

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SIÇANLARDA SODYUM SALİSİLAT İLE İNDÜKLENMİŞ
TİNNİTUS MODELİ OLUŞTURARAK KLİK VE ÇİRP UYARAN
FAKTÖRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

BERFİN EYLÜL AYDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SIÇANLARDA SODYUM SALİSİLAT İLE İNDÜKLENMİŞ
TİNNİTUS MODELİ OLUŞTURARAK KLİK VE CHİRP UYARAN
FAKTÖRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

BERFİN EYLÜL AYDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. AYŞE ARZU YİĞİT

ANKARA - 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Berfin Eylül Aydemir tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 8/07/2025

Tez Adı: Sıçanlarda Sodyum Salisilat ile İndüklenmiş Tinnitus Modeli Oluşturarak Klik ve Chirp Uyarı Faktörünün Değerlendirilmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

.....	
.....	
.....	
.....	
.....	

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 08/07/2025

Öğrencinin Adı, Soyadı: Berfin Eylül Aydemir

Öğrencinin Numarası:

Anabilim Dalı: Fizyoloji Anabilim Dalı

Programı: Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: Sıçanlarda Sodyum Salisilat ile İndüklenmiş Tinnitus Modeli Oluşturarak Klik ve Chirp Uyaran Faktörünün Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 32 sayfalık kısmına ilişkin, 24/06/2025 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %3'dür. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

Tarih: ... / ... /

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

.....
.....

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin başlangıcından itibaren hem tez çalışmamın tüm aşamalarındaki hem de erdemli bir araştırmacı ve akademisyen olma yolumdaki inancı, desteği, yol göstericiliği için bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan

Lisans eğitimimden itibaren ufkumu açan, farklı alanda lisansüstü eğitim almam için teşvik eden, araştırma teknikleri ve istatistik gibi alanlarda da kendimi geliştirmeme olanak sağlayan

Tezimin desteklenmesine imkân sağlayan Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu'na

Başımın sıkışmasına dahi olanak vermeden yanımda ve destek olan

Deney hayvanları ile çalışırken gerekli tüm aşamaları titizlikle yürütmemizi sağlayan, en zorlu günlerde dahi güler yüzleri ve yardımlarıyla süreci kolaylaştıran

Farkında olmadan kapıldığım ve bazen içinde kaybolduğum düşünce karmaşalarından beni uzaklaştıran, ümitsizliğe kapılmama izin vermeyen değerli arkadaşlarım

Ferdi olmaktan her an gurur duyduğum, çıktığım her yolun destekçisi

saygı dolu teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

AYDEMİR Berfin Eylül, Sıçanlarda Sodyum Salisilat ile İndüklenmiş Tinnitus Modeli Oluşturarak Klik ve Chirp Uyarın Faktörünün Değerlendirilmesi, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans, 2025.

Tinnitus, etiyopatogenezi hâlen tam olarak aydınlatılamamış olan, dışsal bir akustik uyarın olmaksızın sessizlikte algılanan fantom ses deneyimi olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada, deneysel hayvan modeli oluşturularak sıçanlarda sodyum salisilat uygulaması ile tinnitus indüklenmiş ve bu model üzerinden klik ve *chirp* uyarın kullanılarak işitsel beyin sapı cevapları (İBC) kaydedildi. Elektrofizyolojik veriler, davranışsal ölçümlerle desteklenerek modelin geçerliliğinin iki yönlü olarak test edilmesi amaçlandı.

Çalışmada İBC ile işitmelerinin normal olduğu belirlenen, 5 aylık 24 adet Sprague-Dawley erkek sıçan kullanıldı. Öncelikle sıçanların Sıçanlar *sham* grubu ve tinnitus grubu olarak ikiye ayrıldı. Tüm sıçanlara deney öncesinde Guitton ve Dudai tarafından geliştirilen T su labirenti yöntemiyle sesli-sessiz ortam koşullaması yapıldıktan sonra deney grubundaki sıçanlara 6 gün boyunca intraperitoneal yolla 300 mg/kg sodyum salisilat enjeksiyonu yapıldı. *Sham* grubuna ise aynı süre ve dozda intraperitoneal yolla %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonların ardından gruplardaki tüm sıçanlar tinnitusun varlığını davranışsal düzeyde saptamak amacıyla T havuzda yüzme deneyine alındı. Yüzme deneyinde sıçanların T havuzun sesle ve sessizlikle koşullandırılan kollarından hangisinde daha uzun süre kaldıkları kaydedildi. Yüzme deneylerinden sonra hem klik hem de *chirp* uyarın kullanılarak anestezi altında işitsel beyin sapı cevapları kaydı alındı. İşitsel beyin sapı cevaplarında 80 dB nHL'de alınan I, II, III, IV ve V. dalga latans ve amplitüdleri değerlendirildi. Ek olarak işitme kaybı olup olmadığını değerlendirmek üzere 20 dB nHL'de II. dalga belirlemesi yapıldı.

Elde edilen bulgularda deney grubunun sessiz koşullarda dahi önceden sesli koşulla eşleştirilmiş kolda daha uzun zaman geçirmesi, tinnitus algısının davranışsal temsili olarak yorumlandı. Salisilat uygulaması sonrasında işitsel beyin sapı cevapları kaydında II. ve III. dalga amplitüdlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Ayrıca klik uyarınlara verilen yanıtların *chirp* uyarınlarla kıyasla daha belirgin şekilde etkilendiği görüldü. Ayrıca, klik uyarının periferik ve merkezi işitsel yollar üzerindeki etkilerinin tinnitusun nörofizyolojik karakterizasyonu açısından daha hassas bir değerlendirme sunduğu ortaya koyuldu.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile sıçanlarda sodyum salisilatla indüklenmiş deneyssel tinnitus modelinin hem elektrofizyolojik hem de davranışsal yöntemle güvenilir şekilde değerlendirilebileceği ve klik uyarının *chirp* uyarandan daha hassas bir değerlendirme sağladığı gösterildi. Çalışmanın deneyssel tinnitus modeli geliştirilmesinde kullanılabilecek bir yöntem standardizasyonu ortaya koymasının yanı sıra, deneyssel modellemeye dayalı potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine de zemin oluşturabileceği dşnlmektedir.

Anahtar Kelimeler: Chirp uyarı, deneyssel tinnitus modeli, işitsel beyin sapı cevapları, klik uyarı, sodyum salisilat

Bu alışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 23/24 sayılı kararı ile onaylandı ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklendi

ABSTRACT

AYDEMİR Berfin Eylül, Evaluation of Click and Chirp Stimulus Factor by Creating Sodium Salicylate Induced Tinnitus Model in Rats, Başkent University, Institute of Health Sciences, Physiology Master's Degree, 2025.

Tinnitus is defined as a phantom auditory perception experienced in the absence of any external acoustic stimulus, and its etiopathogenesis has not yet been fully elucidated. In this study, an experimental animal model was established by inducing tinnitus in rats through the administration of sodium salicylate, and auditory brainstem responses (ABRs) were recorded using both click and chirp stimuli. The aim was to evaluate the validity of the model through a dual approach that combines electrophysiological data with behavioral assessments.

A total of 24 five-month-old male Sprague-Dawley rats with normal hearing confirmed via ABR were used. The rats were randomly divided into two groups: sham and tinnitus. Prior to the experiment, all rats underwent acoustic conditioning using the T-shaped water maze method developed by Guitton and Dudai, which involved pairing one arm of the maze with sound and the other with silence. Following conditioning, the tinnitus group received daily intraperitoneal injections of sodium salicylate at a dose of 300 mg/kg for six consecutive days. The sham group received the same volume of 0.9% sodium chloride via intraperitoneal injection over the same period.

After the injection period, all rats were subjected to a swimming test in the T-maze to behaviorally assess the presence of tinnitus. The time spent in the sound-paired versus silent-paired arms of the maze was recorded. Following behavioral testing, ABRs were recorded under anesthesia using both click and chirp stimuli. Latencies and amplitudes of waves I, II, III, IV, and V at 80 dB nHL were analyzed. In addition, wave II responses at 20 dB nHL were evaluated to assess potential hearing loss.

The results showed that rats in the tinnitus group spent significantly more time in the arm previously paired with sound, even in the absence of any acoustic stimulus, suggesting a behavioral representation of tinnitus perception. Following salicylate administration, statistically significant increases were observed in the amplitudes of waves II and III in the ABR recordings ($p < 0.05$). Click-evoked responses were found to be more markedly affected compared to chirp-evoked responses. Furthermore, click stimuli appeared to

provide a more sensitive assessment of both peripheral and central auditory pathway alterations, offering enhanced neurophysiological characterization of tinnitus.

In conclusion, this thesis demonstrates that an experimental tinnitus model induced by sodium salicylate in rats can be reliably evaluated using both electrophysiological and behavioral methods. Click stimuli were found to offer greater sensitivity compared to chirp stimuli. This study not only proposes a standardized methodology for developing experimental tinnitus models but also lays the groundwork for the development of potential treatment strategies based on experimental modeling.

Keywords: Chirp stimulus, experimental tinnitus model, auditory brainstem responses, click stimulus, sodium salicylate

This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals with the decision numbered 23/24 and supported by Baskent University Research Fund (DA23)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tinnitus İndükleyici Maddeler.....	3
2.1.1. Salisilatlar.....	3
2.1.1.1. Sodyum salisilat.....	3
2.1.1.2. Gürültü.....	5
2.2. Deney Hayvanlarında Tinnitus Değerlendirme Yöntemleri.....	5
2.2.1. Davranışsal değerlendirme yöntemleri.....	5
2.2.1.1. Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama modeli.....	6
2.2.1.2. Bauer ve Brazoski'nin koşullandırılmış kaçınma modeli.....	7
2.2.1.3. Guitton koşullandırılmış kaçınma modeli.....	7
2.2.1.4. Turner'ın irkilme refleksi baskılama modeli.....	8
2.2.1.5. Guitton t su labirenti modeli.....	8
2.2.1.6. Rüttiger'in koşullandırılmış kaçınma modeli.....	9
2.2.1.7. Laborinas'ın planlı oluşturulmuş polidipsiden kaçınma modeli.....	10
2.2.1.8. Heffner'in sesin yerini belirleme modeli.....	10
2.2.2. Elektrofizyolojik değerlendirme yöntemleri.....	10
2.2.2.1. İşitsel beyin sapı cevapları.....	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Araştırmaya Dahil Edilecek Deney Hayvanlarının Seçimi.....	15
3.2. T Havuzda Koşullama Eğitimi.....	17
3.3. Tinnitus Modeli Oluşturulması.....	18
3.4. T Havuz ile Tinnitus Varlığının Gösterilmesi.....	20

3.5. İşitsel Beyin Sapı Cevapları Kaydı.....	21
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Vücut Ağırlığı Değişimleri.....	23
4.2. T Havuz Testi Sonuçları.....	23
4.3. İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalgaları.....	24
4.3.1. Dalga latansları.....	24
4.3.2. Dalga amplitüdleri.....	26
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	32
EKLER	
EK 1: Proje Onayı	

