandırılan çoğu tinnitus olgusu da nörootolojik sınıf içerisine alınmıştır. 1996'da ise Nodar tarafından yeni bir klasifikasyon şeması ve iki kısaltma tanımlandı: ABC (Aurium (tek kulak), Binaural (iki kulak), Cerebri (baş merkezli)), C-CLAP (Cause (neden), Composition (hastanın tinnitusu tarif şekli), Loudness (tinnitusun yüksekliği), Annoyance (tinnitusun rahatsız edicilik düzeyi), Pitch (tinnitusun derecesi)) (2,21).

Ölçüm Yöntemleri ve Hayvan Modelleri

Deney hayvanlarında tinnitus geliştirmek amacıyla, çok çeşitli farmakolojik ajanlar ve gürültü uygulamaları kullanılır. Literatürde bu amaçla en sık tercih edilen iki ise yöntem salisilat uygulaması ve akustik travmadır (8,22).

Salisilat ile ilgili olarak Cazals tarafından yapılan çalışmada, bu etken maddenin, tinnitus oluşumu haricinde koklea, işitme sistemi ve genel anlamda organizma üzerinde çeşitli biyolojik, kimyasal ve fiziksel etkilerinin de bulunabileceği gösterilmiş, bu etkilerin farklı dozlarda, farklı zamanlarda ve farklı şekillerde ortaya çıkabileceğinin vurgulanmıştır (5). Ayrıca salisilatın daha çok pulsatil ve geçici özellikte tinnitustan sorumlu olduğu bildirilmektedir. Akustik travma sonrası oluşan tinnitus ise kroniktir ve tinnitus etiyojisinde salisilata oranla çok daha büyük bir pay sahibidir (5,8).

Tinnitusun varlığının hayvanlarda ortaya konulması ise çeşitli davranış deneyleri ile mümkündür. Bu amaçla kullanılan yöntemler şartlı ve şartsız refleksler olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır. Bu refleksler tinnitus modelinde kullanılan deney hayvanının sergileyebileceği motor ve kognitif beceriler ve işitme düzeyi açısından türüne ve yaşına göre çeşitlilik gösterir (23).

Şartsız Refleksler

Şartsız refleksler sese karşı verilen doğal tepkilerin gözlemlenmesine dayanır. Tepki herhangi bir şarta bağlı değildir. Bu amaçla kullanılan yöntemler arasında Preyer refleksi, 1908'de Preyer'in sese karşı kobayların aurikularında seğirme hareketi gözlemleyerek, bu reflekse ismini vermesiyle literatüre girmiş ve daha sonra farklı türlerde de gösterilmiştir. Startle refleksi ise sese karşı deney hayvanının ekstremiteleri, gövdesi veya baş-boyun bölgesindeki ani olarak gelişen özgül olmayan hareketleri tanımlar (23).

Startle refleksi 1960'lı yıllarda pek çok araştırmacı tarafından yavru ve erişkin fareler üzerinde işitme ve tinnitus deneylerinde çalışılmış bir yöntemdir. Startle refleksinin bazı deneylerde süresi, bazı deneylerde ise amplitüdü ölçülür. Belli bir ortamda bulunan deney hayvanına, o yaş grubundaki işitme düzeyi ve deneyin kurgusu doğrultusunda süresi, şiddeti ve frekansı belli bir ses verilir. Deney hayvanının sese, ses vermeye başladıktan ne kadar süre sonra tepki verdiği ölçüldüğünde, elde edilen değer Startle Refleks Süresi (SRS) olarak isimlendirilir. Literatürde SRS, deney hayvanının verilen sesi ne zaman duyduğunu, ya da duyup duymadığını ifade eder. Dolayısıyla, deney hayvanlarının işitip işitmediklerinin ve işitme eşiklerinin belirlenmesinde kullanılan subjektif ancak güvenilir ölçüm yöntemlerindendir. Normal işiten küçük (fare, sıçan) deney hayvanlarının kullanıldığı

Çalışmalarda SRS analizleri 80-120 dB SPL ses düzeylerinde yapılmakta ve 15-200 milisaniye aralığında kaydedilmektedir. Çalışmada belirlenmiş st sınır süresi boyunca verilen sese startle refleksi göstermeyen deney hayvanı, o şiddet ve frekanstaki sesi duymuyor demektir. (23,24).

Birbirinden farklı şiddetlerde sesler veya birbirinden farklı işitme düzeylerindeki deney hayvanlarının kullanıldığı çalışmalarda, verilen sese karşı deney hayvanının geliştirdiği tepkinin (vücudun herhangi bir yerindeki hareketin) amplitüdü, buna uygun olarak dizayn edilmiş startle kafesinde, kafesin tabanında bulunan bir sensör vasıtasıyla elektrik enerjisine çevrilerek, voltmetreden voltaj amplitüdü cinsinden okunabilmektedir. Bu yolla elde edilen değere startle refleks amplitüdü ismi verilir. Amplitüdü lmleri fare kullanılan çalışmalarda, postnatal bir aydan küçük fare yavrularının motor davranışlarının çok tutarlı olmaması nedeniyle, erişkin hayvanlar üzerinde yapılmaktadır. Literatüre bakıldığında bu hesaplamaların yapıldığı farelerin minimum postnatal bir aylık oldukları dikkati çekmektedir (23-26).

Bu refleksler bazı araştırmacılar tarafından ve kalitatif olarak görülse de, gözlemcinin dikkati ve tekrarlanan testlerdeki tutarlılık ile bu yöntemler, bazı koşullarda objektif testlerin yerini alabilmektedirler. Bunların haricinde 1976'da Ehret tarafından fare yavrularında gözlemlenen sese yönelme cevabı, kalp atım hızındaki değişiklikler ve galvanik deri yanıtı gibi davranışlar da şartsız refleksler arasında sayılmaktadır (23).

Yukarıda bahsedilen bu yöntemler aslında daha çok işitmenin değerlendirilmesi amacıyla kullanılır. Turner ve arkadaşları tarafından 2006'da tanımlanan boşluğu algılama yöntemi ise tinnitusun değerlendirmesinde kendinden önceki yöntemlere güçlü bir alternatif olarak literatürde yerini almıştır (27).

Boşluğu algılama yönteminde, sesli ortama alışmış deney hayvanının sessiz ortamı ne zaman algılayacağı ya da algılayıp algılamayacağı değerlendirilir. Yöntem, tinnitusu olan ve tinnitusu olmayan, normal işiten deney hayvanlarında sessizliğin fark edilme süresi, tekrar ses verildiğindeki tepki ve sesi algılama zamanının farklı olması gözlemlerine dayanmaktadır. Tinnitusu olan deney hayvanı, belli bir sesli ortamdan sessiz ortama alındığında, işitmekte olduğu tinnitus sesi nedeniyle, sessizliği daha geç algılar veya algılayamaz ve ayrıca sonrasında verilen aynı şiddetteki sese de daha geç veya daha az tepki verir (7,27).

Aynı startle refleksinde olduğu gibi bu yöntemde de süre ve amplitüd ölçümü yapılabilir. Boşluğu algılama süresi, sessiz ortama geçen deney hayvanının bu farkı sesin kesilmesinden ne kadar süre sonra anladığının verdiği tepkinin gözlenmesi yoluyla hesaplanmasına dayanır ve elde edilen sayısal değere boşluğu algılama süresi (BAS) adı verilmektedir. Amplitüd ise bu tepkinin startle kafesinde daha önce bahsedildiği gibi ölçülmesi ile bulunmaktadır. Startle refleksinde olduğu gibi, boşluğu algılama refleksi için de postnatal bir aydan küçük fare yavrularında amplitüd ölçüm sonuçları tutarlı olmaması nedeniyle anlamlı görülmemektedir (7,27).

Şartlı Refleksler

Bu tarz refleksler bir koşulsuz uyarıyı takiben oluşan koşullu cevapları içerir. Hayvan deneylerinde tinnitus ölçümü için literatürde en sık kullanılan şartlı refleksler arasında elektroşok ile korkutma esasına dayanan göz kırpması refleksi ile Jastreboff ve arkadaşları tarafından 1980 ve 1990'lı yıllarda tanımlanan yemek yeme ya da su içme davranışlarından kaçınma refleksleri yer almaktadır. Jastreboff'un çok kullanılan modelinde, sesli uyarı varken normal bir şekilde su içme veya yemek yeme davranışında bulunan deney hayvanı, sessiz ortamda tam su içeceği veya yemek yiyeceği sırada uygun bir süre boyunca tekrarlanan elektroşok uygulamalarına maruz bırakılarda sessiz ortamda bu davranışlardan kaçınmaya şartlandırılır (28). Daha sonra tinnitus oluşturulan deney hayvanının, sessiz ortamda kaldığında ses varmış gibi davranarak, normal bir şekilde yemek yemeye veya su içmeye devam etmesi beklenir. Aksi halde tinnitusun oluşmadığı yorumu yapılmaktadır (1,22,23). Literatürde ayrıca labirent ve bulmaca testleri ile tinnitusun değerlendirildiği yöntemler de dikkati çekmektedir (8).

Tinnitus değerlendirmesinde kullanılan şartlı refleksler, deney hayvanını psikolojik olarak etkileyebilecek bir stres kaynağı olan elektrik şoku uygulamasını veya öğrenme ve bellek fonksiyonlarını kullanmasını gerektiren labirent ve bulmaca tarzı yöntemleri içerdiği için, kullanılan deney hayvanının belli bir yaşa, kognitif ve motor beceri olgunluğuna erişmiş olması gerekmektedir. Bu nedenle bu tarz yöntemlerin, yavru deney hayvanlarında kullanımı sınırlıdır.

BALB/c Farelerde İşitme Ve Tinnitus Varlığının Ölçümü

BALB/c fare, biyomedikal araştırmalar ve davranış deneylerinde sıklıkla kullanılan bir fare soyudur. İlk defa Willot ve arkadaşları tarafından 1995 yılında, 23 aylık BALB/c farelerde yoğun koklear atrofi ve spiral ganglion hücresi hasarı olduğunu gösteren ve daha sonra bu araştırmayı destekleyen pek çok benzer sonuçlu çalışma sayesinde BALB/c fareler, literatürde genellikle senil sensörinöral işitme kaybı modeli olarak kullanılmaktadır (29,30).

BALB/c farelerin işitme sistemleri postnatal dönemde de gelişmeye devam eder ve postnatal 15-16. günde 6 kHz'te 60-70 dB SPL saf ses ABR eşiklerine ulaşır. İşitme eşikleri takip eden 5-6 gün içerisinde normal erişkin düzeye ulaşan bu farelerin postnatal erken dönemde ve ilerleyen yaşlarda frekansa özgü işitme eşikleri ABR ölçümleri ile gösteren, çalışmalar mevcuttur (31-33). Bu çalışmada deney hayvanı olarak BALB/c fareler kullanılmıştır.

Sinaptik Plastisite ve Elektrofizyolojik Ölçümü

Sinaptik plastisite, nöronlar arasındaki sinapların çeşitli uyarı veya çevresel değişikliklere karşı gösterdiği yapısal ve işlevsel yeniden şekillenme veya sinaptik güçlenme yeteneğidir (34). 1949'da Hebb tarafından yapılan orijinal tanımına göre, öğrenme sırasında belleğin oluşması ve stabilizasyonu, mevcut nöronal devrelerin sinaptik gücündeki modifikasyonlarla oluşur (35,36). Beyin plastisitesi temel olarak sinaps düzeyindeki değişiklikler ve bunların nöron gövdesinde (non sinaptik) meydana getirdiği modifikasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (37).