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sağ kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga latansları (ms).....	24
Tablo 4.2. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sol kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga latansları (ms).....	25
Tablo 4.3. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sağ kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga amplitüdleri (μ V).....	26
Tablo 4.4. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sol kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga amplitüdleri (μ V).....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi.....	7
Şekil 2.2. Guitton'un koşullandırılmış kaçınma yöntemi.....	8
Şekil 2.3. Guitton'un T su labirenti yöntemi.....	9
Şekil 2.4. Sıçanlarda 120 dB SPL ses şiddetinde alınan işitsel beyin sapı cevapları dalgası.....	13
Şekil 3.1. Deney planı.....	16
Şekil 3.2. T havuz.....	17
Şekil 3.3. Sodyum salisilat.....	19
Şekil 3.4. İntraperitoneal enjeksiyon.....	19
Şekil 3.5. Yüzme deneyi izleme ve kayıt düzeneği.....	20
Şekil 3.6. İşitsel beyin sapı cevapları kaydı için ölçüm ortamı.....	21
Şekil 3.7. Sıçanda İBC kaydında kontralateral elektrot ve kulaklık yerleşimi.....	22
Şekil 4.1. Sham ve deney grubunda günlere göre ağırlık değişimi.....	23
Şekil 4.2. Sham ve deney gruplarının yüzme deneyi sırasında T havuzda geçirdiği süreler.....	24
Şekil 4.3. Deney sonunda sham ve deney grubundan klik ve chirp uyarı ile sağ kulaktan alınan işitsel beyin sapı cevapları dalga kayıt örnekleri.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

cm	santimetre
COX	siklooksijenaz
dB	desibell
GABA	gama-aminobütirik asit
gr	gram
HL	işitme seviyesi, hearing level
Hz	hertz
i.p.	intraperitoneal
İBC	işitsel beyin sapı cevapları
kHz	kilohertz
LLR	geç latans cevabı, late latency response
mg/kg	miligram/kilogram
ml	mililitre
MLR	orta latans cevabı, middle latency response
nHL	normalleştirilmiş işitme seviyesi, normalize hearing level
SPL	ses basınç seviyesi, sound pressure level

1. GİRİŞ

Tinnitus, dış ortamda akustik bir ses kaynağı olmaksızın, periferik veya merkezi işitsel sistemdeki bozulmadan kaynaklanmaktadır. Genellikle sessizlikte algılanan hayali ses algısı olarak tanımlanan ve popülasyonun ortalama %10-15'ini etkileyen bir semptomdur. Algılanan ses, bir hastalıktan çok işitsel sistemdeki anormalliklerden kaynaklanır. Tinnitus algısı sesin şiddeti, frekansı, zamansal özellikleri, kafa ya da kulakta lokalize olması veya temporal özellikleri ile ayırt edilir ve bu özellikler bireyler arasında farklılık gösterir (1).

Oluşum mekanizmasının hala çözülememesinden dolayı çok farklı sınıflandırmaları olsa da en basit şekliyle tinnitus, objektif ve subjektif tinnitus olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Objektif tinnitus, mekanik olarak üretilen akustik titreşimsel aktivitenin algılanmasıdır. Başkası tarafından da duyulabilmektedir. Vasküler, kas, iskelet veya solunum sistemi kaynaklı olabilir. Subjektif tinnitus ise, yalnızca tinnitus şikâyeti olan bireyler tarafından duyulmaktadır. Tinnitusun en yaygın görülen türüdür. Kaynağı ile ilgili ortak bir görüş olmamasına karşılık, periferik işitme sistemindeki nöral, hücresel ya da fonksiyonel bozulmalara santral işitme sistemi ve limbik sistem tarafından verilen düzeltici yanıtların subjektif tinnitus algısına sebep olduğu düşünülmektedir (1,2).

Tinnitusa sebep olan başlıca risk faktörleri işitme kaybı, yaşlanma, mesleki ya da eğlence kaynaklı gürültü maruziyeti ve ilaç kullanımıdır. Literatürde işitsel sistem hastalıkları, obezite, diyet, sigara/alkol tüketimi, kafa travmaları, hipertansiyon, hiper/hipotiroidi, genetik faktörler, viral enfeksiyonlar gibi olası risk faktörler de bildirilmiştir (3–5). Olası risk faktörlerinin ortadan kaldırılması ya da etkilerinin azaltılmasıyla tinnitus tedavi edilebilmektedir. Ancak bazı durumlarda tinnitus tamamen ortadan kalkmaz ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen uzun süreli rahatsızlık hissi başa çıkma stratejileri ile hafifletilmeye çalışılır.

Prevelansından, etiyolojisine; tanılama ve tedavi/ başa çıkma stratejilerine kadar her alanda tinnitusla ilişkili görüş farklılıkları bulunmakla birlikte, tinnitus konusu gerek insan gerekse hayvan çalışmalarıyla literatürde güncelliğini korumaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan deney hayvanı çalışmaları tinnitusla ilgili detayların ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur (6–8). İnsanlarda tinnitus varlığını saptamak, karakteristik özelliklerini belirlemek, işitme sisteminde meydana gelen değişiklikleri davranışsal ve elektrofizyolojik yöntemlerle incelemek üzere oluşturulan çalışmalar hayvan deneylerine göre daha kolay düzenlenmektedir. Ancak tinnitus fizyolojisi ve olası tedavi yöntemleri üzerinde deneysel

alışmalar yapmak için de hayvan modelleri kullanımı kaçınılmazdır. Ancak, bu yöntemde de hayvanlardaki tinnitusun algısal ve nöral özelliklerini belirlemek insanlardaki kadar kolay olmamaktadır.

Tüm çalışmalara rağmen hayvan modelleri ile oluşturulan tinnitus, insanlardaki gibi çok yönlü etiyolojiye sahip olmadığı gibi, psikolojik olarak yol açtığı sonuçların da aynı olup olmadığını anlayabilmek zordur. Bu nedenle hayvan modellerinin insanlarda tinnitusun nedenlerini ve tedavilerini anlamak için kullanımı sınırlıdır. Yine de hayvan modelleri, tinnitusun mekanizmalarını ve tedavilerini araştırmak için önemli bir araçtır. İnsanlarda direk olarak gerçekleştirilemeyecek alternatif tedavilerin geliştirilmesi için yapılacak n çalışmalarda deney hayvanı modellerinin kullanılabileceği göz önünde tutulmalıdır.

Tinnitus değerlendirmesinde kullanılan işitsel beyin sapı cevapları (İBC, İng; Auditory Brainstem Response-ABR) kaydı, deney hayvanının maruz kalacağı stres faktörlerinin en aza indirilmesi ile deney sonucunda alınan verilerin daha güvenilir olmasını sağlamak, ölçüm kolaylığı ve cevapların tek seferde daha etkin alınması için kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Yapılan araştırmanın amacı da salisilat ile indüklenmiş tinnitus deney hayvanı modelinin oluşturulması ve oluşturulan bu modelin hem davranışsal hem de İBC lm ile elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesi ve bu modelde klik ve *chirp* uyarıların cevaplarının karşılaştırılmasıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda salisilat ile indüklenmiş tinnitus modelinde bu uyarıların cevaplarını birlikte gösteren bir çalışmaya rastlanılamamış olup, çalışmamız daha sonra yapılacak araştırmalar için tinnitus hayvan modeli temelini oluşturulması ve tedavide kullanılabilecek farklı alternatiflerin oluşturulmuş olan model üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi yanında her iki uyarının farkını da göstermeyi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Deney hayvanlarında tinnitus oluşturmak için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerde işitme sistemi hücrelerinin hasar görmesine ve işitme kaybına neden olabilen salisilatlar, bazı antibiyotikler (örneğin, gentamisin), kemoterapi ilaçları (örneğin, cisplatin), ağrı kesiciler (örneğin, ibuprofen) ve gürültü maruziyeti gibi ototoksik (kulak zararlı) bileşikler tinnitus indükleyici olarak kullanılmaktadır (9).

2.1. Tinnitus İndükleyici Maddeler

2.1.1. Salisilatlar

Yaygın olarak kullanılan aspirinin aktif bileşeni olan salisilat, orta dozlarda hafif analjezik, antipiretik ve antiinflamatuar etkilere sahiptir (10). Salisilat toksisitesinin insanlarda mide bulantısı, kusma, mide iritasyonu sebebiyle karın ağrısı, medulla oblongatadaki karbondioksit duyarlılığını artırmasından dolayı respiratuvar alkalozla sonuçlanan hiperventilasyon, bikarbonatın fazla atımına bağlı olarak idrarla sodyum ve potasyum kaybı gibi toksik etkileri bildirilmiştir (11). Normal sıçanlarda ise karaciğer glikojenini azalttığı ve kan şekerini yükseltebildiği bildirilmiştir (12). Bununla birlikte, daha yüksek dozlarda, insanlarda ve hayvanlarda geçici olarak orta derecede işitme kaybına ve yüksek perdeli bir tinnitus algısına neden olabilmektedir (13).

Sodyum salisilat, non-steroidal antiinflamatuar bir ajan olup siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu yoluyla analjezik ve antipiretik etkilere sahiptir. Bununla birlikte, yüksek dozlarda (200-400 mg/kg) uygulandığında işitme sisteminde çeşitli değişikliklere yol açarak tinnitus benzeri davranışlara neden olmaktadır. Ancak yüksek dozlarda kullanılmasına rağmen meydana getirdiği işitme kaybı ve tinnitus etkisinin geçici olması sebebiyle tinnitus modelleme çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (14–16).

2.1.1.1. Sodyum salisilat

Sodyum salisilatın pek çok farklı yol ile işitme sisteminde hasara sebep olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki işitme sinir hücrelerinde glutamat salınımının artmasına sebep olarak işitsel yollarda hiperaktiviteye neden olduğudur (17). Sodyum salisilat uygulaması sonrasında gama-aminobütirik asit (GABA) seviyelerinde azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Diğer yandan GABA seviyelerindeki bu değişimin GABAerjik inhibisyonu azaltarak işitsel korteks ve talamus seviyesinde gama dalga osilasyonlarını

artırdığı ve dolayısıyla merkezi işitme yollarında eksitator aktivitenin artmasına yol açtığı öne sürülmektedir (18). Ek olarak, Üstündağ ve arkadaşlarının (19) yaptıkları çalışmada sodyum salisilatın oksidatif stres seviyelerini artırarak hücre hasara yol açtığı ve nitrik oksit (NO) üretimini artırarak nöronal aktiviteyi modüle ettiği gösterilmiştir. Sodyum salisilatın koklear mikrosirkülasyonu bozarak işitsel sinir sisteminde fonksiyonel değişikliklere sebep olduğu (20) ve dış tüy hücrelerinin motor proteini olan prestinin klorür anyon bağlama bölgesi için rekabetçi bir antagonist gibi davranarak hücre zarı potansiyelini ve zar özelliklerini değiştirdiği de bildirilmektedir (21).

Sodyum salisilatın işitsel sisteme olan etki mekanizmalarının çeşitliliği sebebiyle işitme sistemi etkilenimi periferik ve santral olarak farklılık göstermektedir. Sodyum salisilat, kokleadaki dış tüylü hücrelerin motor fonksiyonlarını etkileyerek otoakustik emisyonları azaltabilmekte ve spiral gangliyon nöronlarında aktivite değişiklikleri meydana getirebilmektedir (17). Ek olarak sodyum salisilat uygulamasının inferior kolikulus ve primer işitsel kortekste spontan nöronal aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. Bu artış, tinnitus algısıyla ilişkili olabilecek merkezi plastik değişiklikleri desteklemektedir (20).

Bireysel olarak değişmekle birlikte salisilatlar ile indüklenen tinnitusun hayvanlarda da insanlardaki gibi genellikle 10-16 kHz veya 7-9 kHz frekans aralığında olduğu rapor edilmiştir (17,22). Ayrıca, salisilatlarla ilişkili tinnitus genellikle ilacın kesilmesinin ardından birkaç gün içinde kendiliğinden azalmaktadır (13).

Jastreboff ve arkadaşlarının (16) yaptığı çalışmada, sıçanlarda intraperitoneal 350 mg/kg dozda sodyum salisilat uygulamasının, işitme kaybına ve tinnitus gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak yapılan başka bir çalışmada intraperitoneal enjeksiyondan 2-4 saat sonra kandaki sodyum salisilat konsantrasyonunun en yüksek değere ulaştığı ve enjeksiyondan 8-15 saat sonra ilacın yarı ömrünü tamamladığı bildirilmektedir (23). Yakın zamanda aynı amaçla yapılan çalışmalarda da intraperitoneal sodyum salisilat 7 ardışık gün boyunca günde 400 mg/kg (20), tek doz 350 mg/kg (15), 3 hafta boyunca haftada 5 gün ve günde 200 mg/kg gibi farklı dozlarda kullanılmıştır (24).

Salisilat türevleri, deney hayvanlarında işitme sistemi hasarına neden olarak tinnitusu en iyi modelleyen kimyasallardan biridir. Yüksek dozlarda kullanılmasına rağmen meydana getirdiği işitme kaybı ve tinnitus etkisinin geçici olması tercih sebeplerindendir (14,15). Bu araştırma için de yukarıda sayılan sebepler ve literatürde yaygın olarak kullanılması nedeniyle tinnitus indükleyici madde olarak sodyum salisilat tercih edilmiştir.

2.1.1.2. Gürültü

Gürültü maruziyeti, canlılarda işitme sistemi sağlığını etkileyen başlıca faktörlerden biridir. Maruziyetin süresi, şiddeti ve türü ile işitme sisteminde meydana gelen hasar da değişebilmektedir. Ani akustik travma şeklindeki gürültü maruziyeti ani ve nispeten kalıcı bir işitme kaybı ve tinnitusa sebep olurken, uzun süreli ve yavaş yavaş ilerleyen bir maruziyet giderek artan işitme kaybı ve tinnitusa sebep olmaktadır. Etkilenim ve sonuç ilişkisindeki bu farklılık literatürdeki gürültüyle indüklenmiş tinnitus modellerinde de farklılıklara neden olmuştur.

Domeracka ve arkadaşları'nın (8) yaptığı derleme çalışmasında son 10 yıl içerisinde literatürde yayınlanmış 39 deney hayvanı tinnitus modelleme çalışmasından 19'unda tinnitus indükleyici olarak gürültü kullanıldığı belirtilmiştir. Kullanılan gürültü uyarının özellikleri unilateral ya da bilateral, uzun süreli ya da ani uyarım olarak 8-16 kHz aralığında farklı frekans ve 80-194 dB SPL aralığında farklı ses şiddetlerinde değişiklik göstermektedir (25–27). Kullanılacak gürültü uyarının nasıl olacağı sonuçta modellenmek istenen hasarın özelliklerine göre belirlenmelidir.

2.2. Deney Hayvanlarında Tinnitus Değerlendirme Yöntemleri

Tinnitusun varlığını belirlemek, karakteristik özelliklerini anlamak ve işitme sisteminde meydana gelen değişiklikleri incelemek amacıyla insanlarda davranışsal ve elektrofizyolojik yöntemlerle yapılan çalışmalar, hayvan modellerine göre daha kolay organize edilebilmektedir. Ancak, tinnitusun fizyolojisi ve olası tedavi yöntemleri üzerine deneysel çalışmalar yürütmek için hayvan modellerinin kullanımı kaçınılmazdır. Bununla birlikte, bu yöntemle hayvanlarda tinnitusun algısal ve sinirsel özelliklerini belirlemek, insanlardaki kadar kolay değildir.

Tinnitus varlığı deney hayvanı çalışmalarında insan çalışmalarından farklı olarak anamnez ile tespit edilemeyeceğinden daha ayrıntılı davranışsal ve fizyolojik değerlendirmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde bu değerlendirme yöntemlerinden davranışsal ve fizyolojik olarak iki başlık altında söz edilmektedir.

2.2.1. Davranışsal değerlendirme yöntemleri

Tinnitus oluşturma ve değerlendirme amacıyla literatürde en çok kullanılan deney hayvanları sıçanlar (Long-Evans, Sprague Dawley, Norway rat, Wistar, Fisher 344), fareler, kobaylar ve kedilerdir (1). Domarecka ve arkadaşları (8) tarafından yapılan bir incelemede,

tinnitus modellemesi yapılan deney hayvanlarında elektrofizyolojik test yöntemini değerlendiren 36 çalışma incelenmiş ve son on yılda yapılan çalışmaların yaklaşık %50'sinde erkek Sprague-Dawley sıçanlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalara rağmen, hayvan modelleriyle oluşturulan tinnitus, insanlarda meydana gelen tinnitus ile birebir aynı değildir. Bu nedenle, hayvan modellerinin insanlardaki tinnitusun nedenlerini ve tedavi yöntemlerini anlamada sınırlı olduğu kabul edilmektedir. Yine de tinnitusun mekanizmalarını ve tedavi yöntemlerini araştırmada hayvan modelleri önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

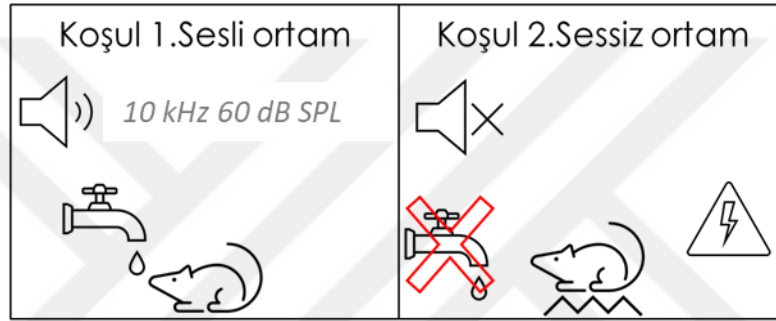
Yukarıda da belirtildiği gibi her ne kadar tinnitus oluşum mekanizması ile tedavi alternatifleri ve protokollerinin belirlenmesinde deney hayvanı modelleri kullanımı kaçınılmaz olsa da bu modellerde tinnitus oluşup oluşmadığının belirlenmesi ve bazı ölçümler insanlarda kullanılan yöntemlere göre daha zordur. Davranış yöntemleri, tinnitus indükleyici madde maruziyeti sonrasında deney hayvanlarında tinnitus meydana gelip gelmediğini değerlendirmek için kullanılan başlıca yöntemdir. Davranış yöntemlerinin temeli Jastreboff (1988) (22) ve Bauer (1999) (6) tarafından oluşturulan ilk metotlar olup, geliştirilerek günümüze kadar birçok yeni yöntem literatüre kazandırılmıştır.

Davranış yöntemleri altında farklı yöntemler geliştirilmiş olsa da temelde metot, deney hayvanının sesli- sessiz ortamı ayırt etme becerisini değerlendirmektedir. Bu testlerde tinnitus indükleyici madde maruziyeti öncesinde sesli-sessiz ortam farkı öğretilen deney hayvanlarının, tinnitus indükleyici madde maruziyeti sonrasında teste tabii tutularak aslında ortamda ses kaynağı olmamasına rağmen, daha önce ses varken öğrendiği şekilde davranış gösterip göstermedikleri değerlendirilmeye alınmaktadır.

2.2.1.1. Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi

Deney hayvanlarında tinnitus değerlendirme amaçlı kullanılan ilk davranış testidir. Temel olarak uzun süreli susuzluk sonrası, ses ile su içme davranışının ilişkisini öğretmek deney hayvanını ses duyduğunda su içmeye koşullandırmaktadır. Bu sayede hayvana sesli-sessiz ortam farkı öğretilir. Yöntem 3 aşamadan oluşmaktadır; 2-3 gün başlangıç eğitimi, 4-5 gün Pavlov'un koşullandırılmış baskılama eğitimi, salisilat uygulamasından 2 saat sonra davranış testi (Şekil 2.1). Başlangıç eğitimi öncesinde deney hayvanı normal barınma koşullarında, 18 saatlik susuzlukta, arka planda 10 kHz 60 dB saf ses dinletilerek bekletilmektedir. Eğitimin ilk aşaması 28 dakika sesli, rastgele 30'ar saniyelik 4 sessiz boşluk ile toplamda 30 dakika sürmektedir. Günde yarım saat uygulanan eğitim art arda 3

gün boyunca devam etmektedir. Pavlov'un koşullandırılmış baskılama eğitimi olan ikinci aşamada, ilk aşamaya ek olarak sessiz koşulda hayvanın su içme davranışını engellemek için ayak şoku verilerek koşullama yapılmakta ve yalnızca ses duyduğu süre boyunca su içme davranışı öğretilmektedir. İkinci aşama da günde 30 dakikalık periyodlarla 4-5 gün devam etmektedir. Son aşama olan davranış testi bölümünde de ayak şoku kullanılmaz ve hayvanın sesli-sessiz koşuldaki davranışları kayıt altına alınmaktadır. Eğitim sürecindeki sesli ve sessiz durumda su içme sayısı oranlanmakta ve eğitim sonrasındaki üçüncü aşama olan davranış testi aşamasındaki sonuçlar ile karşılaştırılmaktadır. Öğrenme için su içmenin baskılanma oranı $<0,5$ olmalıdır. Test aşamasında su içme davranışı 0.5'ten büyük ise tinnitus oluşmuş anlamına gelmektedir (16, 22, 28).



Şekil 2.1. Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi

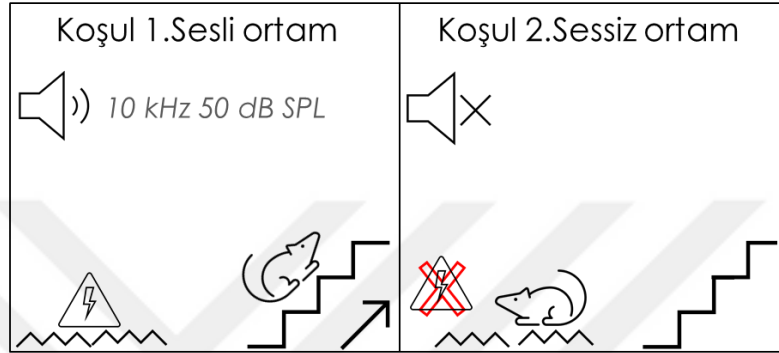
2.2.1.2. Bauer ve Brazoski'nin koşullandırılmış kaçınma yöntemi

Yöntem Jastreboff'un koşullandırılmış baskılama yöntemi gibi sesli sessiz ortam farkını öğretme prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde uzun süreli açlık sonrası 60 dB SPL geniş bant artalan gürültüsünde deney hayvanına yemek için pedala basması öğretilmektedir. Sessizlikte pedala basma davranışının engellenmesi için eğitim sürecinde artalan gürültüsü içerisinde rastgele 60 saniyelik sessizlikte ayak şoku uygulanmaktadır. Eğitim sürecinde pedala basma davranışında %25 oranında azalma olduğunda deney hayvanının koşullandığı düşünülmektedir. Test aşamasında ayak şoku uygulanmamakta ve deney hayvanının tinnitus oluşması durumunda sessizlikte de pedala basmaya devam etmesi temelinde değerlendirme yapılmaktadır (6).