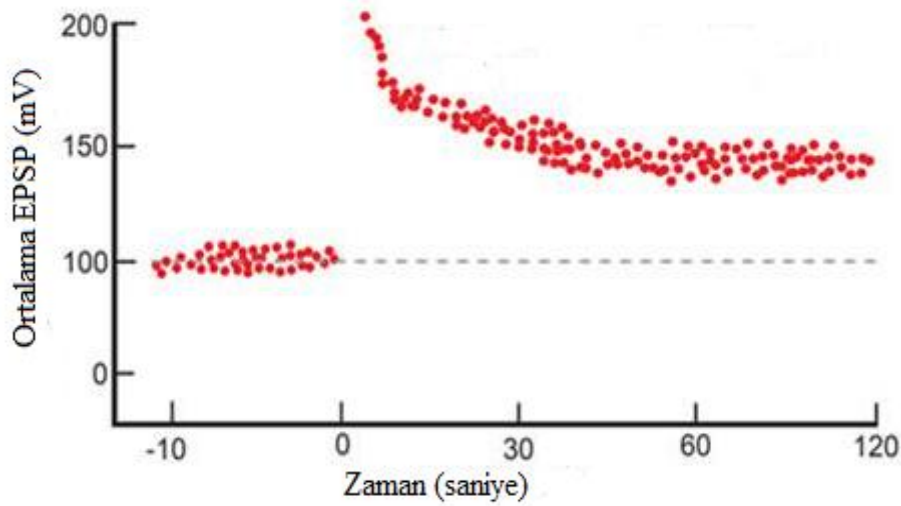
Günümüzde sinaptik plastisitenin oluşumunda birbirini takip eden başlıca iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki, uyarı sonrası sinaptik terminallerdeki reseptörlerin aktivasyonu veya inhibisyonu ve bu sayede iyon kanalları, nörotransmitterler ve protein kinazlardaki aktivite ve miktar değişimleri; ikincisi ise ikincil mesajcı sistemler aracılığıyla gen transkripsiyonunun aktivasyonu veya inhibisyonu sayesinde ortaya çıkan protein modifikasyonları ve sinapsın yapısal olarak değişimidir (35). Ayrıca birbirini takip eden bu iki süreç, nöronların membran istirahat potansiyeli, iyon kanalı açılma kinetikleri ve

uyarılabilirlik olasılıklarını da uzun vadede değiştirerek aynı zamanda non sinaptik plastisiteye de olanak vermiş olur (38).

Sinaptik plastisite, ortaya çıkan değişikliklerin başlama ve sonlanması için geçen süreye göre kısa ve uzun vadeli, ya da diğer isimlendirmesiyle geçici ve kalıcı olmak üzere ikiye ayrılır. Kısa süreli değişiklikler, fasilasyon, post tetanik potansiyalizasyon, desensitizasyon, kısa süreli güçlenme (short term potentiation) ve kısa süreli sönme (short term depression) gibi başlıklar altında incelenebilen, uyarı sonrası sinapsın cevabında saniyeler içerisinde ortaya çıkan ve kaybolan farklılıklardır (39). Uzun süreli, kalıcı değişiklikler söz konusu olduğunda ise uzun süreli güçlenme (long term potentiation, LTP), uzun süreli sönme (long term Depression, LTD), sinaptogenez ve nörogenezden bahsedilmektedir (35).

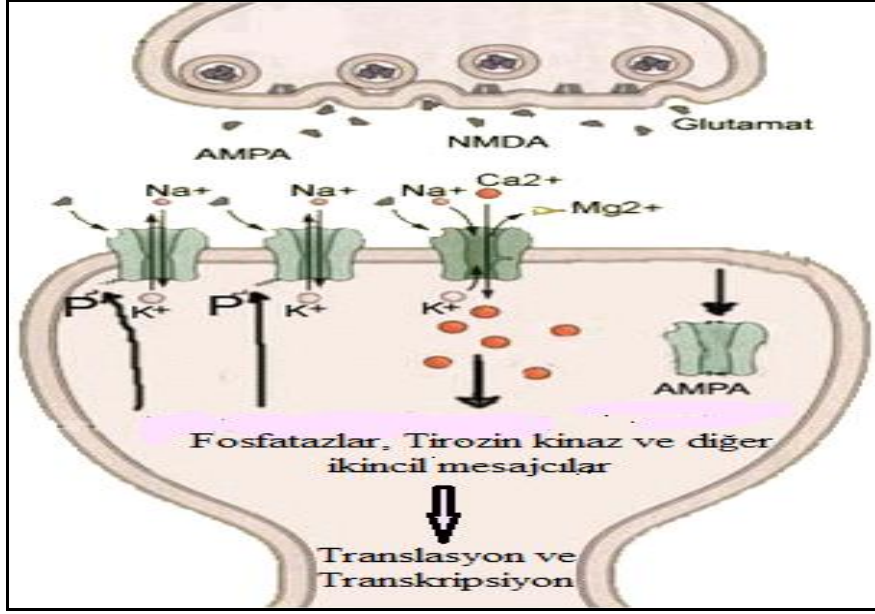
LTP

LTP'nin varlığı ilk defa 1973'te Bliss ve Lømo tarafından tavşan hipokampusünde keşfedilmiştir. Araştırmacılar deneylerinde, hipokampüse neokortikal alanlardan işlenmemiş bilgi taşıyan majör input sağlayıcı perforan yolağa uygun protokolde verilen yüksek frekans stimülasyon ile dentat gyrustaki granül hücrelerinin sinapslarında devamlı bir sinaptik güçlenme oluştuğunu, kaydedilen eksitator post-sinaptik potansiyelin (EPSP) belirgin bir şekilde arttığını ve bu elektriksel güçlenmenin en az 30 dakika olmak üzere kayıt alabildikleri 10 saate kadar devam edebildiğini göstermişlerdir. Bundan sonra yapılan çalışmalarla LTP'nin farklı türlerde ve beynin farklı bölgelerinde de görülebildiği bildirilmiştir (35,40).



Şekil 1. Varsayımsal bir eksitator post-sinaptik potansiyel güçlenmesinin (uzun süreli güçlenme varlığının) sayısal değerlerle grafik üzerinde şematik olarak gösterilmesi (“0.” saniyede LTP protokolü uygulandığı varsayılmıştır.)

LTP oluşumundaki primer mekanizma, yavaş aktive olan voltaj kapılı bir reseptör olarak bilinen N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörünün aktivasyonudur. NMDA reseptörü, hem presinaptik veziküller tarafından salıverilen glutamatın bağlanmasını hem de bu şekilde alfa amino 3-hidroksi 5-metil 4-izoksazolpropianat (AMPA) reseptörlerinin aktivasyonu ile oluşacak yeterli postsinaptik depolarizasyonun sağlanmasını kontrol etmektedir. Bu iki durum kesiştiğinde postsinaptik nöron içerisine LTP’yi tetikleyen kalsiyum iyonları girmeye başlar. G proteini kenetli metabotropik glutamat (mGluR) reseptörleri ve ikincil mesajcı inozitoltrifosfat (IP₃) sistemi aracılığıyla dendritlerin dikensi çıkıntılarında (spine) depolanmış intrasellüler kalsiyum da mobilize edilerek kalsiyum salınımı amplifiye edilir. Kalsiyum salınımı, posttranslasyonel modifikasyon ve proteinler arası etkileşimler sonucu çok sayıda sinaptik proteinin aktivasyonuna ve sinapsın modifikasyonuna imkan vermektedir. Uzun vadede ise bu durum, genlerin transkripsiyonunun indüksiyonunu tetikleyerek nöroplastik değişimlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (35).



Şekil 2. Uzun süreli güçlenme oluşumunun sinaptik terminalde şematik olarak çizimi (Sinaptik terminalde AMPA ve NMDA reseptörlerine glutamat, sodyum ve magnezyumun bağlanması ile hücre içi kalsiyum seviyesi belirgin ölçüde artar. Bu artış ikinci mesajcı sistemler aracılığıyla translasyon ve transkripsiyon düzeyindeki değişikliklerin gerçekleşebilmesi için nöron çekirdeğine iletilir.)

LTP'nin Elektrofizyolojik Olarak Ölçümü ve Gösterilmesi – Yama Kenetleme Tekniği

LTP, uygun bir frekans ve amplitüddeki elektriksel uyarı sonrasında, nöronun eksitator post-sinaptik potansiyel (EPSP) veya eksitator post-sinaptik akım (EPSA) değerlerinin bazal değerlere göre genellikle %10 veya üzerinde ve uyarı sonrası 10 dakikadan daha fazla devam edecek şekilde artmasıdır (41). Bu tanımdan da anlaşıldığı üzere, aslında meydana gelen olaylar bir elektriksel güçlenmedir. Dolayısıyla, elektrofizyolojik sistemler vasıtasıyla, nöron monitörize edilerek LTP'nin varlığı gösterilebilir ve üzerinde çalışmalar yapılabilir. Bu amaçla günümüzde en sık kullanılan tekniklerden biri yama kenetleme yöntemidir (35,40-42).

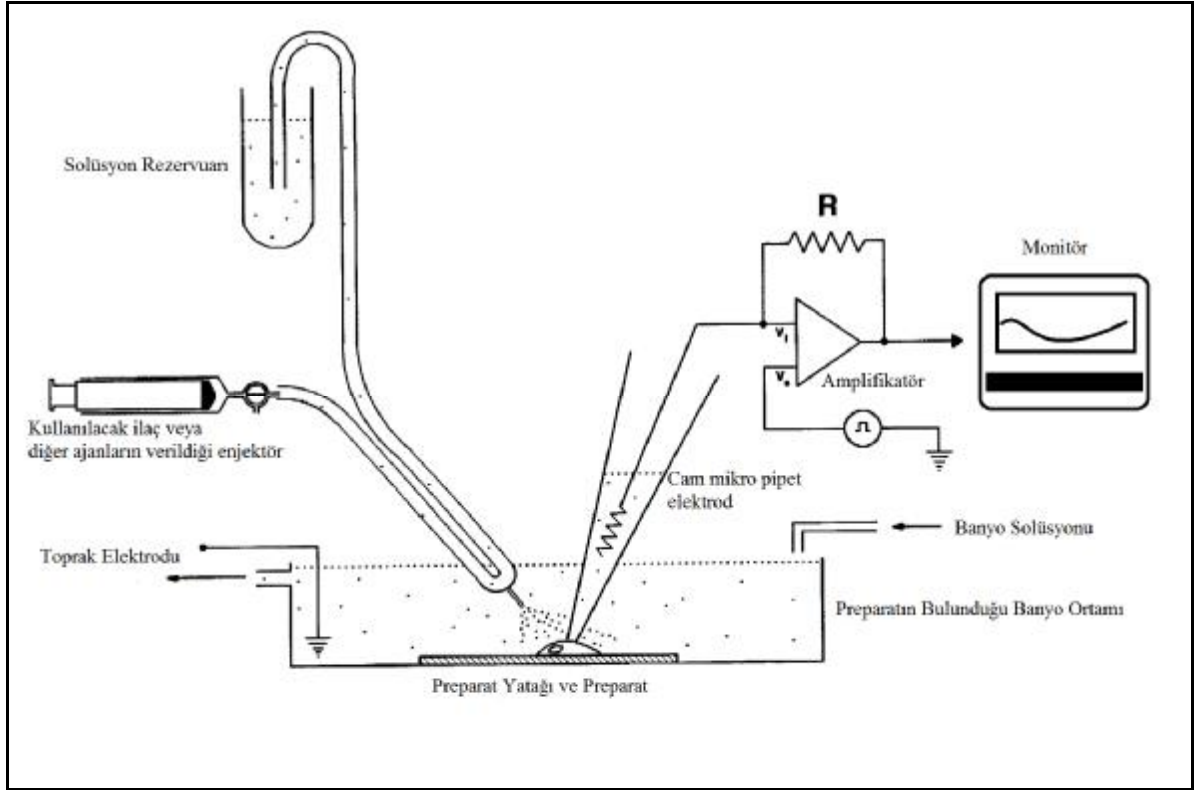
Yama kenetleme tekniği 1960 ve 1970'lerde mürekkep balığının dev aksonunu biyofiziksel olarak değerlendirmek için kullanılan voltaj kenetleme tekniğindeki birbirinden ayrı iki sistemin fikren ve yöntemsel olarak birleştirilmesi ile oluşmuştur. Bu sistemlerden ilki, aksiyal tel elektrodlar, diğer i se internal perfüzyon ve diyaliz sistemidir (43). Bu iki sistem yama kenetleme tekniğinde birleştirilerek, membranın iyon akımları hem elektriksel hem de kimyasal olarak kontrol edilebilir hale getirilmiştir. Ortaya çıkan bu yeni yöntem sayesinde, bir yandan membranın iki tarafındaki elektriksel potansiyel veya akım değerlişlerinin kontrolü sağlanabilirken, öte yandan da hücre içerisine bazı farmakolojik ajanların ya da çözeltilerin verilebilmesi mümkün olmaya başlamıştır (42).