2.2.1.3. Guitton koşullandırılmış kaçınma yöntemi

Guitton ve arkadaşları deney hayvanlarına önce koşullandırma denemesi yaparak 3 dk boyunca 10 kHz 50 dB SPL saf ses varlığında kafes tabanından verilen 3.7 mA'lık ayak şokundan kaçınmalarını öğreten bir yöntem geliştirmiştir. Daha önce geliştirilen

yöntemlerde sessizlikte verilen ayak şoku, bu yöntemde sesli koşulda kullanılmaktadır. Deney hayvanları sesli koşulda kafesin köşesine konumlandırılmış merdivene tırmanmaya koşullandırılmaktadır. Daha sonrasında ise 10 dakika süren 10 deneme sonucunda deney hayvan sesle birlikte verilen ayak şoklarının %80'inden kaçındığında eğitimi öğrendiği kabul edilmektedir. Tinnitus oluşturulduğunda ise deney hayvanının sürekli ses duyması nedeniyle merdivende daha fazla vakit geçirmesi ve kafes tabanından kaçınması beklenmektedir (17) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Guitton'un koşullandırılmış kaçınma yöntemi

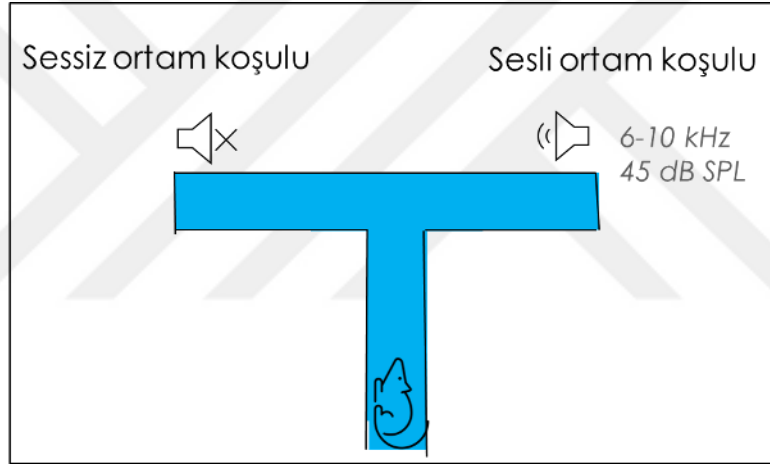
2.2.1.4. Turner'ın irkilme refleksini baskılama yöntemi

Turner ve arkadaşlarının irkilme refleksini baskılama yöntemi deney hayvanının eğitimini gerektiren diğer davranış yöntemlerinden farklı olarak bilişsel ve motivasyon değişkenlerini kontrol altında tutma temelinde tasarlanmıştır. Bu yöntemde tinnitus değerlendirmesi için deney hayvanına ön eğitim gerçekleştirilmemektedir. Temelde ani sese karşı oluşan irkilme refleksini değerlendirmeye dayanmaktadır. Değerlendirme sürecinde tabanında piezoelektrik dönüştürücü bulunan kafesteki deney hayvanına, sürekli dinletilen 60 dB SPL dar bant ses içerisinde rastgele 50 ms sessiz aralar verilir ve sessiz aralık içinde 20 ms 115 dB SPL geniş bant ses verilmesiyle oluşan irkilmenin basınç değerinin ölçülür. Tinnitus oluşan hayvanlarda bu irkilme basınç değerinin azalması beklenmektedir (29).

2.2.1.5. Guitton T su labirenti

Yapılan tez çalışmasında da kullanılmış olan su labirenti yöntemi deney hayvanının iki seçenek arasında seçim yapması prensibine dayanmaktadır. Diğer yöntemlerden farklı olarak herhangi bir yoksunluk ya da ayak şoku uygulanmadığı için avantajlı bir yöntemdir. Guitton ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde içine portatif bir kaçış platformu yerleştirilebilen T şeklinde bir havuz kullanılır. Deney hayvanı başlangıç kolundan 21

santigrat derece suya bırakılır ve ses varlığında havuzdaki çıkış platformu sağa, ses yokluğunda sola konumlandırılarak, sesli ve sessiz ortamda yönelmeleri gereken kol öğretilir. Eğitim 3 sesli, 3 sessiz koşul sıralamasıyla toplamda 12 koşulluk seanslarla, günde 1 seans olacak şekilde 3 gün boyunca devam etmektedir. Araştırmacılar sesli koşul için 6 veya 10 kHz 45 dB SPL saf ses kullanımını önermektedir (Şekil 2.3). Eğitim sırasında 12 denemede ortalama platforma ulaşma süresi ve doğru karar yüzdesi öğrenme kriteri olarak kullanılmaktadır. Daha sonrasında da kimyasal ya da gürültü ile indüklenerek tinnitus oluşturulduğu düşünülen hayvanlar arka plan sesi verilmeden, herhangi bir kolda platform bulunmayan havuzun başlangıç koluna bırakılmakta ve hangi kolda vakit geçirdiği, platformu nerede aradığı kriterlerine göre değerlendirilmektedir. Tinnitus indüklenmiş hayvanda beklenen performans, eğitim sırasındaki arka plan sesi veriliyormuş gibi davranması ve duyduğu tinnitus nedeniyle sağ kolda daha fazla vakit geçirmesidir (30).



Şekil 2.3. Guitton'un T su labirenti yöntemi

2.2.1.6. Rüttiger'in koşullandırılmış kaçınma yöntemi

Rüttiger ve arkadaşları bu yöntemde çalışma amaçlarına uygun olarak dizayn edilmiş ticari bir şartlandırma kabini kullanmaktadır. Kabin tabanı ayak şoku uygulaması için elverişli barlardan ve bir tarafında dinlenme yeri görevi gören mekanik sensörlü platformdan oluşmaktadır. Kabin orta kısımdan bir duvarla iki kısa koridora ayrılmış ve koridorların sonuna sıvı besleyici ile hayvan hareketlerini izleyen foto sensör yerleştirilmiştir. Sıvı besleyici içerisindeki %3 sükroz içeren su ile ödül sağlanmıştır. Bu yöntemde eğitim haftada beş gün, deney hayvanının aktivitesine göre günde 30-60 dakika sürmektedir. Eğitim süresince merkezi bir hoparlörden sürekli 0.01-50 kHz bant genişliğinde, 70 dB SPL beyaz gürültü dinletilen deney hayvanına rastgele zamanlarda gürültü sesiyle birlikte 200 ms

uzunluğunda, 8 kHz, 70 dB SPL saf ses sunulmuştur. Bu yöntemde diğer yöntemler gibi sessiz sesli ortam farkı deney hayvanına öğretilmektedir. Ses duyduğunda şekerli su içerek ödüllendirilen deney hayvanının sessizlikte su içme davranışının ayak şoku uygulaması ile baskılanması hedeflenmektedir. Tinnitus oluşturulan hayvanda beklenen performans sessiz aralıkta bile su içme davranışının devam etmesidir (31).

2.2.1.7. Lobarinas'ın planlı oluşturulmuş polidipsiden kaçınma yöntemi

Lobarinas ve arkadaşları tarafından geliştirilen otomatik kaçınma tekniğinde davranışsal tepkinin sönümlenmemesi sayesinde tinnitus değerlendirmesi uzun süre devam edebilmektedir. Modelde gıda kısıtlaması olan deney hayvanlarına düzenli aralıklarla az miktarda gıda verilerek yüksek oranda su içme davranışı tetiklenerek polidipsi indüklenmiştir. Su içme davranışının sesle eşleştirme eğitimlerinde 6 denemede rastgele 30 saniye 40 dB SPL dar bant uyaran ya da sessizlik koşulu bulunmaktadır. 6 denemeden birindeki sesli koşulda su içme davranışı olduğunda ayak şoku uygulanarak deney hayvanına sessizlikte su içme davranışı öğretilmektedir. Tinnitus indüklenen deney hayvanı sessiz aralıkta hayali ses duyduğundan eğitimdeki gibi su içme davranışını baskılaması beklenmektedir (32).

2.2.1.8. Heffner'in sesin yerini belirleme yöntemi

Tek taraflı gürültü maruziyeti ile unilateral tinnitus indüklenen deney hayvanlarında tinnitus varlığının değerlendirilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Öncelikli olarak deney hayvanları farklı yönlerden, kafeste 90 derecelik açıyla deney hayvanının sağından ve solundan, gelen sese koşullandırılmaktadır. Sürekli olarak geniş bant 35 dB SPL artalan gürültüsüne maruz bırakılan deney hayvanına farklı frekanslarda işitme eşiklerinin 20-30 dB üzerinde saf sesler sunulmuştur. Deney hayvanı sunulan saf seslerin yönünde bulunan suluktan su içmesi üzerine eğitilmiştir. Doğru cevaplar su ile ödüllendirilmiş, yanlış cevaplar ise ayak şoku ile negatif pekiştireç ile engellenmiştir. Deney aşamasında ise ortamda ses olmamasına rağmen deney hayvanının tinnitus indüklenmiş kulağı tarafındaki sesli koşul davranışlarını gerçekleştirmesi beklenmektedir (33).

2.2.2. Fizyolojik değerlendirme yöntemleri

Fizyolojik yöntemler, tinnitus ile ilişkili olduğu düşünülen nöral aktivite değişikliklerinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Bu ölçümler elektrofizyolojik olarak, tinnitus indükleyici ajanlarla tedavi edilen hayvanların işitsel merkezlerindeki nöral aktivite

değişikliklerinin doğrudan kaydedilmesiyle elde edilmektedir (Kaltenbach, 2011) (34). Güncel çalışmalarda, aktivite değişiklikleri mikroPET, fMRI, SPECT, DTI gibi nörogörüntüleme teknikleri kullanılarak ölçülmüştür (35,36). Değişiklikler genellikle tinnitus indükleyici madde maruziyetinden önce ve sonra elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla ya da araştırma dizaynında deney ve kontrol grubu hayvanlardan elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla değerlendirilmektedir. Tinnitus, bir dış uyarının yokluğunda ses algılanması olduğundan, fizyolojik değerlendirmede beklenti tinnitusun normalde yalnızca ses mevcut olduğunda meydana gelen aktiviteleri oluşturmastır. En geçerli ve takip edilebilir aktivite, sesle uyarılan aktiviteyi taklit eden spontan nöral ateşleme aktivitesidir. Fizyolojik yöntemlerin avantajları, aktivitedeki değişikliklerin özelliklerinin ne olduğunu ve işitsel sistemin neresinde meydana geldiğini gösterebilmesidir. En büyük dezavantajı ise hayvanların tinnitus yaşadığını doğrudan kanıtlanamamasıdır. Bu nedenle fizyolojik yöntemleri kullanmadan önce davranışsal yöntemler ile hayvanda tinnitus oluşumunun çift aşamalı olarak değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir (37).

Fizyolojik tinnitus değerlendirme yöntemleri odyolojik açıdan da çeşitlendirilebilmektedir. İşitme sisteminin periferik ve santral değerlendirmesinde kullanılan spesifik elektrofizyolojik test yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar; dış tüy hücreleri kaynaklı otoakustik emisyonların (OAE) ve işitsel sistemin sesli bir uyarana verdiği elektriksel yanıtları ölçen işitsel uyarılmış potansiyellerin kayıdır. İşitsel uyarılmış potansiyeller elde edilen cevapların latanslarına göre 3 kategoride incelenmektedir. Bunlar işitme sınırı ile beyin sapı düzeyinde işitme yollarının değerlendirilmesine olanak sağlayan erken latans işitsel beyin sapı cevapları (İBC), talamo-kortikal bölgedeki işitme merkezlerinin değerlendirilmesini sağlayan orta latans cevapları (İng: MLR) ve işitme korteksinin işlevini değerlendiren geç latans kortikal işitsel uyarılmış potansiyellerdir (İng: LLR)(38).

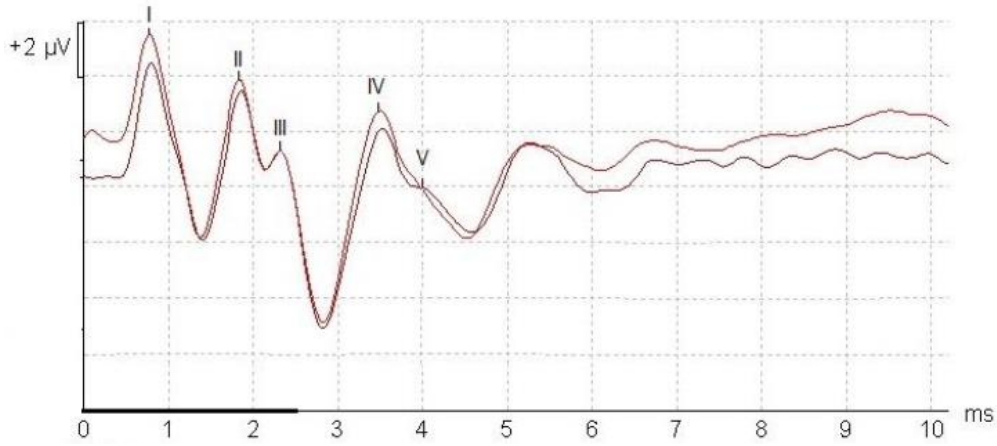
2.2.2.1. İşitsel beyin sapı cevapları

Deney hayvanlarının bireysel farklılıkları, ortama ve teste hazır bulunuşlukları, hormonal ve bilişsel farklılıkları nedeniyle davranışsal değerlendirmelerin, elektrofizyolojik test ve görüntüleme yöntemleriyle desteklenmesi tinnitus varlığı için daha kesin deliller sunmaktadır. Bu elektrofizyolojik test yöntemlerinden biri olan işitsel beyin sapı cevapları ölçümü ile hem insanlarda hem de deney hayvanlarında beyin sapı düzeyine kadar olan işitsel yollar objektif olarak değerlendirilebilmektedir. Özellikle deney hayvanlarında işitsel

yollarda tinnitus kaynaklı meydana gelen değişimlere spesifik yanıtlar verdiği için tinnitus varlığının tespitinde geçerli ve güvenilir olarak kullanılmaktadır (8).

İşitsel beyin sapı cevapları, 3 farklı uyaran kullanılarak kaydedilebilmektedir: klik, *chirp* ve tone-burst. Tone-burst uyaran işitme sistemini frekansa spesifik değerlendirme olanağı sağlayan dar bant tonal uyaranlardır. Ölçüm yapılacak frekanslar araştırma içeriğine göre belirlenebilmektedir. Klik ve *chirp* uyaran ise geniş frekans bantlarını içeren kompleks uyaranlardır. Klik uyaran tüm frekans bantlarını içermesine rağmen, ses dalgası kokleanın apeksine bazal bölgesinden daha geç ulaşır ve bunun sonucunda koklear dalga gecikmesi meydana gelir (39). *Chirp* uyaran ise bazılar membranın tonotopik özelliği dikkate alınarak kokleanın alçak, orta ve yüksek frekans bölgelerini aynı anda uyarmak şeklinde tasarlanmıştır (40). Böylece koklear dalga gecikmesi ortadan kalkmakta, maksimum depolarizasyon sağlanmakta ve klik uyarana kıyasla daha yüksek genlikli V.dalga elde edilmektedir (41,42).

İşitsel beyin sapı cevapları, genellikle bir işitsel uyarandan (örneğin klik ya da ton-burst) sonraki ilk 10 milisaniye içinde ortaya çıkan beş belirgin pozitif tepe noktasından (dalga I, II, III, IV ve V) oluşur (Şekil 2.4) (43). Bu dalgalar hem klinik hem de araştırma alanlarında işitme eşiklerinin belirlenmesi, işitme sisteminin bütünlüğü incelenerek işitsel bozuklukların tanısı ve yenidoğan işitme taramalarında objektif değerlendirme amacıyla kullanılmaktadır. Her bir dalga, işitme yolunun farklı bölgelerindeki nöral aktiviteyi yansıtmakta ve bu tepe noktalarının morfolojisi, işitme sağlığını izlemek için özgün bir imza niteliği taşımaktadır. İnsanlarda elde edilen kayıtlarda I. dalga spiral ganglion ve işitme sinirinden, II. dalga işitme sinirinin distali ve bazı koklear çekirdeklerden, III. dalga süperior olivary kompleksten, IV. dalga lateral lemniscus ve çevresindeki yapılardan, V. dalga ise inferior kollikulus düzeyinden orijin almaktadır (44,45). Kemirgenlerde I. dalga, işitme sinirinden gelen uyarılmış potansiyellerle ilişkilendirilirken, II-V. dalgaların koklear çekirdek, süperior olivary kompleks, lateral lemnisküs, inferior kollikulus ve medial genikülat body gibi merkezi işitsel yapılarla bağlantılı olduğu düşünölmektedir (46,47). Bu sinir jeneratörlerinin oluşturduğu İBC dalgalarının sıçan ve insan arasında farklı konumlandığı düşünölmektedir, örneğin sıçanın II, III ve IV. dalgaları sırasıyla insanlardaki III, IV ve V. dalgalar ile eşleştirilmiştir (48–50).



Şekil 2.4. Sıçanlarda 120 dB SPL ses şiddetinde alınan işitsel beyin sapı cevapları dalgası (Jafarzadeh ve Pourbakht, 2019'dan alınmıştır.)

İBC testinde elde edilen dalgaların amplitüdleri, latansları, dalgalar arası latansları ve amplitüd oranları analiz edilerek işitme sistemi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Dalga amplitüdleri nöral yanıtların gücünü göstermekte olup özellikle I.dalga amplitüdü ve latansı koklear işitme fonksiyonu hakkında önemli veriler sunmaktadır (51,52). V. dalga insanlarda en belirgin şekilde elde edilen, en yüksek amplitüde sahip dalga olması sebebiyle ses şiddeti azalımı doğrultusunda takip edilerek işitme eşiği belirlenmesinde kullanılmaktadır (53,54). İnsanlara kıyasla sıçanlarda II. dalga en yüksek amplitüde sahip en belirgin dalgadır (46). Bu sebeple II. dalga işitme eşiği belirlemek için şiddet-latans fonksiyonu doğrultusunda takip edilmektedir ve II. dalganın gözlemlendiği en düşük ses şiddet seviyesi işitme eşiği olarak kabul edilmektedir. Ek olarak hem sıçanlarda hem de insanlarda I. dalga latans ve amplitüdünün, iç tüy hücreleri ile işitme sinir lifleri arasındaki sinaptik bağlantıdaki etkilenimlere bağlı gelişen koklear sinaptopatiye dair kanıtlar sunabilmesi sebebiyle tinnitus kaynaklı koklear etkilenim hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir (55–57).

Sıçanlarda sodyum salisilat ile indüklenen tinnitusta İBC testi sonuçlarında meydana gelebilecek değişimler aşağıdaki şekilde maddelenebilmektedir;

- İşitme eşiklerinde artış dolayısıyla işitsel duyarlılıkta azalma II. Dalga takibiyle görülebilmektedir (7,58,59).
- İşitme siniri aktivitesinde düşüşle beraber I.dalga amplitüdünde azalma gözlenebilmektedir (7,8).
- II, III ve IV.dalga gibi santral işitme sistemi bölgelerinden orijin aldığı düşünülen dalgalarda amplitüd artışı görülebilmekte ve bu artışın merkezi

işitme sistemi hiperaktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (7,8,60,61).

- Tone-burst uyaran ile yapılan değerlendirmelerde özellikle yüksek frekanslarda dalga ve dalgalar arası latanslarda uzama olabileceği bildirilmiştir (7,62,63).

Literatürde deney hayvanlarında salisilat ile indüklenmiş tinnitus varlığının tespitinde İBC testinin kullanıldığı çalışmalarda tone burst uyaran tercih edilmiştir (20,64,65). Özellikle işitme eşiği değerlendirmesi yapıldığı durumlarda tone-burst uyaranla 4,8,16 ve 32 kHz gibi farklı frekanslarda ölçümlere ek olarak farklı şiddetlerdeki ölçümlerin de eklenmesi ile test süresi fazlasıyla uzamaktadır. Sürenin uzamasıyla birlikte deney hayvanına ölçüm için uygulanacak anestezi miktarı ve stres faktörleri artmaktadır, bu anlamda klik veya *chirp* uyaran kullanımının süre açısından avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Frekansa spesifik değerlendirmeye ihtiyaç olmadığı durumlarda, kokleayı uyarma şekli sebebiyle insanlarda İBC'ye bakılması gereken klinik değerlendirmelerde daha yüksek amplitüdlü dalgalar gözlenmesi ve ölçüm süresinin kısa olması sebebiyle tercih edilen *chirp* uyaranın, deney hayvanı araştırmalarında çok sık kullanılmadığı görülmüştür. Özellikle son yıllara kadar yapılan salisilat ile deney hayvanı tinnitus modeli çalışmalarında tinnitus değerlendirmede *chirp* ve klik uyaran kullanımının farkını veya önemini gösteren bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (23/24) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklendi (DA23/25). Araştırmada kullanılan hayvanların tümü Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve çalışmanın tüm deneysel aşamaları yine aynı merkezde yürütüldü. Deneysel bütün prosedürler, deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların bakımı ve kullanımı ile ilgili yasa ve yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Araştırmaya Dahil Edilecek Deney Hayvanlarının Seçimi

Araştırma 24 adet, 5 aylık (250-300 gr), erkek, Sprague-Dawley cinsi sıçan ile gerçekleştirildi. Sprague-Dawley cinsi işitme sistemlerinin insan yapısına benzerliği, tinnitus modelleme çalışmalarında sıklıkla çalışılmış olması, diğer sıçan cinslerine göre nispeten sakin ve uyumlu bir yapısı olması nedeniyle tercih edildi. Hayvanlar her bir kafeste 8 adet olacak şekilde, 21 ± 2 santigrat derece sıcaklıkta, 12 saatlik gece/gündüz döngüsünde barındırıldı. Hayvanların yem ve suya ulaşımı *ad libitum* koşullarda sağlandı.