Voltaj kenetleme tekniğini geliştirerek 1963 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji dl kazanan Hodgkin ve Huxley bu yöntemle, voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarının, farklı membran potansiyellerindeki iletkenliklerini saptayarak, aksiyon potansiyelinin ve EPSP'lerin genliğini, ampltdn ve zamansal yapısını matematiksel olarak ortaya koymuşlardır. Böylece EPSP ölçülebilir hale getirilmiştir (44). Teknik bu konuda gelişmeye devam ettikçe, daha küçük, non silindirik ve hücre sel yapılar (nöron gövdesi gibi) giriş yapmak için, tel elektrodlardan çok daha ince ve hassas bir yapıya ihtiyaç ortaya çıkmıştır. Bu amaçla cam mikro elektrodların (iletken elektrolit içeren cam mikro pipetler) kullanımı ortaya çıkmıştır. Tekniğin zaman içerisinde daha da geliştirilmesi sonucu yama kenetleme sistemi ilk defa Neher ve Sakmann tarafından 1976' da bugünkü haliyle ortaya çıkartılmıştır (45).

Bu teknik ile hücre membranının küçük bir parçasının veya tamamının iki tarafı arasındaki (yani hücre içi ile hücre dışı arasındaki) potansiyel farkı istenilen değerde tutularak, o alandaki iyon kanallarının yoğunlukları, iletkenlikleri ve çeşitli koşullardaki davranışları belirlenebilmektedir. Bu yöntemle ayrıca, sadece voltaj kapılı (voltaj değerlişlikleri ile açılan) değer aynı zamanda ligand kapılı (kendisine has nörotransmitter maddenin bağlanması ile açılan) iyon kanalları, zar kapasitansı (elektriksel geçirgenlik düzeyi), egzozitoz olayları ve yapay membranlara yerleştirilen iyon kanallarının akımları da araştırılabilmektedir (42,46).

Patch Clamp tekniğinde cam mikro pipetin hücreyle olan ilişkisine göre, tüm hücre (whole cell), hücre yüzeyinde (on cell), i taraf dışta (inside out) ve dış taraf dışta (outside out) şeklinde dört farklı uygulama şekli yer almaktadır. Son üç uygulama, tek bir iyon kanalının aktivitesini değerlendirebilirken, tüm hücre yönteminde hücredeki tüm iyon

kanallarının aktivitesi monitörize edilebilmektedir. Tüm hücre yama kenetleme (WCPC) en sık kullanılan yama kenetleme şeklidir. WCPC uygulamasında, cam mikro pipetin sitoplazmik membrana uyguladığı gigaohm değerinde bir negatif basınç (emme, giga mühür) ile pipetin içersine doğru çekilen membran parçası (patch, yama) yırtılarak pipetin içinin hücre içi solüsyonla dolması sağlanmaktadır. Banyo solüsyonunun olduğu bölmenin içerisinde tutulan hücrenin dış yüzeyine ise topraklı bir elektrodun temas etmesi sağlanarak, hücre membranının dış tarafının elektriksel potansiyelini sıfırda tutulabilmektedir. Hücre içindeki elektrod, bir amplifikatöre bağlıdır ve hücre içi potansiyelin kontrol edilebilmesini sağlamaktadır. Bu teknik hücre içi voltaj sabit tutulurken hücre içi akım değişikliklerinin ölçüldüğü voltaj kenetleme, ve tersinin yapılarak voltaj değişikliklerinin ölçüldüğü akım kenetleme olarak iki farklı şekilde kullanılabilmektedir (47).



Şekil 3. Patch Clamp düzeneğinin şematik çizimi

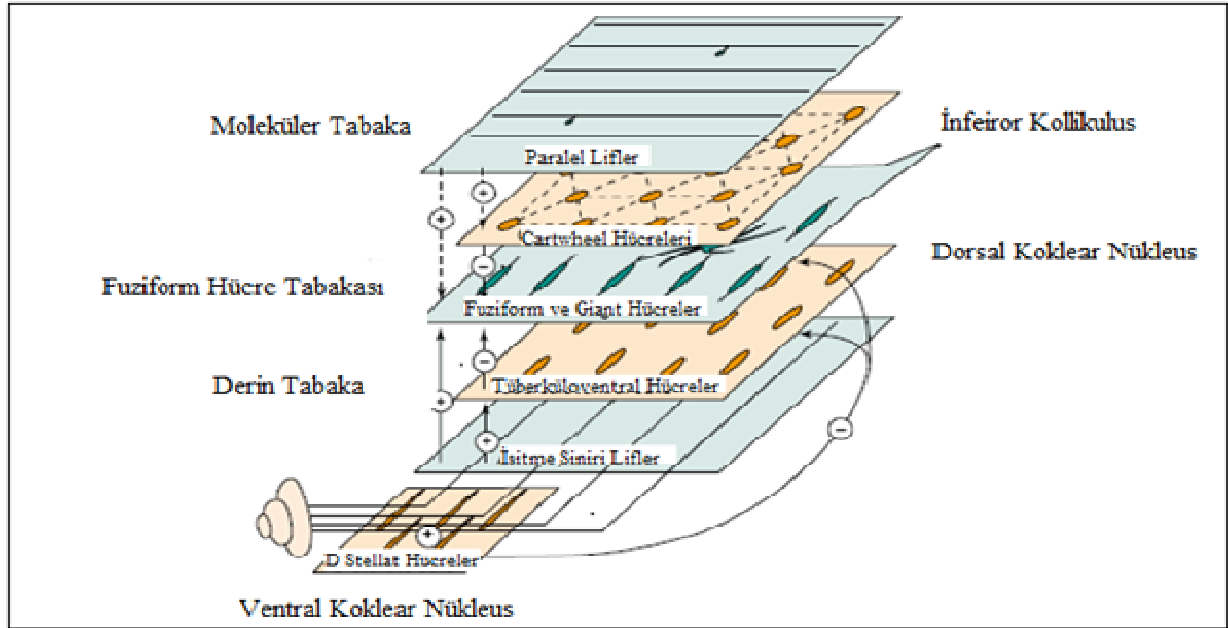
Dorsal Koklear Nükleus'un Yapısı ve Tinnitus İle İlişkisi

Dorsal Koklear Nükleus'un Yapısı

Dorsal Koklear Nükleus (DKN) üç tabakalı bir yapıdan oluşmaktadır. En üstteki süperfisiyal (moleküler) tabaka hücreden fakir bir yapılanma gösterir. Ortada intermedier ya da diğer adıyla fuziform hücre tabakası bulunur. En altta ise derin ya da diğer adıyla polimorfik tabaka yer almaktadır (48).

Bu çekirdek içerisinde yer alan hücreler, Fuziform (Piramidal), Giant, Tüberkuloventral (Vertikal), Cartwheel (Purkinje), Granül, Golgi, Stellat, Unipolar, Brush ve Chestnut hücreleri ile internöronlardır (49).

Moleküler tabakada Cartwheel, Stellat ve Granül hücreleri yer almaktadır. Fuziform tabakada hücre gövdeleri yoğun olarak yerleşmiştir ve bu katmanda Fuziform, Granül ve apikallerde Cartwheel hücreleri bulunmaktadır. Derin tabakada ise farklı çeşitlerdeki Stellat hücreler ile Giant ve Granül hücreler yer almaktadır. Tonotopik organizasyona göre, yüksek frekanslar dorsalde, alçak frekanslar ventralde temsil edilmektedir (48).



Şekil 4. Dorsal koklear nükleusun çok katlı yapısı ve ventral koklear nükleus, inferior kollikulus, işitme siniri ile olan bağlantılarının şematik çizimi

Bu hücreler birbirlerinden morfolojik yapıları, ateşleme paternleri ve nörotransmitter seçimleri açısından ayrılmaktadır (48).

Hücre tipi	İnput direnci (R)	İstirahat membran potansiyeli (V_{rest})
Tüberkuloventral	85 ± 10 MW	-60 ± 7 mV
Giant	65 ± 34 MW	-54 ± 4 mV
Golgi	105 MW	$-62 \pm$ mV
Fusiform	86 ± 37 MW	-57 ± 5 mV
Cartwheel	140 ± 61 MW	-62 ± 6 mV

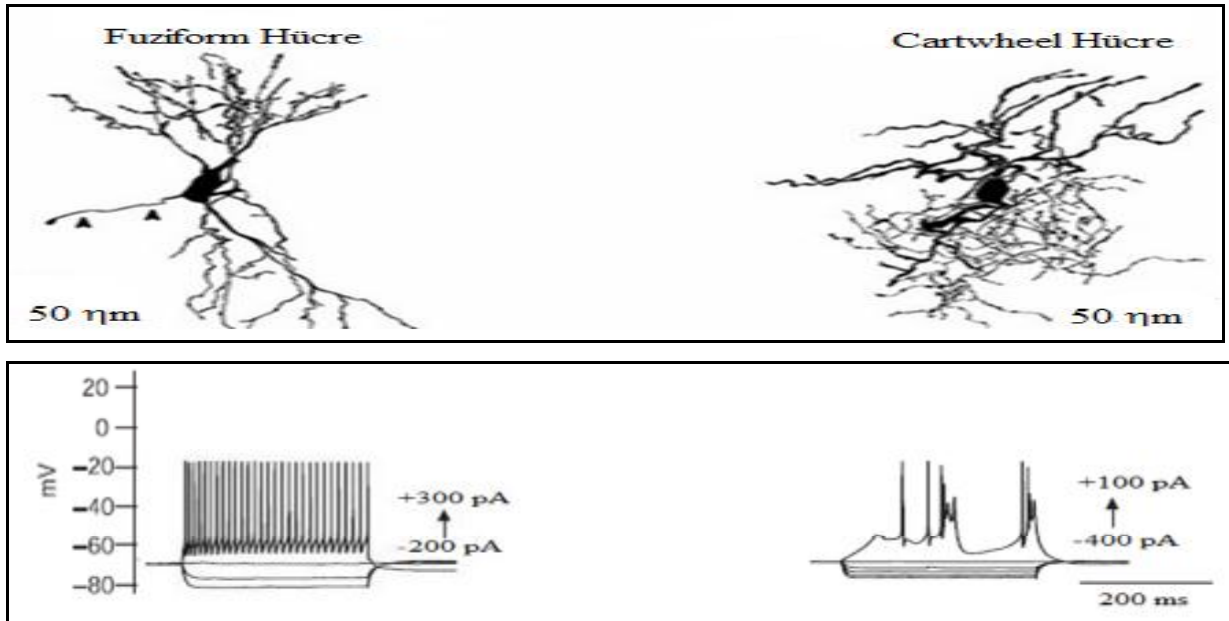
Tablo 1. Dorsal koklear nükleusta bulunan bazı hücrelerin input dirençlerinin megaohm, istirahat membran potansiyellerinin ise milivolt cinsinden gösterilmesi

İnferior kollikuluse projekte olan fuziform hücrelerin, sesin vertikal planda lokalizasyonu ve sese oryantasyondan sorumlu oldukları varsayılmaktadır. Aslında bu hücrelerin görevinin işitmenin spektral analizi olduğunu ileri sürülmektedir (50). Aurikula, gelen sesi distorsiyona uğratarak spektrasında keskin çentikler oluşturmaktadır. Bu çentikler sistematik bir şekilde ses kaynaklarının vertikal yüksekliklerinin bir fonksiyonuna bağlı olarak meydana gelmektedir. Fuziform hücreler bu spektral çentiklere duyarlıdır (51). Kedilerde 1991’ de Sutherland’ ın yaptığı deneyde, Fuziform hücrelerin aksonlarının bulunduğu dorsal akustik stria lezyonlarında, kedilerin ses kaynaklarına oryantasyonunun bozulduğu gösterildi (52).