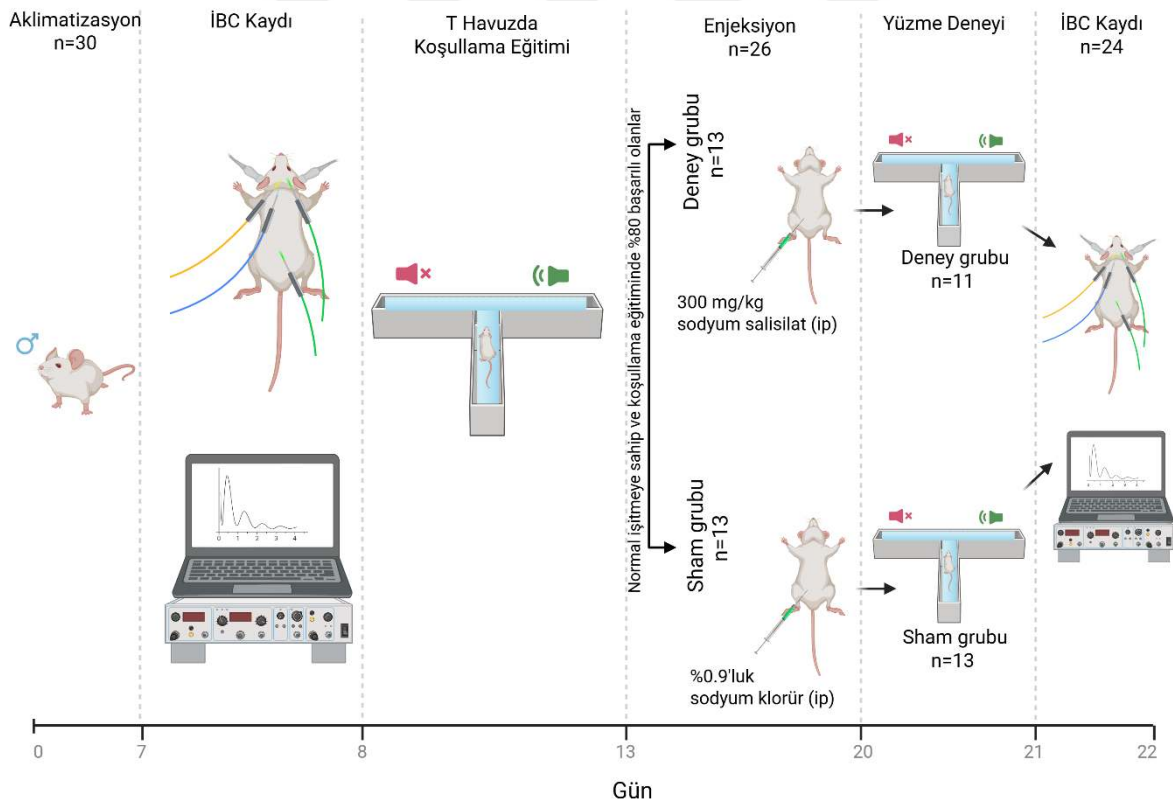
Araştırmada Başkent Üniversitesi İstatistik Danışmanlık ve Araştırma Merkezi (BUİSTDAM) tarafından 'Kaynak Denklemi-Resource Equation' yöntemi kullanılarak hesaplanan örneklem büyüklüğü esas alındı. Deney hayvanı çalışmalarında çalışmada kullanılacak örneklem sayısı azaltmak için sıklıkla kullanılan bir hesaplama yöntemi olan "Kaynak Denklemi-Resource Equation", azalan getiri yasasına göre, "E= Toplam denek sayısı – Toplam grup sayısı" olup, E'yi 10 ila 20 arasında tutan herhangi bir örneklem büyüklüğü yeterli olarak kabul edilmektedir (66). Çalışmamızda *sham* kontrol grubu hariç 1 deney grup olması planlandığından E formülüne göre çalışmaya her bir grupta en az 13 deney hayvanı alınması planlandı. Dolayısı ile $E=1 \times 13-1 = 12$ 'dir. Hayvana yapılacak uygulamalar ve çalışma süresi göz önüne alınarak her bir gruba 1 yedek hayvan daha eklenmesi uygun görüldü ve *sham* ve deney grubunda 13'er hayvan olacak şekilde bir planlama yapıldı.

Deneye katılacak hayvanların normal işitmeye sahip olmaları ve sesli/sessiz ortama koşullandırma eğitiminde en az %80 oranında başarılı olmaları deneye dahil edilme kriterleri olarak belirlendi. Bu kriterlere uymayanlar çalışma dışı bırakıldı. Toplam 26 olarak

hesaplanan örneklem sayısı sağlıklı işitmeye sahip ve koşullandırma deneylerinde %80 oranında başarılı olanlar arasından seçileceğinden deneye 30 hayvan ile başlandı.

Sıçanlar 2 aylık iken yapılan İBC değerlendirmesiyle, normal işitmeye sahip olduğu tespit edilen sıçanlar diğerlerinden ayrı bir odada bakıma alınarak işitme sistemi gürültü maruziyeti kaynaklı hasarlara karşı kontrol altında tutuldu. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 1 hafta önce deney ortamına alışmaları için deneyin yapılacağı laboratuvara getirildi. İşitmesi normal olan ve sesli/sessiz ortam koşullandırma eğitiminde en az %80 oranında başarılı olan sıçanlar içerisinde 26 adet hayvan seçilerek eşit sayıda ve rastgele olacak şekilde *sham* ve deney grubuna ayrıldı. Randomizasyon GraphPad Rastgele Numara atayıcısı (Random Number Calculator) programı kullanılarak yapıldı. Çalışma planı Şekil 3.1’de gösterildi.

Deneye dahil olacak sıçanların seçimi sonrasında, dahil olmayan 4 sıçanın 15 günlük karantina döneminden sonra sağlıklı hayvanların yanına alınarak yaşamlarına devam etmesi sağlandı.



Şekil 3.1. Deney planı

3.2. T Havuzda Koşullama Eğitimi

Tinnitus varlığının davranışsal değerlendirmesi için Guitton ve ark. tarafından 2007 yılında (30) tanımlanan yöntem esas alınarak T havuzda sesli ve sessiz ortamda şartlandırma eğitimi verildi. Yapılan ön deneylerde sese koşullanma açısından 5 günlük eğitimin daha verimli sonuç vermesi sebebiyle Guitton ve arkadaşlarının (30) yöntemi 5 gün, günde 16 seans olacak şekilde modifiye edildi.

Deney öncesinde koşullama eğitimi için, sonrasında da sodyum salisilat uygulamasını takiben tinnitus varlığının değerlendirilmesi için kullanılan T havuzun başlangıç kolu 65x15x60 cm, sağ ve sol kolları 44x15x60 cm olacak şekilde siyah renk plexiglass malzemeden yaptırıldı (Şekil 3.2). Ayrıca deney koşuluna göre yeri değiştirilebilecek şekilde, T havuzun kollarına koymak üzere 23 cm yüksekliğinde, 12 cm çapında siyah renkli, harici bir platform imal edildi. Havuzun başlangıç koluna hayvanların yüzmeye başlatılacağı sürgülü bir kapı eklendi. Yüksekliği 60 cm olan havuza 24 cm yüksekliğinde su doldurularak suyun sıcaklığı 21 ± 2 santigrat dereceye ayarlandı. Havuzun bulunduğu oda eğitim ve deneyler süresince yerden loş ışık veren sabit bir ışık kaynağıyla aydınlatıldı.



Şekil 3.2. T havuz

Koşullama için, sıçanlar 5 günlük eğitime tabi tutuldu. Eğitim, deney hayvanının sudan çıkmak için platformu araması esas alınarak, ortamda ses olduğunda havuzun sesle ilişkilendirilen koluna (sesli kol) yerleştirilen platforma yönelmesi, ses olmadığında da

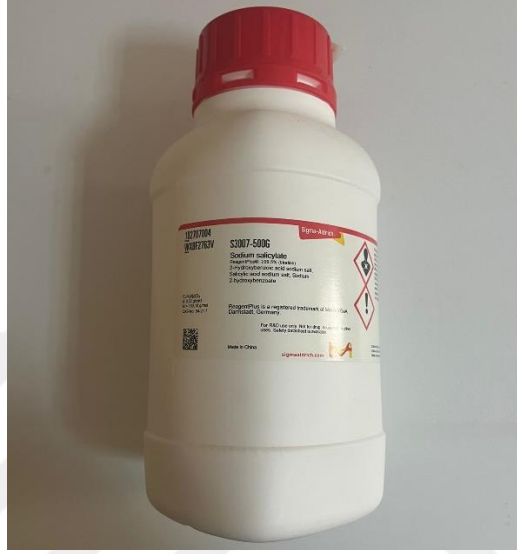
havuzun sessizlikle ilişkilendirilen koluna (sessiz kol) yerleştirilen platforma yönelmesi esasına dayanmaktadır. Her bir sıçan 5 ardışık gün boyunca her seferinde sırasıyla 4 sesli, 4 sessiz, 4 sesli ve en son yine 4 sessiz olmak üzere günde 16 seans eğitime tabi tutuldu. Sesli koşullama için, 6 kHz 65 dB SPL geniş bant uyaran, havuz düzeneğinin 150 cm yukarısından, serbest alan hoparlörü (JBL marka, 10Hz-20kHz frekans aralığı) aracılığıyla sunuldu. Sessiz koşulda da hoparlör ses verilmeden aynı yerinde asılı tutuldu. Ses seviyesi ölçme cihazı (Brüel&Kjær, Type 2250, Danimarka) ile eğitim ve deney sırasındaki ortam gürültüsü ve harici hoparlörden çıkan ses seviyeleri de ölçülerek deneyin ses kontrollü bir ortamda yapılması sağlandı.

Her bir seans, deney hayvanının başlangıç kolunda sürgülü kapı ile sınırlandırılmış alana bırakılması ile başladı. Deney hayvanı başlangıç koluna bırakıldıktan 3 saniye sonra sürgülü kapı araştırmacı tarafından kaldırıldı. Yüzerek sağ veya sol kolda ilerleyen sıçanın platformu bulduğunda 30 saniye boyunca platformun üzerinde kalmasına izin verildi ve süre sonunda başlangıç koluna yeniden alınarak yeni seansa başlandı. Sesli koşulda deney hayvanı başlangıç koluna bırakıldığı an ses gönderilmeye başlandı ve sıçan platforma ulaştıktan sonra 25 saniye daha ses gönderilmeye devam edildi. Şartlama eğitiminde sesli ve sessiz koşullar arasında ara verilmeden yalnızca uzaktan kontrol ile hoparlördeki ses açıp kapatılarak devam edildi. Son seansın bitiminde deney hayvanı, kuruması için içinde kuru bir bez olan ve ısıtılmış bir kafeste bekletildikten sonra kendi kafesine alındı. Diğer sıçanlar koşullama sırasında verilen sesteki etkilenmemeleri için deney ortamının dışında sessiz bir ortamda kendi kafeslerinde bekletildi. 16 seans toplamında deney hayvanının doğru kolda geçirdiği süre deney düzeneğinin 150 cm üzerindeki harici kamera ile kaydedildi. Hayvanların bireysel yön tercihlerinin araştırma sonuçlarını etkilememesi için her 5 hayvanda bir sesli koşuldaki platform yönü değiştirildi. Beş günlük eğitim sonunda doğru kolda geçirilen süre ortalaması %80'in üzerinde olduğunda koşullanma sağlandığı kabul edildi (30). Sesli ve sessiz ortam koşullanması sağlandığı belirlenen hayvanlardan 26 tanesi ile deneye devam edildi.

3.3. Tinnitus Modeli Oluşturulması

Beş günlük koşullandırma eğitiminde başarılı olan hayvanlar GraphPad Dotmatics randomizasyon programına göre her birinde 13 sıçanın bulunduğu toplam iki gruba ayrıldı. İlk grup salisilat ile indüklenmiş tinnitus varlığının değerlendirildiği salisilat grubu, diğer grup ise *sham* grubu olarak etiketlendi. Deney grubundaki 13 hayvana 6 ardışık gün boyunca

intraperitoneal yolla 1 ml %0,9 sodyum klorür (NaCl) solüsyonu ile çözdürülen 300 mg/kg sodyum salisilat (Sigma Aldrich, ReagentPlus®, S3007, Amerika) enjeksiyonu yapıldı (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). *Sham* grubunda olanlara ise yine 6 ardışık gün boyunca intraperitoneal yolla, günde 1 ml %0.9 NaCl solüsyonu enjeksiyonu yapıldı. Sodyum salisilat enjeksiyonunun 3. gününde ve enjeksiyonların bittikten sonraki 2. günde deney grubunda 2 hayvan ölümü gerçekleşti. Çalışmaya, deney grubunda 11 hayvan, *sham* grubunda 13 hayvan ile devam edildi.



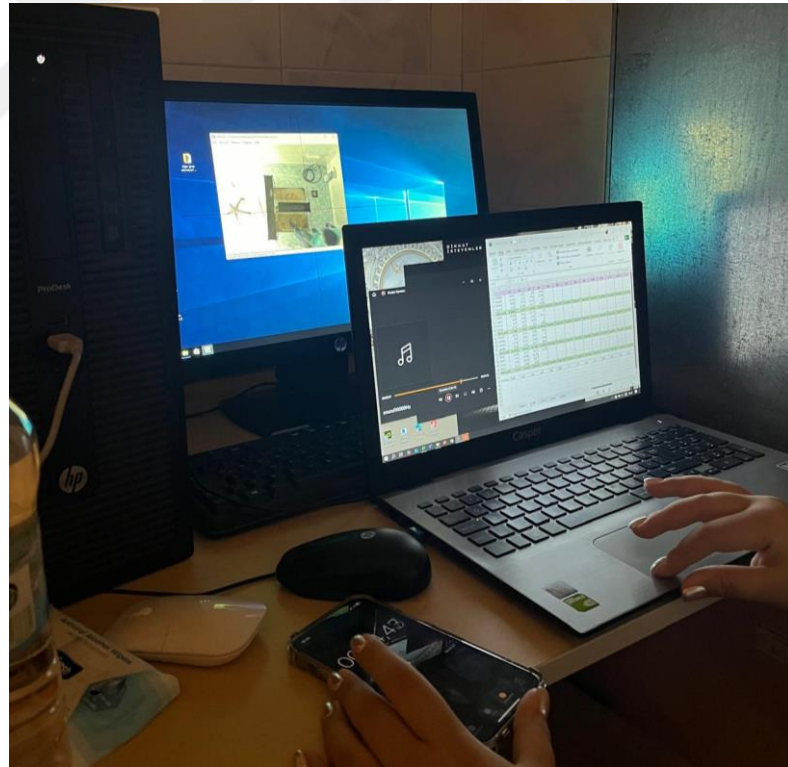
Şekil 3.3. Sodyum salisilat



Şekil 3.4. İntraperitoneal enjeksiyon

3.4. T Havuz ile Tinnitus Varlığının Gösterilmesi

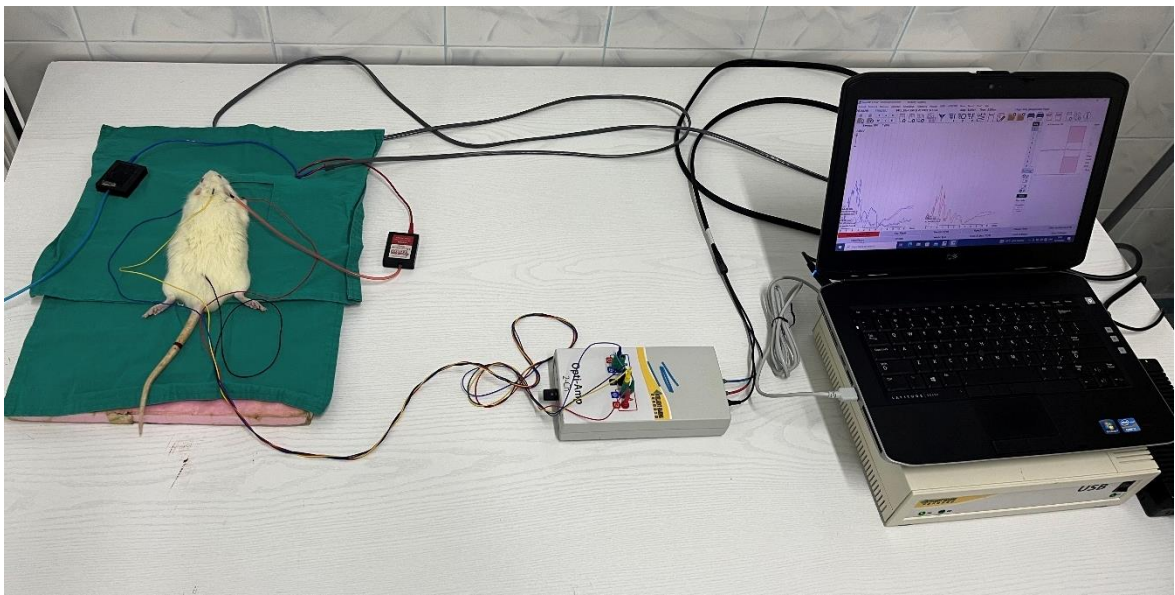
Araştırma gruplarındaki tüm sıçanlar, son enjeksiyondan 1 gün sonra, tinnitus oluşup oluşmadığını değerlendirmek üzere eğitim gördükleri T havuzda, çevresel ses verilmeden ve platform yerleştirilmeden yüzdürüldü. Tinnitusu olan hayvanların test sırasında platform bulunmasa dahi daha önceki koşullandırma eğitimindeki sesli koşulda olduğu gibi platformu sanki çevresel ses varmış gibi sesli kolda aramaları ve sesli kolda daha uzun süre geçirmeleri beklenmektedir (30). Bunun için, deney hayvanı T havuzun başlangıç koluna bırakıldıktan 3 saniye sonra kapı açıldı ve deney hayvanı 100 saniye boyunca izlendi. Başlangıç koluna bırakılan deney hayvanlarının ilk 50 sn ve son 50 sn’de en çok zaman geçirdikleri kol bilgisi harici kamera aracılığı ile kayıt altına alındı (Şekil 3.5). 100 saniyenin sonunda deney hayvanı kuruması sağlandıktan sonra kendi kafesine alındı. Test aşaması eğitim sürecinden farklı olarak tek seferde, tek deneme şeklinde uygulandı. Deney hayvanının çevresel verilerden referans almasının önüne geçmek amacıyla kamera ve hoparlör gibi ekipmanlar eğitim sırasındaki düzeneğe aynı şekilde yerleştirildi.



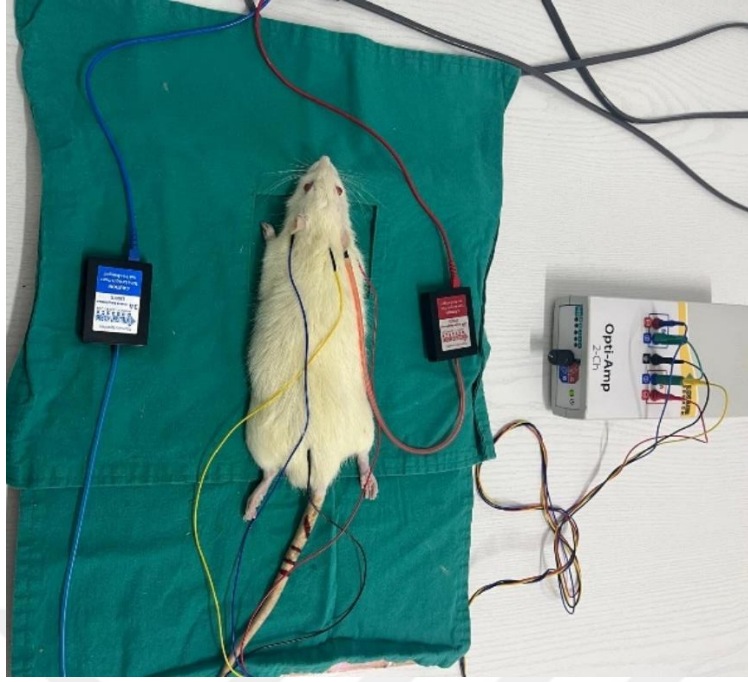
Şekil 3.5. Yüzme deneyi izleme ve kayıt düzeneği

3.5. İşitsel Beyin Sapı Cevapları Kaydı

Tüm sıçanların T havuzda koşullama eğitimi öncesinde ve son enjeksiyon gününü takiben yapılan davranış testi sonrasında olmak üzere toplamda iki kez İBC'leri kaydedildi. İBC kaydı öncesinde sıçanlara 60 mg/kg ketamin (Keta-Control, Doğa İlaç, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine (Control %10, Doğa İlaç, İstanbul) karışımı intraperitoneal olarak uygulanarak genel anestezi altında kayıt yapıldı. Deney hayvanlarının anestezi sırasında vücut ısılarının düşmesini engellemek amacıyla altlarına ısıtma pedi koyuldu ve ped ayarı 37 C'ye ayarlandı. İBC kaydı için Intellegent Hearing System (IHS, Inc., Miami, FL, USA) cihaz ile deney hayvanlarının sağ ve sol kulak işitme dalgaları kaydedildi (Şekil 3.6). Ölçümde 27.7 rate, alterne polarite klik ve *A-chirp* uyararı kullanıldı. Uyarılar sırasıyla 80 ve 20 dB nHL ses şiddetinde, 3M-Ear Link kulak içi kulaklık ile sunuldu. Analiz penceresi 12 ms'ye ayarlanarak 2000 sweep örneklem alındı. Ölçümde deney hayvanları için üretilmiş subdermal iğne elektrot yerleşim dizaynı kullanıldı (43,67). Bu doğrultuda pozitif (inverting) elektrot vertekse, negatif (non inverting) elektrotlar sağ ve sol kulak mastoid bölgesine, toprak elektrot ise sırt bölgesinde kuyruğa yakın şekilde orta hatta yerleştirildi (Şekil 3.7). Elektrotların impedansları 3 kohm'un altında olduğunda kayda başlandı. İBC kaydında test edilen her ses şiddetinde çift dalga kaydı alınarak I-II-III-IV-V. mutlak dalga latansları ve amplitüdlere incelendi. İşitme eşiğinin belirlenmesi için 20 dB nHL ses şiddetinde II. dalga takibi yapıldı. Cevap artefaktının örneklem sayısının yüzde 10'undan az olmasına dikkat edildi.