Fuziform hücreler, voltaj ve akıma bağlı iletkenliklerinin çok değişken olması sayesinde, sinaptik akımlara bağlı voltaj değişikliklerinden kolay etkilenebilmekte ve inputlarından çok daha farklı bir ateşleme paterni geliştirebilmektedirler. Uygun koşullar altında depolarizan akım uyarılarıyla, fuziform hücrelerin cevaplarının arttırılabileceği gösterilmiştir. Bu hücrelerde, biri inaktive edilebilen (tetradotoxin), diğeri ise büyük ihtimalle inaktive edilemeyen iki adet voltaja duyarlı sodyum kanalı, bir adet voltaja duyarlı kalsiyum kanalı, voltaja duyarlı bir potasyum kanalı ve bir de kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı bulunmaktadır. Bu hücrelerde spontan ve sıkça görülen inhibitör post-sinaptik potansiyellere (İPSP) ve zaman zaman da spontan EPSP’lere de rastlanmaktadır (53).

Cartwheel hücreler glisinerjik ve gabaerjiktir. DKN'deki diğer hücrelerden farklı olarak, rejeneratif kalsiyum akımıyla oluşan yavaş bir aksiyon potansiyeli ve bunun tetiklediği içeri doğru olan sodyum akımlarıyla oluşan hızlı aksiyon potansiyellerinden oluşan bileşik aksiyon potansiyelleri üretmektedirler. Bu hücrelerin uyarıya verdiği cevap, bu aksiyon potansiyellerinin değişik varyasyonlarından oluşmaktadır (48).

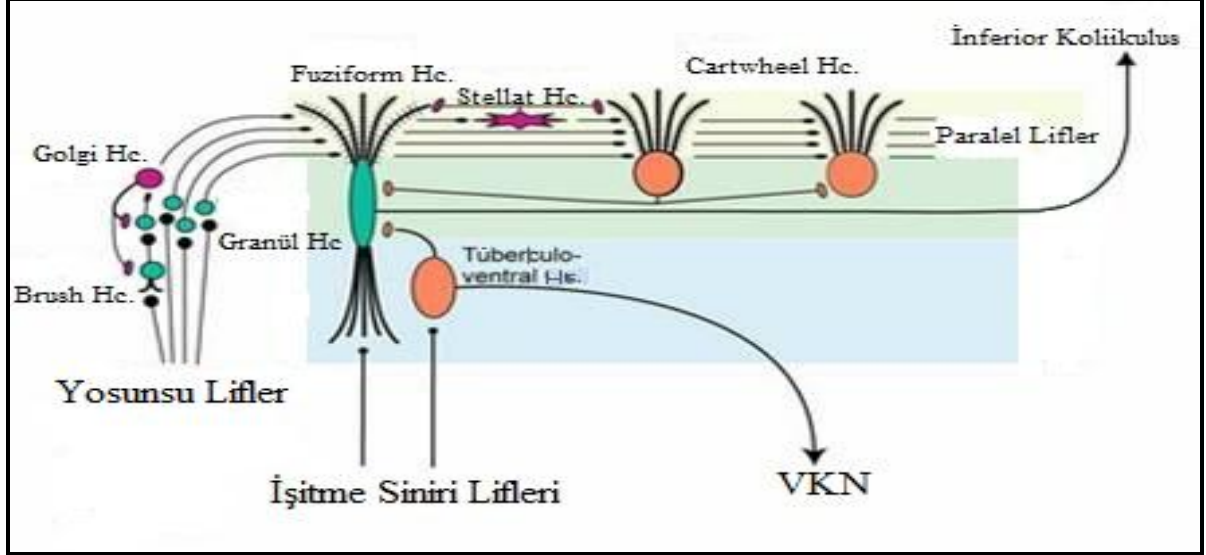
Fuziform, Cartwheel ve Giant hücrelerde görülen spontan postsinaptik potansiyeller genelde IPSP niteliğindedir. Fakat Cartwheel hücreleri için glisinerjik ve gabaerjik inputlar aynı zamanda eksitator de olabilir. Bunun nedeni bu hücrelerin membran potansiyellerinin glisinerjik ve gabaerjik inputların oluşturduğu potansiyel değişikliğinden daha negatif olmasıdır (54).



Şekil 5. Fuziform ve Cartwheel hücrelerinin elektron mikroskopisindeki görünümü ve altında sırasıyla bu hücrelerin 200 milisaniye boyunca kaydedilen elektrofizyolojik ateşleme paternlerinin akım ve voltaj değişimi şeklinde grafiksel çizimi (49 ve 70 numaralı kaynaklardan alınmıştır.)

DKN' nin iki grup eksitator input kaynağı vardır. Bunlardan biri olan Granül hücrelerin aksonları paralel lifler; fuziform, süperfisiyal stellat ve cartwheel hücreleri ile

bağlantı kurmaktadır. Diğerleri ise dorsal kolumndan gelen yosunsu liflerdir (mossy fiber) ki, granül, golgi ve süperfisiyal stellat hücrelerle sinaps yaparlar. Cartwheel ve tüberkuloventral hücreler ise inhibitör görevdedir (50).



Şekil 6. Dorsal koklear nükleusun hücresel düzeyde bağlantılarının şematik çizimi

Fuziform ve giant hücreler birbirine bağlantıları açısından çok benzerken elektriksel yanıtları farklıdır. Her ikisi de DKN dışına output vermekte ve işitme sinirinden eksitator uyarı almakta, cartwheel ve büyük olasılıkla tüberkuloventral hücreler tarafından inhibe edilmektedirler. Aynı zamanda her ikisi de moleküler ve derin tabaka arasında bağlantı kurmaktan sorumludurlar. Derin tabakada giant hücrelerin dendritleri Fuziform hücrelerinkinden daha geniş bir sahada yayılır ve miyelinsiz tip iki işitme sinirinden eksitator input alır. Moleküler tabakada ise durum tersidir, dolayısıyla paralel liflerle fuziform hücrelerin daha çok bağlantısı bulunmaktadır. Granül hücrelerden kaynaklandığı düşünülen spontan ve uzun süren EPSP'ler bu nedenle genelde fuziform hücrelerden kaydedilmektedir (51).

Paralel lifler fuziform hücrelerin apikal dendritleri ve cartwheel hücreler ile direkt bağlantı kurar. Paralel lifler myelin içermezler. Fuziform hücreler aynı zamanda derin tabakada sonlanan myelinli tip bir işitme liflerinden doğrudan eksitator ve tüberkuloventral hücreler aracılığıyla da dolaylı olarak inhibitör uyarı alırlar (51).

Akustik sinir uyarıldığında DKN’de 1 milisaniye latansla bir EPSP oluştuğu gözlenmektedir. Erken ve hızlı EPSP’yi süperimpose olan yavaş bir depolarizasyon (yavaş yükselen EPSP) izler. Daha sonra erken ve geç IPSP’ler görülmeye başlar. Erken IPSP’lerden tüberkuloventral hücreler, hızlı EPSP’den paralel lifler, yavaş EPSP’den genellikle fuziform hücreler sorumlu tutulmaktadır. Fuziform hücrelerin asıl önemi ise eksitasyon ve inhibisyon arasında yukarıda bahsedildiği şekilde bir denge kurmalarıdır (51).

Tinnitus Patofizyolojisi, Dorsal Koklear Nükleus ve Sinaptik Plastisite

Tinnitusta patofizyolojik süreç ile ilgili belirsizlikler ilk olarak 1948’de Gold tarafından tinnitus yakınması olan sağlıklı normal koklealarda varlığı gösterilen ve tinnitus olduğu belirtilen spontan oto akustik emisyonlar (SOAE) ile gündeme getirilmiştir (55). Ancak SOAE’ler baskılandığında tinnitusun devam ettiğinin ve tinnitusu olmayan sağlam koklealarda da SOAE varlığını gösterilmiş olması sonucu bu düşünce zamanla kabul görmemeye başlamıştır (14).

Jastreboff ise dış tüy hücresi (DTH) ve iç tüy hücresi (İTH) arasındaki uyumsuzluğun tinnitusa neden olabileceğini öne sürmüştür. Bu teoriye göre, Corti organının parsiyel hasarında İTH’lerin sağlam kalıp, DTH’lerin etkilendiği durumlarda, tektoriyal membran ve bazal membran arasındaki bağlantı bozularak, tektoriyal membran İTH’lerin siliasına çarpmaya başlayarak bu hücreleri depolarize etmektedir. İşitsel afferentlerdeki bu tarz bir modifikasyonun tinnitus algısına neden olduğu öne sürülmüştür. Tinnitus yakınması ve yüksek frekanslarda işitme azlığı olan bireylerde, tinnitus frekanslarıyla işitme kaybının başladığı frekansın çakışması bu teoriyi destekler nitelikte olsa da bu şartı salamayan olgulara da literatürde sıklıkla rastlanmaktadır (6, 14, 56).

Koklear nörokimyasal değişmelerin tinnitus nedeni olabileceği yönünde görüşler biyokimyasal model olarak anılmaktadır. Bu teori, tinnitus yakınması olan kişilerin; stres, anksiyete ve ajitasyona meyilli olduklarını gösteren klinik gözlemlere dayanmaktadır. Buna göre, stresle bağlantılı endojen dinorfinler, sodyum salisilatın spontan nöral aktiviteyi artırıcı etkisine benzer şekilde koklea içersindeki glutamatın uyarıcı fonksiyonunu güçlendirmektedir (14).

İşitsel sistem dışı nedenlerle tinnitus oluşabileceğine yönelik görüşler de literatürde yerini bulmuştur. Jastreboff tarafından 1996'da yayınlanan nörofizyolojik model, işitmesi tamamen normal olan kişilerde de tinnitusun görülebileceği, bunun yanı sıra zamanla alışma sonucu tinnitusun yadsınabileceği veya olumsuz duygusal durumlarda tinnitusun güçlenebileceği gözlemlerine dayanarak, işitsel algı, emosyonel ve reaktif sistemlerin tinnitus oluşumundan sorumlu olabileceği hipotezine dayanmaktadır. Modelin şematik çiziminde işitsel ve diğer kortikal alanlar, işitsel bilinçaltı merkezler, limbik sistem, periferik işitme yolları, otonom sinir sistemi ve ortaya çıkan reaksiyonlar arasında çok yönlü ve geri beslemeli bağlantılar resmedilmektedir (57).

Evans ve arkadaşları tarafından geliştirilen teori ise tinnitusta esas patofizyolojik sürecin koklear sinirdeki spontan aşırı aktivite olduğunu öne sürmektedir. Daha önce Kiang tarafından kanamisin ile kediler üzerinde yapılan kronik koklea hasarının spontan aktiviteyi azalttığı gösterilmiş olsa da, Evans kedilerde, insanda tinnitus oluşturan doza eşdeğer kan salisilat dozlarının spontan aktiviteyi artırıcı nitelikte olduğunu kanıtlamıştır. Tyler, bu durumu metodolojik bir farklılık olarak açıklayarak, koklear sinirin tek bir ünitesinden yapılan kayıtların hiperaktivitenin varlığını gösteremeyebileceğinin altını çizmiş ancak tinnitus patogenezinde koklear sinirde hiperaktivite olduğuna katılmıştır (58-60).

Tüm bu tartışmalar sürerken, koklear sinirin üstündeki seviyelerde gözlenen aşırı aktivitenin de tinnitus nedeni olabileceği görüşleri ortaya atılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda, yoğun sese (akustik travma) maruz kalan hemstırlarda spontan dorsal koklear nükleus (DKN) aktivitesinde artış, aynı durumdaki çinçilyalarda ise hem DKN hem de inferior kollikulüste hiperaktivite kaydedilmiştir. Farklı türler üzerinde farklı araştırmacılar tarafından devam ettirilen çalışmalar yoğun ses maruziyetinin DKN ve inferior kollikulus başta olmak üzere afferent işitsel sistemde spontan hiperaktiviteye neden olabileceği yönünde sonuçlanmıştır (13,64).

Bu deney ve gözlemlerden yola çıkan Eggermont, işitme liflerinin bir kısmında oluşacak senkronize aktivitenin tinnitus algısını doğurabileceğini öne sürmüştür (62). Eggermont ayrıca, deney hayvanlarında tinnitus modeli olarak aşırı gürültü, salisilat, kinin, sisplatin ve aminoglikozit antibiyotiklerin uygulanmasından sonra işitme sinir liflerinde spontan ateşleme hızının azaldığı veya bazen de aynı kaldığını, ancak santral işitsel sistemde periferik liflerin aksine spontan aktivitenin arttığını gözlemlemiştir (13,64). Bu santral yapılar,

DKN, inferior kollikulüsün eksternal çekirdeği, primer ve sekonder işitme korteksleri olarak belirlenmiştir. Primer işitme korteksinden, gürültü maruziyetinden iki saat sonra alınan kayıtlarda spontan ateşleme hızının öncesine göre belirgin arttığı gösterilirken, Kaltenbach tarafından benzer yöntemle yapılan bir çalışmada DKN'nin gürültü maruziyetinden iki- üç gün sonra hem spontan ateşleme hızında hem sesle uyarılan aktivitesinde artış ortaya konulmuş ve bu değişikliklerin bir çeşit sinaptik plastisite olduğu öne sürülmüştür (13,61,64,69).

İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, henüz gürültü maruziyetinin DKN hiperaktivitesine yol açtığını göstermek için yeterli kanıt ulaşılamamıştır ancak, DKN'nin insanda tinnitus modülasyonunda görevli olduğunu öne süren çalışmalara literatürde rastlanmaktadır. Soussi ve Otto'nun 1994'te yaptıkları araştırmalarında, DKN yüzeyine doğrudan uygulanan elektrik uyarısının tinnitus şiddetini yedi hastadan altısında azalttığı gösterilmiş ve bu durum sinaptik plastisite ile açıklanmıştır (65).

Tinnitusta Dorsal Koklear Nükleus aracılı Sinaptik Plastisite

Tinnitusta plastisite, mekanizmaları tetikleyen olayların farklılığına göre dört gruba ayrılmaktadır. Bu mekanizmalar kısaca şöyledir (9):

1) Hasarla uyarılan plastisite:

Bir patolojik durum nedeniyle iç kulaktan gelen normal inputun anatomik veya fonksiyonel olarak azalması veya kaybolması ile ortaya çıkan tinnitustur. İşitme sinirinin anatomik olarak hasarlanması veya aşırı uyarılması sonucu tahrip olması (eksitotoksisite) ve dış tüy hücresi (DTH) hasarı bu durumun nedeni olabilmektedir.

2) Temporal plastisite:

Dış koşullarda bir değişiklik olmaksızın, tinnitusun şiddetinde, süresinde veya pik yaptığı frekansta meydana gelen değişiklikleri tanımlamaktadır.

3) Uyarana bağılı plastisite:

Akustik stimülasyon nedeniyle oluşan, ancak uyarı kaybolduktan sonra ortaya çıkan değişiklikleri ifade etmektedir. Alışma ve rezidüel inhibisyon bu teori ile açıklanmaktadır.

4) Modülatör plastisite:

İşitsel olmayan merkezlerin aktivasyonu ile tinnitus algısında oluşan değişiklikleri içermektedir. Somatik tinnitus olarak adlandırılan durum bu grup içerisine alınmaktadır.

Bu dört grup plastisite mekanizması içerisinde DKN'nin rolü hasarla indüklenen plastisitede net değilse de, diğer üçü için büyük önem arz etmektedir. İşitme kaybı, DTH veya İTH hasarı ya da akustik sinir zedelenmesinde DKN hiperaktivitesi görülmeksizin de tinnitus olabilirken sadece işitme sinirinin aşırı uyarılması sonucu haraplanması durumlarında DKN'de LTP gibi aktivite bağımlı bir hiperaktivite olabileceği iddia edilmektedir. Öte yandan temporal plastisitede, işitme korteksi ve retiküler formasyondan aldığı inputlar aracılığıyla DKN'nin dikkat ve uykululuk durumlarında farklılaşan tinnitus algısına yol açabileceği, uyarana bağılı plastisitede görülen rezidüel inhibisyon veya alışmanın da aslında DKN'de meydana gelen bir çeşit STD olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Modülatör plastisitenin ise DKN'deki fuziform hücrelerin ipsilateral somatosensöriyal yapılarla olan bağlantıları sonucu ortaya çıktığı ifade edilmektedir (9).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deney Hayvanları ve Gruplar

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından üretilen, yetiştirilen ve bakımları sağlanan 30 adet postnatal 16 günlük BALB/c fare kullanıldı. Deneyler, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi ve Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Ocak – Mart 2011 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Deneylerle ilgili tüm işlemler için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 09.12.2010 tarih ve 118 sayılı kararla etik kurul onayı alındı.

Fareler deney haricinde annelerinin yanında, her bir aile, yavru sayısına uygun ölçülerde bir kafeste olacak şekilde, $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklıkta, 12 saat gündüz 12 saat gece periyodunda suni ışıklandırılan laboratuvar ortamında barındırıldı. Deney hayvanlarının beslenmesi, deney süresi dışında anneleri tarafından emzirilmeleriyle gerçekleşti.

Genel durumu kötü (sakat, yaralı, az hareketli) olan, davranış deneyleri esnasında epileptik nöbet geçiren, deneyler tamamlanmadan ölen, işitme eşik düzeyleri açısından bakıldığında ise akustik travma öncesinde ve kontrol grubunda 90 dB SPL saf ses, akustik travma sonrasında da 100 dB SPL saf ses uyarısına beş saniye içerisinde startle refleks yanıtı vermeyen hayvanlar deneyden çıkarıldı.

Deney hayvanları 15'i kontrol, 15'i akustik travma olmak üzere iki gruba ayrıldı. Postnatal 16. günde davranış deneyleri uygulanan fareler postnatal 17. günde giyotin ile kurban edildi; izole edilen DKN'leri WCPC ile elektro fizyolojik incelemeye alındı.

Davranış Deneyleri

Startle Refleks Süresi ve Boşluğu Algılama Süresi Ölçümleri

Tüm davranış deneyleri, 75x90x60 cm boyutlarında kapaklı bir kutu şeklindeki 50 dB ve daha düşük ses şiddetini absorbe etmek üzere dizayn edilmiş bir sessiz kabin içersine yerleştirilen, 30x30x40 cm boyutlarındaki Startle Kafesi içerisinde yapıldı. Sessiz kabin için dış ölçüleri yukarıda verilen kutu 18 mm kalınlığındaki suntalam ile hazırlandı. Suntalam içersine boşluk kalmayacak şekilde 2 cm kalınlığında 10 dansite yoğunluğunda beyaz strafor döşendi. Bunun iç yüzüne de 3 cm kalınlığında 40 kg/m³ yoğunluklu taş yünü ve onun iç tarafına da 3 mm kalınlığında esnek kontraplak döşenerek, yüzeyler arasında boşluk kalmayacak ve kapak tam olarak kapanacak şekilde sabitlendi. Kabinin tavanına yerleştirilen led aydınlatma ile kabin içinin aydınlatılması sağlandı.

Dışarıdan kontrollu bir bilgisayar programı aracılığıyla startle kafesinin hemen üzerine yerden yüksekliği kafesin kendi yüksekliği kadar (30 cm) olacak şekilde yerleştirilen piezoelektrik 15 cm çaplı hoparlör ile 6000 Hz 90 dB, 100 dB ve 120 dB SPL saf ses verilmesi sağlandı. Sesin hoparlörden çıkışı kalibre edildi. Ses şiddeti deney hayvanlarının literatürde o yaş grubu için daha önce tanımlanmış işitme eşiği üzerine oluşturulması hedeflenen 25 dB’lik tahmini tinnitus şiddeti eklenerek belirlendi.

Deneyler sırasında fareler aynı gözlemci tarafından, sessiz kabin içersinde tabanda bulunan, Startle Kafesini tam olarak görüntüleyen ve sessiz kabin dışında bir bilgisayara bağlanan HD kamera ile sürekli monitörize edildi. Tüm veriler kayıt altına alındı.

Kullanılan sessiz kabin, startle kafesi ve HD kamera İnter Medkom Elektronik San ve Tic. (İzmir, Türkiye) tarafından sağlandı. Kullanılan seslerin oluşturulması ve piezoelektrik hoparlörlerin temini ile akustik sistemin kalibrasyonu Dokuz Eylül Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji Ünitesi tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 7. Startle kafesi ve sessiz kabin

Her fare davranış deneylerine tek başına alındı. Deneyler günde üç defa her biri 15 dakikalık periyotlar halinde saat 09:00 ile 13:00 arasında uygulandı. Deneyler arasında en az 60 dakikalık aralar verilip bu esnada yavru hayvanlar annelerinin yanına bırakılarak dinlenme ve beslenmeleri sağlandı.

İlk olarak postnatal 16. günde deneye alınan farelere her 15 dakikalık testte minimum 15, maksimum 60 saniye süreli rastgele dört sefer 90 dB SPL 6 kHz saf ses verilerek SRS'leri kaydedildi.

Her 15 dakikalık deneyde rastgele dört sefer verilen sesli uyarı dışında kalan sessizliğin olduğu süre boşluk olarak isimlendirildi. Farelerin boşluğu fark ettikleri ana kadar geçen süre, BAS olarak belirlendi. Farelere, boşluğu fark etmeleri için üst sınır olarak 60 saniyelik süre verilerek, bu süre içerisinde boşluğun algılandığını belirtir bir refleks alınamadıysa BAS değeri istatistiksel hesaplamaların yapılabilmesi için, “60 saniye” olarak kayda geçirildi. SRS ve BAS değerlerinin ölçümü kronometre ile yapıldı. Her deneyde dört adet SRS ve BAS elde edilerek, 3 periyot sonunda bir fareden 12’şer sonuç alındı. İstatistiksel analizlerde bu 12 sonucun aritmetik ortalamaları kullanıldı.

Akustik Travma Prosedürü

Akustik travma için yine sessiz kabin ve startle kafesi içinde akustik travma grubuna, 16. günde SRS ve BAS ölçümleri yapılmış her fareye saat 19:00 ile 24:00 arasında 6 kHz 120 dB SPL saf ses beş saat süreyle verildi. Akustik travma sonrasında deney hayvanları tekrar annelerinin yanına bırakıldı.

Elektrofizyolojik Deneyler

Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

Postnatal 17. günde fareler dekapite edilerek her iki DKN'lerinden koronal dilimler hazırlandı. Dekapitasyon sonrası baş serum fizyolojik içerisine konuldu. Beyin kafatasından çıkartıldıktan sonra midkolliküler seviyeden koronal olarak kesilerek kaudal kısmın rostral yüzeyi teflon blok üzerine sinoakrilat yapıştırıcı (Superglue) ile sabitlendi. Daha sonra DKN, her bir dilim 180 µm kalınlıkta olacak şekilde salınlımlı doku dilimleyicisi (Frederick Haer, Newbrunswick, ME, USA) ile kesildi ve kesitler dinlenmeleri için taze hazırlanıp oksijen ile doyurulmuş 33 santigrat derecede eksternal solüsyon içine bırakıldı. Kayıtlar için kesitler, oksijen ile doyurulmuş eksternal solüsyonun 5 ml/dk perfüze edilmekte olduğu başka bir bölme içerisine alındı.

Fuziform Hücrelerin Tanınması

Kesitlerdeki hücreler x63 su immersiyon objektifinde diferansiyel interferans optik (Axioscope FS, Zeiss) aracılığıyla görüntülenerek, morfolojik özellikleri vasıtasıyla tanındı.

Solüsyonlar

Eksternal solüsyon, pH'sı 7.4 ve 25-31 santigrat derecede olacak şekilde, mM olarak 130 NaCl, 3 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 20 NaHCO₃, 3 HEPES (4-2-hidroksietil-1-piperazinethansuffonik asit), 10 glikoz, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile doymuş su ile hazırlandı. Bu solüsyon, kesitlerin hazırlanması ve inkübasyonu için kullanıldı.

Current Clamp ölçümlerinde kullanılan eksternal solüsyon, pH 7.4'te ve mM olarak 138 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glikoz; Voltage Clamp ölçümlerinde kullanılan eksternal solüsyon ise pH 7.4'te ve mM olarak 135 tetraetilamonyum (TEA) klorid, 10 CsCl, 10 4-aminopiridin (4-AP), 5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glikoz içerecek şekilde hazırlandı.

Ölçüm sırasındaki hataları minamalize etmek için, düşük rezistanslı (3–4 M Ω) cam mikro pipetler kullanıldı. Pipetler dış çapı 1.2 mm olan borosilikat camdan çekil ve içleri mM olarak 110 potasyum glukonat, 9 HEPES, 9 EGTA, 4.5 MgCl₂, 14 fofsokreatinin (Tris salt), 4 ATP (Na-salt) ve 0.3 GTP (Tris salt) içeren, pH' sı KOH ile 7.4 olan solüsyon ile dolduruldu. Kullanılan tüm kimyasallar Sigma'dan (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) elde edildi.

Tüm Hücre Yama Kenetleme Kayıtları ve LTP Protokolü

Current ve Voltage Clamp kayıtları Axopatch - 200A Amplifikatör kullanılarak uygulanan standart WCPC yöntemiyle elde edildi. Veriler, 5-10 kHz alçak frekans filtreden geçirildi ve 10-40 kHz' de örneklenerek Digidata 1320 Ara Yüzey (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) ile sayısallaştırıldı. Bu veriler hem bir grafik kaydedici program hem de IBM kişisel bilgisayara aktarıldı.

Stimulus üretimi, verilerin kaydı ve sayısallaştırılmış verilerin deney sonrası analizi pClamp Yazılımı (versiyon 8.03; Axon Instruments) ile yapıldı.

WCPC için yüksek rezistanslı mühürleme (91 G Ω) kullanıldı. Tüm kayıtlardaki -12 mV'luk kavşak potansiyeli telafi edildi. Her 30 saniyede bir kayıt alındı. Kayıtlarda EPSA değerleri kullanıldı.

LTP Protokolü için Fuziform Hücre -80 mV'tan -30 mV'a depolarize edilirken, moleküler tabakaya 20 saniye interval ile iki defa 100 Hz frekanslı bir saniye süreli uyarı verildi. EPSA amplitüdleri -80 mV'ta 0,1 Hz'te monitörize edildi.

Bazal EPSA kaydı her fuziform hücreden ilk beş dakikada, her 30 saniyede bir alınan 10 kayıttan oluştu. LTP protokolü yüksek frekanslı stimülasyondan (YFS) sonra ise hücrelerden sağlıklı ve istikrarlı olarak 20 dakika boyunca daha kayıt alınabildi. Bazal değerlerin ortalaması ile YFS sonrası 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. dakikalar arasındaki ortalama EPSC değerleri hesaplanarak tüm kayıt süresince bir hücreden elde edilen EPSC trasesi grafiksel olarak belirlendi. Bu işlem, hücrenin sağlıklı bir şekilde LTP oluşturduğunu veya hücrede LTP gözlenmediğini ancak EPSC kayıtlarının alınması ve hücrenin elektriksel özelliklerinde bir bozulma olmadığını kanıtlamak amacıyla yapıldı. Tutarlılığı göstermek amacıyla Bu değerler arasında istatistiksel analiz de yapıldı ve tutarsızlık olmadığı saptandı

15,5-20. dakikalardaki ortalama EPSC değerinde bazal değere göre %10 ve üzerinde artış saptanması LTP gelişimi lehine değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Veriler aritmetik ortalama +/- Standart Sapma şeklinde ifade edildi. " $p < 0.05$ " anlamlı olarak kabul edildi. Akustik travma ve kontrol grubu BAS sonuçlarının karşılaştırması Mann Whitney U, akustik travma grubunda travma öncesi ve sonrası BAS değerlerinin kıyaslanması Wilcoxon eşleştirilmiş örneklem testi, kontrol ve akustik travma gruplarında LTP'nin oluşumunun karşılaştırılması ise Pearson Ki kare Testleri ile yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 16.0 istatistik programı yardımıyla gerçekleştirildi.

BULGULAR

Kontrol (K) ve akustik travma (AT) grubunda travma öncesi ve sonrası 12 SRS ve 12 BAS değerinin ortalamaları aşağıdaki tabloda görülmektedir. Her iki grupta SRS değeri minimum bir, maksimum dört saniye olarak bulundu. K grubunda en küçük ve en büyük BAS değerleri sırasıyla 3 ve 23 sn, AT grubunda akustik travma öncesi minimum BAS değeri 2, maksimum BAS değeri 21 saniye olarak saptandı. AT grubunda akustik travma sonrasında ise en küçük BAS değeri 11, en büyük BAS değeri ise 60 saniye olarak bulundu.

Deney Hayvanları	Akustik Travma Öncesi SRS (sn)	Akustik Travma Sonrası SRS (sn)	Akustik Travma Öncesi BAS (sn)	Akustik Travma Sonrası BAS (sn)
AT 1	1,67	1,67	8,5	41
AT 2	1,67	1,42	11,67	44,75
AT 3	1,58	1,42	7,75	46,42
AT 4	1,83	1,33	9,17	34,83
AT 5	1,67	1,92	12,5	30,5
AT 6	1,33	1,33	8,25	35,83
AT 7	1,58	1,58	11,42	31,08
AT 8	1,33	1,75	10,83	38
AT 9	1,5	1,67	11,08	30,67
AT 10	1,5	1,92	9,25	33,58
AT 11	1,42	1,08	10,58	39,33
AT 12	1,25	1,33	9,08	42
AT 13	1,5	1,25	7,33	38,5
AT 14	1,17	1,25	7,33	34,67
AT 15	1,83	1,75	9	32,25
K 1	2,17	,	9	,
K 2	1,83	,	10,92	,
K 3	2,17	,	8,58	,
K 4	2,17	,	9,17	,
K 5	1,83	,	7,92	,
K 6	2	,	7	,
K 7	2,08	,	8,75	,
K 8	1,92	,	10,67	,
K 9	2	,	9,92	,
K 10	2,25	,	8,33	,
K 11	2,25	,	11,42	,
K 12	1,5	,	11,67	,
K 13	1,5	,	10,08	,
K 14	1,33	,	15,5	,
K 15	1,83	,	17,83	,

Tablo 2. Kontrol grubunda ve akustik travma grubunda akustik travma öncesi ve sonrasında “startle refleks süresi” ve “boşluğu algılama süresi” değerleri

Grupların travma öncesi bazal BAS değerleri (90 dB SPL saf ses düzeyinde) Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, anlamlı farklılık saptanmadı. Bu değerler aşağıda Tablo 3’te görülmektedir.

Parametre	Gruplar	Ölçülen Değer (sn)	Standart Sapma	P
Ortalama SRS (sn)	Akustik Travma	1,5222	0,19787	
	Kontrol	1,9222	0,28776	
Ortalama BAS (sn)	Akustik Travma	9,5833	1,65472	0,604
	Kontrol	10,4500	2,87897	

Tablo 3. Akustik travma ve kontrol grubunda “boşluğu algılama süresi” ve “startle refleks süresi” değerlerinin ortalaması ve istatistiksel analizi

AT grubunda travma öncesi (90 dB SPL saf ses düzeyinde) ve sonrası (100 dB SPL saf ses düzeyinde) BAS değerleri Wilcoxon eşleştirilmiş örneklem testi ile karşılaştırıldığında, akustik travma sonrası değerlerde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Bu karşılaştırma, aşağıda Tablo 4’te belirtilmiştir.

Parametre	Gruplar	Ölçülen Değer (sn)	Standart Sapma	P
Ortalama SRS (sn)	AT Öncesi	1,5222	0,19787	
	AT Sonrası	1,5111	0,25756	
Ortalama BAS (sn)	AT Öncesi	9,5833	1,65472	0,001*
	AT Sonrası	36,8944	5,08055	

Tablo 4. Akustik travma grubunda akustik travma öncesi ve sonrasında “boşluğu algılama süresi” ve “startle refleks süresi” değerlerinin ortalaması ve istatistiksel analizi

Her iki grubun YFS öncesindeki (ilk beş dakika) ortalama EPSA değerleri ile sonrasında 5,5-10. dk, 10,5-15. dk ve 15,5-20. dakikalardaki EPSA değerlerinin ortalaması aşağıda Tablo 5’te özetlenmiştir.

Deney Hayvanları	YFS Öncesi (0,5-5. dk) Ortalama EPSA (pA)	YFS Sonrası (5,5-10. dk) Ortalama EPSA (pA)	YFS Sonrası (10,5-15. dk) Ortalama EPSA (pA)	YFS Sonrası (15,5-20. dk) Ortalama EPSA (pA)
AT 1	164	225	205	192
AT 2	115	157	145	125
AT 3	90	205	169	184
AT 4	153	213	201	221
AT 5	95	165	163	144
AT 6	97	191	167	150
AT 7	292	382	378	386
AT 8	272	352	400	306
AT 9	58	89	89	59
AT 10	93	130	142	138
AT 11	114	252	260	236
AT 12	121	168	150	157
AT 13	116	172	176	156
AT 14	83	135	137	128
AT 15	122	175	183	179
K 1	307	314	290	299
K 2	236	250	238	218
K 3	130	111	116	97
K 4	291	347	332	359
K 5	172	208	215	213
K 6	58	103	79	62
K 7	162	186	164	116
K 8	127	111	116	98
K 9	207	262	225	209
K 10	94	96	90	87
K 11	86	110	88	92
K 12	138	162	152	151
K 13	77	82	73	64
K 14	187	176	175	172
K 15	69	77	74	73

Tablo 5. Yüksek frekans stimülasyon öncesi ve sonrasındaki 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. dakikalar arasındaki ortalama “eksitör post-sinaptik akım” değerleri

Ortalama EPSA değerlerinde YFS öncesine göre, 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. Dakikalardaki artış miktarları yüzde cinsinden aşağıda Tablo 6’da görülmektedir.

Deney Hayvanları	5,5-10. dakikadaki % EPSPA artışı	10,5-15. dakikadaki % EPSPA artışı	15,5-20. dakikadaki % EPSPA artışı
AT 1	37	25	17
AT 2	36	26	9
AT 3	128	88	104
AT 4	39	31	44
AT 5	73	72	51
AT 6	97	72	54
AT 7	31	29	32
AT 8	30	47	13
AT 9	53	52	2
AT 10	40	52	48
AT 11	121	128	107
AT 12	38	24	29
AT 13	48	52	35
AT 14	62	65	54
AT 15	44	50	47
K 1	2	-6	-3
K 2	6	1	-8
K 3	-15	-11	-26
K 4	19	14	23
K 5	21	25	24
K 6	77	37	8
K 7	15	2	-28
K 8	-12	-8	-23
K 9	27	8	1
K 10	3	-4	-7
K 11	28	2	7
K 12	17	10	9
K 13	5	-6	-17
K 14	-6	-7	-8
K 15	12	6	6

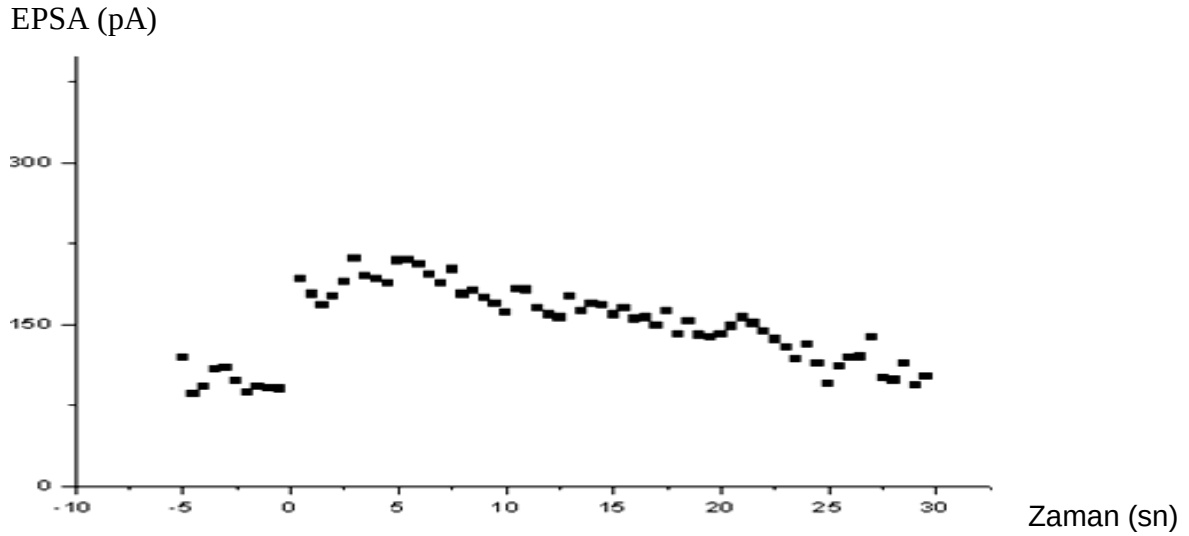
Tablo 6. Yüksek frekans stimülasyon öncesi beş dakikaya kıyasla yüksek frekans stimülasyon sonrası 5,5-10, 10,5-15 ve 15,5-20. dakikalar arasında “eksitator post-sinaptik akım” değerlerindeki artış yüzdeleri (Negatif değerler EPSPA’larda bazale göre azalmayı ifade etmektedir.)

Gruplar 15,5-20. dakikalardaki % 10 ve üzeri EPSA artışı (LTP) ile diğer EPSA değişiklikleri açısından Pearson Ki Kare Testi ile karşılaştırıldığında AT grubunda LTP görülme sıklığı K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Bu veriler aşağıda Tablo 7’de gösterilmiştir.

Gruplar	LTP (-) Fare Sayısı	LTP (+) Fare Sayısı	LTP (+) Farelerin Yüzdesi	P
Akustik Travma	2	13	% 86,7	0,000*
Kontrol	13	2	% 13,3	

Tablo 7. Kontrol ve akustik travma gruplarında “uzun süreli güçlenme (LTP)” görülen farelerin sayısı ve gruplar içindeki yüzdeleri

LTP oluşumu, EPSA değerleri grafik haline getirildiğinde daha net olarak gözlendi. Bun örneklerden bir tanesi aşağıda Şekil 8’de görülmektedir.



Şekil 8. Akustik travma grubundaki altı numaralı fareden elde edilen eksitator post-sinaptik akım amplitüdlerinde, yüksek frekans stimülasyon sonrasında, öncesine göre uzun süreli sinaptik güçlenme oluştuğunun gösterilmesi

TARTIŞMA

DKN'nin ve DKN aracılı sinaptik plastisitenin tinnitus etiyolojisinde önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar son yıllarda yapılan araştırmalarla gittikçe artmıştır. DKN, ilk defa 1996'da Kaltenbach ve arkadaşları tarafından hemstırlar üzerinde yapılan bir çalışmada tinnitus üreten sinyallerin kaynağı olabileceği yönündeki izlenimlerle dikkati çektikten sonra, yoğun ses maruziyeti ile DKN'de oluşan gerek spontan gerekse uyarılmış aktivite artışının ayrıca sıçan, fare, çinçilya ve gerbillerde de görüldüğü farklı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (9,10,13,61,64).

Bu çalışmalarda tinnitus modeli olarak seçilen yoğun ses maruziyetinin (akustik travma) literatürde diğer alternatiflerine oranla daha sık tercih edilen bir yöntem olduğu bilinmektedir. Akustik travma ile oluşturulan tinnitusun bazı özellikleri karakteristiktir. Tinnitusa, verilen sesin şiddetine ve süresine göre geçici veya kalıcı işitme kaybı eşlik eder, tinnitus akustik travma sonrası hemen ortaya çıkar ve akustik travma yaratmak için yüksek tonlar ve saf ses kullanıldığında, dar bant gürültüye göre tinnitus daha iyi oluşturulur. Ayrıca akustik travma modelinde verilen ses frekansının 0,5 oktav üzerinde belirginleşen bir işitme azlığı oluşmakta ve tinnitusun şiddeti verilen bu frekansın 1 ile 1,5 oktav üzerinde maksimum değere ulaşmaktadır. Bu farklılık tinnitus oluşumu ile işitme kaybı gelişiminin farklı patofizyolojik mekanizmalar üzerinden olabileceği düşüncesine yol açar (67). Aynı şiddetteki kısa süreli travmaya ile kıyaslandığında, uzun süreli akustik travmanın işitme düzeyini benzer derecede bozmasına karşın tinnitusu daha iyi oluşturduğu öne sürülmektedir (66,67).

Bu çalışmada kullanılan akustik travma protokolü, postnatal 16 günlük BALB/c farelerin işitme eşik düzeyleri olan 6 kHz'te yaklaşık 60 dB SPL düzeyi göz önüne alındığında literatürdeki normal düzeyde işiten deney hayvanlarına uygulanan genellikle 100, 110, 120 dB SPL saf ses gibi şiddet düzeylerinin tercih edildiği protokollerden farklıdır (8,64). Akustik travma prosedürü için tercih edilen yukarıda belirtilen ses düzeyleri, normal işiten deney hayvanlarına uygulanmakta iken, bu çalışmada kullanılan sesler postnatal 16 günlük BALB/c farelerin işitme eşikleri göz önüne alındığında, ortalama 60 dB SPL saf ses düzeyine denk gelmektedir. Çalışmamızda, postnatal 15-21. günlerin işitme duyarlılığı ve

ototoksisite açısından en hassas dönem olmasından yararlanılarak ve akustik travma süresinin mümkün olduğunca uzatılması sağlanarak akustik travma modeli kullanıldı (31,32,66,67).

Deney hayvanlarında tinnitusun ve işitme eşiklerinin belirlenmesi için ise SRS ve BAS ölçümleri kullanılarak, AT grubunda akustik travma sonucu oluşması öngörülen 25 dB'lik tinnitus şiddetini simüle edebilecek düzeyde 6kHz 90 dB SPL saf ses düzeyinde davranış deneyleri uygulanmıştır. Teknik elverişsizlikler (başın küçüklüğü, elektrodların başa uyumsuzluğu ve kayıt alınmasını engelleyecek şekilde gürültü varlığı, kayıt alınabilen durumlarda genel anesteziye bağlı yoğun denek kaybı) nedeniyle işitme eşiklerinin ABR ile saptanmasının mümkün olamadığı bu çalışmada, SRS ölçümleri fısıltı düzeyinde ses şiddeti ile uygulanarak, deney hayvanlarının işitme eşiklerinin olabildiğince hassas bir şekilde ölçülebilmesi sağlandı.

Bu çalışmada, tüm deney hayvanlarının 6 kHz 90 dB SPL saf ses düzeyinde SRS değerleri 4 saniye ve altında elde edilerek ve tüm deneklerin bu ses düzeyini duyuyor oldukları görüldü (Tablo 2). BAS ölçümleri açısından kontrol ve akustik travma grupları kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiş ($p=0,604$) ve böylece iki grubun tinnitus varlığı açısından benzer olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 3). Akustik travma sonrasında ise, öncesine göre BAS sonuçlarında istatistiksel olarak belirgin farklılık görülmüş olması ($p= 0,001$) akustik travmanın bu grupta tinnitusa neden olduğunu kanıtlamıştır. Akustik travma sonrası davranış deneyleri 6kHz 100 dB SPL saf ses ile devam ettirilmiş ancak bu ses düzeyinde SRS değerleri 4 saniye ve altında elde edilirken BAS değerlerinin belirgin olarak yüksek saptanması, deney hayvanlarında literatüre de uygun olarak seçilmiş akustik travma modelinin belirgin bir işitme kaybından çok belirgin bir tinnitus oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (Tablo 4).

Fujino ve Oertel tarafından 2003'te yapılan çalışmada geçici yoğun elektriksel stimülasyonun DKN üzerinde uzun süreli kalıcı nöral etkiler oluşturduğu izlenmiştir. Tzounopoulus ve arkadaşları tarafından benzer bulgular 2004 ve 2008 yıllarında yaptıkları çalışmalarda ortaya konulmuştur. Bu uzun süreli kalıcı etkiler, fuziform hücrelere input sağlayan paralel liflerden kaydedilen LTP şeklinde göze çarpmıştır. Cartwheel hücrelerde de LTD oluşabileceği kanıtlanmıştır. Böylece, DKN için paralel liflerde, denge içersinde inhibitör ve eksitator birimler içeren bir plastisite devresi şematize edilmiştir (11,63,70).

Cartwheel ve Fuziform hücrelerde meydana gelen LTP ve LTD'nin oluşumunda NMDA, AMPA, çeşitli mGluR, GABA reseptörleri ile kalsiyumun görevli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiş, hatta her iki hücrenin de reseptör subtipleri detaylı olarak çıkartılmıştır (11,12,68). Ayrıca, hayvan modellerinde tinnitus tedavisi için deneysel olarak kalsiyum kanal blokerleri ve NMDA reseptör antagonistleri de kullanılmış ve bazı modellerde başarılı sonuçlar alınmıştır (8, 13).

Çalışmamızda, AT grubunda, K grubuna kıyasla LTP'nin anlamlı derecede yüksek oranda saptanması ($p=0,000$) bu açıdan son derece ilgi çekicidir (Tablo 7). Bu sonuca göre tinnitusta DKN aracılı LTP sıklığında bir artış izlenmiştir. Fuziform hücrelerde WCPC ile LTP incelenmesi konusunda literatürde en sık referans gösterilen çalışma olan Fujino ve Oertel'in 2003'te yaptıkları araştırmalarında, 18 fuziform hücreden YFS sonrası 11 tanesinde LTP gözlemlendiği belirtilmiştir, fakat hücrelerin izole edildiği fareler tinnitus varlığı veya oluşumu açısından değerlendirilmemiştir (11).

Sonuç itibarıyla, bu çalışma içerisinde sözü edilen bütün araştırmalar tinnitusta sinaptik plastisitenin kuvvetli bir rolü olabileceğini işaret etse de, tinnitusta DKN aracılı olabilecek bir sinaptik plastisitenin varlığı hipotetik kalmıştır. Tinnitus oluşturulan deney hayvanlarının, öncesine ya da kontrol deney hayvanlarına göre DKN'lerinde LTP ve LTD oluşumu açısından farklılıklar olup olmadığı yönünde çalışmaların yapılmamış olması konu ile ilgili en büyük eksikliklerden sayılmaktadır (10, 11, 68).

Kontrol ve akustik travma grupları arasındaki tek değişkenin tinnitus olduğu bu araştırma projemizde ise, saptadığımız LTP sıklığındaki anlamlı farklılığın tinnitus patofenezinde etkili olduğu ileri sürülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sinaptik plastisitenin tinnitus oluşumundan sorumlu olması, günümüzde tinnitus için kullanılmakta olan tedavi algoritmalarının yeniden şekillenmesini de beraberinde getirecektir. Yeni ve patofizyolojiye uygun olarak geliştirilen tedavi yöntemlerinin ise bugün uygulananlardan daha başarılı olacağı düşünülebilir.

Ancak bu çalışma, konu ile ilgili literatürde yapılmış ilk kontrollü çalışma olduğu için, patofizyolojik mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi açısından benzer veya karşıt hipotezlerin denendiği farklı çalışmaların yapılması da gereklidir.

Bu çalışma ile akustik travma modeli oluşturulan tinnituslu farelerin DKN'lerinde, kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek saptanan LTP, patofizyolojik mekanizmada sinaptik plastisitenin varlığının kanıtı olarak değerlendirildi.

KAYNAKLAR

1. Aparecida de Azevedo A, Mello de Oliveira P, Gomes de Siqueira A, Figueiredo RR. A critical analysis of tinnitus measuring methods. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007;73:418-23
2. Heller AJ. Classification and epidemiology of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 2003;36:239-48
3. Darlington CL, Smith PF. Drug treatments for tinnitus. *Prog Brain Res* 2007;166:249-62
4. Fioretti A, Eibenstein A, Fusetti M. New trends in tinnitus management. *Open Neurol J* 2011;5:12-7
5. Cazals Y. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate *Prog Neurobiol* 2000;62:583-631
6. Jastreboff PJ, Hazell JW. A neurophysiological approach to tinnitus: clinical implications. *Br J Audiol* 1993;27:7-17
7. Turner JG, Parrish J. Gap detection methods for assessing salicylate-induced tinnitus and hyperacusis in rats. *Am J Audiol* 2008;17:185-92
8. Guitton MJ, Dudai Y. Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma. *Neural Plast* 2007;2007:1-11
9. Kaltenbach JA, Zhang J, Finlayson P. Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 2005;206:200-26
10. Kaltenbach JA, Godfrey DA. Dorsal cochlear nucleus hyperactivity and tinnitus: are they related? *Am J Audiol* 2008;17:148-61
11. Fujino K, Oertel D. Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:265-70
12. Oertel D, Young ED. What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci* 2004;27:104-10
13. Eggermont JJ. Tinnitus: neurobiological substrates. *Drug Discov Today* 2005;1:1283-90
14. Baguley DM. Mechanisms of tinnitus. *Br Med Bull* 2002;63:195-212

15. Epidemiology of tinnitus, Medical Research Council's Institute of Hearing Research. Ciba Found Symp 1981;85:16-34
16. Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 1989;19:911-7
17. Axelsson A, Ringdahl A. Tinnitus: a study of its prevalence and characteristics. *Br J Audiol* 1989;23:53-62
18. Quaranta A, Assennato G, Sallustio V. Epidemiology of hearing problems among adults in Italy. *Scand Audiol* 1996;25:7-11
19. Nodar RH. Tinnitus aurium in school-age children. *J Aud Res* 1972;12:133-5
20. Adams PF, Hendersot GE, Marano MA. Current estimates from the National Health Interview Survey, 1996. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat* 10 1999;81-103
21. Nodar RH. Tinnitus reclassified; new oil in an old lamp. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;114:582-5
22. Zheng Y, Hooton K, Smith PF, Darlington CL. Carbamazepine reduces the behavioural manifestations of tinnitus following salicylate treatment in rats. *Acta Otolaryngol* 2008;128:48-52
23. Ehret G. Development of hearing and response behavior to sound stimuli: behavioral studies. In: *Development of Auditory and Vestibular Systems* (R. Romand, ed.), New York Academic Press 1983;211 – 237
24. Blaszczyk JW, Werka T, Sadowski B. Acoustic startle and disruption of prepulse inhibition by dizocilpine in selectively bred mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2010;70:271-8
25. Ison JR, Allen PD, O'Neill WE. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8:539-50
26. Parham K, Willott JF. Acoustic startle response in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *Behav Neurosci* 1988;102:881-6
27. Turner JG, Brozoski TJ, Bauer CA, Parrish JL, Myers K, Hughes LF, Caspary DM. Gap detection deficits in rats with tinnitus: a potential novel screening tool. *Behav Neurosci* 2006;120:188-95
28. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT. An animal model for tinnitus. *Laryngoscope* 1988;98:280-6

29. Willott JF, Erway LC, Archer JR, and Harrison DE Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds. *Hearing Research* 1995;88:143-155
30. Willott JF, Turner JG, Carlson S, Ding D, Seegers Bross L, Falls WA. The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hear Res* 1998;115:162-74
31. Song L, McGee J, Walsh EJ. Frequency- and level-dependent changes in auditory brainstem responses (ABRS) in developing mice. *J Acoust Soc Am* 2006;119:2242-57
32. Saunders JC, Chen CS. Sensitive periods of susceptibility to auditory trauma in mammals. *Environ Health Perspect* 1982;44:63-6
33. Song L, McGee J, Walsh EJ. Development of cochlear amplification, frequency tuning, and two-tone suppression in the mouse. *J Neurophysiol* 2008;99:344-55
34. Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 2002;25:564-70
35. Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* 2007;13:492-505
36. Urakubo H, Honda M, Tanaka K, Kuroda S. Experimental and computational aspects of signaling mechanisms of spike-timing-dependent plasticity. *HFSP J* 2009;3:240-54
37. Debanne D, Daoudal G, Sourdet V, Russier M. Brain plasticity and ion channels. *J Physiol Paris* 2003;97:403-14
38. Mozzachiodi R, Byrne JH. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci* 2010;33:17-26
39. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 2002;64:355-405
40. Bliss TV, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:357-74
41. Koyano K, Kuba K, Minota S. Long term potentiation of transmitter release induced by repetitive presynaptic activities in bull-frog sympathetic ganglia. *J Physiol* 1985 Feb;359:219-33
42. Ogden D, Stanfield D. Patch clamp techniquea for single channel and whole-cell recording. In: Ogden D. (ed) *Microelectrode techniques, the plymouth workshop handbook*. 2nd Edition. 53-78

43. Hodgkin AL, Huxley AF. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952;116:497-506
44. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952;117:500-44
45. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976;29:799-802
46. Karmazínová M, Lacinová L. Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique. *Physiol Res* 2010;59:1-7
47. Bal R, Oertel D. Voltage-activated calcium currents in octopus cells of the mouse cochlear nucleus. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8:509-21
48. Trettel J, Morest KD. Cytoarchitectonic atlas of the cochlear nucleus of the mouse. Willott JF. (Ed.), In *Handbook of mouse auditory research : From behavior to molecular biology*. CRC Press, USA, 2001:279-296
49. Oertel D, Wu SH. Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J Comp Neurol* 1990;295:136-54
50. Oertel D, Golding NL. Circuits of dorsal cochlear nucleus. Syka J. (Ed.), In *Acoustical signal processing in the central auditory system*. Plenum Press, New York, 1997:127-138
51. Zhang S, Oertel D. Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *J Neurophysiol* 1994;71:914-30
52. Sutherland DP, Masterton RB, Glendenning KK. Role of acoustic striae in hearing: discrimination of sound-source elevation. *Hear Res* 1998;120:86-108
53. Oertel D The role of intrinsic neuronal properties in the encoding of auditory information in the cochlear nuclei. *Curr Opin Neurobiol* 1991;1:221-8
54. Hirsch JA, Oertel D. Intrinsic properties of neurones in the dorsal cochlear nucleus of mice, in vitro. *J Physiol* 1988;396:535-48
55. Gold, T. Hearing. II. The physical basis of the action of the cochlea. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 1948;135: 492-8
56. Jastreboff PJ. Phantom auditory perception (tinnitus): mechanisms of generation and perception. *Neurosci Res* 1990; 8: 221-54
57. Jastreboff PJ, Gray WC, Gold SL. Neurophysiological approach to tinnitus patients. *Am J Otol* 1996;17:236-40
58. Evans EF, Wilson JP, Borerwe TA. Animal models of tinnitus. *Ciba Found Symp* 1981; 85:108-38

59. Kiang NYS, Moxon EC, Levine RA. Auditory-nerve activity in cats with normal and abnormal cochleas. In: Wolstenholme GEW, Knight J. (eds) *Sensorineural Hearing Loss*. London: Churchill Livingstone, 1970; 241-76
60. Tyler RS. Does tinnitus originate from hyperactive nerve fibers in the cochlea? *J Laryngol Otol* 1984; Suppl 9: 38-44
61. Kaltenbach JA, McAslin DL. Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to high intensity sound: a possible neural correlate of tinnitus. *Auditory Neurosci* 1996;3:57-78
62. Eggermont JJ. Tinnitus: some thoughts about its origin. *J Laryngol Otol* 1984; 9:31-7
63. Tzounopoulos T. Mechanisms of synaptic plasticity in the dorsal cochlear nucleus: plasticity-induced changes that could underlie tinnitus. *Am J Audiol* 2008;17:170-5
64. Eggermont JJ. Role of auditory cortex in noise- and drug-induced tinnitus. *Am J Audiol*. 2008;17:162-9
65. Soussi T, Otto SR. Effects of electrical brainstem stimulation on tinnitus. *Acta Otolaryngol* 1994;114:135-40
66. Heffner HE, Harrington IA. Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound. *Hear Res* 2002;170:83-95
67. Heffner HE, Koay G. Tinnitus and hearing loss in hamsters (*Mesocricetus auratus*) exposed to loud sound. *Behav Neurosci* 2005;119:734-42
68. Irie T, Ohmori H. Presynaptic GABA(B) receptors modulate synaptic facilitation and depression at distinct synapses in fusiform cells of mouse dorsal cochlear nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:503-8
69. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2009;29:14077-85
70. Tzounopoulos T, Kim Y, Oertel D, Trussell LO. Cell-specific, spike timing-dependent plasticities in the dorsal cochlear nucleus. *Nat Neurosci* 2004;7:719-25