Şekil 3.6. Beyin sapı cevapları kaydı için ölçüm ortamı



Şekil 3.7. Sıçanda İBC kaydında kontralateral elektrot ve kulaklık yerleşimi

Sham grubuyla yapılacak karşılaştırmalar, yapılacak olan yüzme denemelerinin ve intraperitoneal uygulamaların strese neden olarak tinnitus yaratma potansiyelinin olup olmadığının gösterilmesi için ve oluşturulması planlanan tinnitus semptomlarının oluşturduğu dalgaların interfere edilip edilmediğini göstermek açısından önemlidir. Sodyum salisilatın işitme kaybı ve tinnitus etkisinin geçici olması ve yapılacak değerlendirmelerin deney hayvanında kalıcı hasar oluşturmaması sebebiyle, literatürde 15 gün sonra hayvanların normale döndüğü bildirimleri bulunmakla birlikte, bu süre uzatılarak son İBC ölçümünden itibaren hayvanların karantinaya alınarak 30 gün sonra gündelik yaşamlarına geri dönmesi sağlandı (14,15).

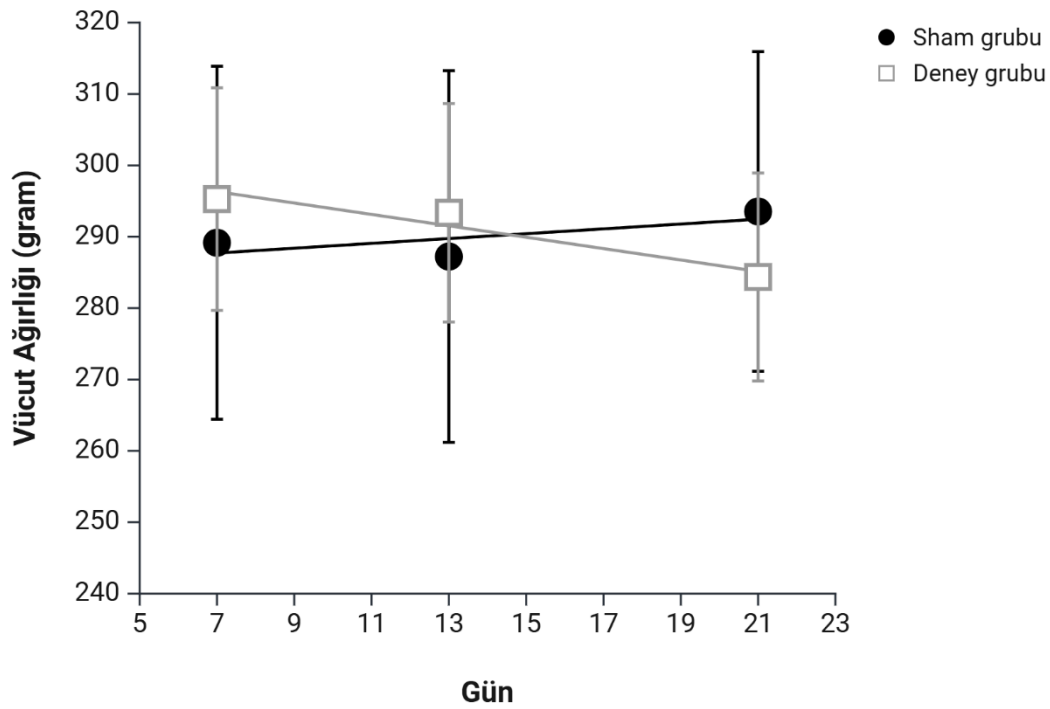
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen beyin sapı cevapları dalga latans ve amplitüdlere hem deney grubu hem de *sham* grubu için enjeksiyonların öncesinde ve sonrasında gruplar arası ikili olarak karşılaştırıldı. Deney süresince ağırlık değişimlerini incelemek için grup içi ve gruplar arası zamansal karşılaştırma yapıldı. Araştırma verilerinin analizinde normal parametrik olmayan iki grup ortalama karşılaştırma testi “Mann Whitney U testi” ve çoklu değişken karşılaştırmalarında tekrarlayan ölçümlerde ‘Tek yönlü ANOVA’ testi kullanıldı. Tüm hipotez testlerinde I. Tip hata olasılığı $\alpha=0,05$ olarak alındı ve istatistiksel değerlendirmeler için SPSS v25.0 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Değişimleri

Deney ve *sham* grubunun deney başında, enjeksiyon öncesinde ve deney sonunda ölçülen vücut ağırlıkları kıyaslandığında gruplar arasında ağırlık bakımından anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Ancak ağırlık bakımından gruplar arasında anlamlı farklılıklar olmamasına rağmen deney grubu zamanla ağırlık kaybı yaşarken, *sham* grubunda ağırlıkta artış meydana geldi. Gruplar arasındaki bu zamanla ağırlık değişimi anlamlı farklılık gösterdi ($F=4,780$, $p=0,026$) (Şekil 4.1).



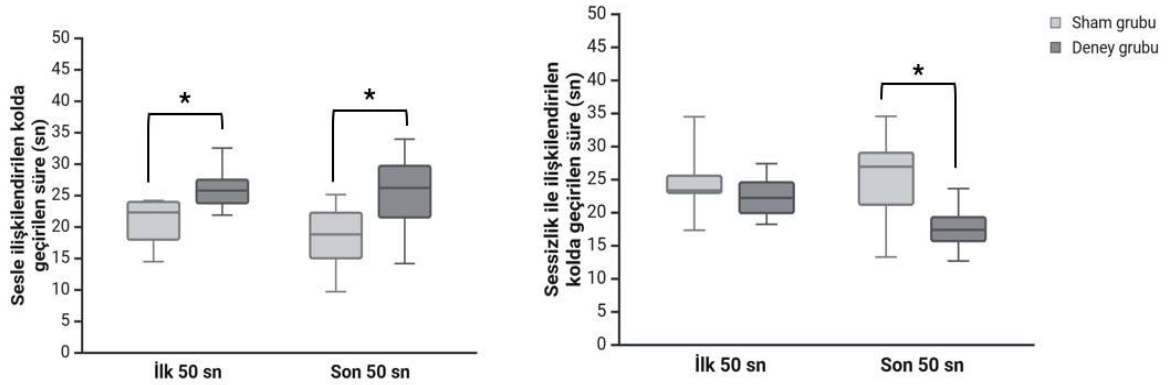
Şekil 4.1. Sham ve deney grubunda günlere göre ağırlık değişimi.

Tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü ANOVA analizi, Ortalama±Standart Sapma

4.2. T Havuz Testi Sonuçları

T havuz testinde deney gruplarındaki sıçanların toplamda 100 saniye boyunca sesli ve sessiz kolda durma süreleri ve ilk tercih ettikleri kol farklılığı karşılaştırıldı (Şekil 4.2). Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre, ilk 50 saniyede sesli kolda geçirilen süre *sham* ve deney grupları arasında anlamlı fark gösterdi ($U=21,50$; $Z=-2,897$; $p=0,002$). Benzer şekilde, son 50 saniyede sesli ($U=32,50$; $Z=-2,260$; $p=0,022$) ve sessiz kolda geçirilen süre ($U=26,00$;

Z=-2,636; p=0,007) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi. Buna karşın, ilk 50 saniyede sessiz kolda geçirilen süre bazında anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).



Şekil 4.2. Sham ve deney gruplarının yüzme deneyi sırasında T havuzda geçirdiği süreler.

Mann-Whitney U analizi, *p<0.05

4.3. İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalgaları

4.3.1. Dalga latansları

Deney başlangıcında 80 dB nHL’de klik ve *chirp* uyaran ile alınan İBC kaydında I, II, III, IV ve V.dalga latansları gruplar arasında sağ ve sol kulakta anlamlı fark göstermedi (p>0,05). Deney sonunda klik ve *chirp* uyaran kullanılarak 80 dB nHL’de alınan sağ ve sol kulak İBC kaydında da iki grup arasında dalga latanslarında anlamlı fark görülmedi (p>0,05) (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Hem deney başlangıcında hem de deney sonunda II.dalga takibi yapılarak, 20 dB nHL şiddetinde işitme eşiği elde edildi.

Tablo 4.1. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sağ kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga latansları (ms)

İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalga Latansları						
		I.dalga	II.dalga	III.dalga	IV.dalga	V.dalga
		Medyan	Medyan	Medyan	Medyan	Medyan
		(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)
Sham grubu	Klik uyaran	1,2 0,93-1,73	2,25 1,9-2,58	3,25 2,4-3,45	3,88 3,3-4,1	4,8 4,1-4,88
	Chirp uyaran	1,43 1,05-1,75	2,33 2,15-2,95	3,2 2,63-3,65	1,08 3,6-4,55	5,08 4,42-5,78
Deney grubu	Klik uyaran	1,02 0,93-1,85	2,38 1,9-2,58	3,27 2,4-3,42	3,92 3,25-4,05	4,08 4,10-5
	Chirp uyaran	1,4 1,07-1,8	2,38 2,15-2,88	3,2 2,63-3,58	3,92 3,5-4,6	4,09 4,42-5,83
P değeri	Klik uyaran	p=0,167	p=0,459	p=0,608	p=0,207	p=0,608
	Chirp uyaran	p=0,649	p=1,00	p=0,832	p=0,531	p=0,569

Mann-Whitney U analizi, p<0,05
Min-max: minimum-maksimum

Tablo 4.2. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sol kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga latansları (ms)

İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalga Latansları						
		I.dalga	II.dalga	III.dalga	IV.dalga	V.dalga
		Medyan	Medyan	Medyan	Medyan	Medyan
		(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)
Sham grubu	Klik uyaran	1,15 0,9-1,75	2,23 2,00-2,65	3,20 2,5-3,52	3,90 3,3-4,03	4,78 3,95-5,15
	Chirp uyaran	1,32 1,02-1,80	2,58 2,05-2,88	3,17 2,65-3,75	4,03 3,52-4,67	5 4,42-5,60
Deney grubu	Klik uyaran	1,13 0,95-1,73	2,17 2,0-2,58	3,25 2,5-3,5	3,92 3,3-4	4,83 4,2-4,95
	Chirp uyaran	1,38 1,02-1,65	2,3 2,05-2,88	3,42 2,65-3,83	3,92 3,5-4,67	4,75 4,42-5,55
P değeri	Klik uyaran	p=0,910	p=0,733	p=0,649	p=0,955	p=0,776
	Chirp uyaran	p=0,649	p=0,424	p=0,955	p=0,691	p=0,392

Mann-Whitney U analizi, p<0,05
Min-max: minimum-maksimum

4.3.2. Dalga amplitüdleri

Deney başlangıcında ve sonunda, sağ kulaktan hem klik uyaran hem de *chirp* uyaran ile 80 dB nHL’de alınan I, II, III, IV ve V. dalga amplitüdleri karşılaştırıldı. Deney öncesi alınan kayıtlarda *sham* ve deney gruplarında sağ kulak dalga amplitüdleri her iki uyaran için de farklılık göstermedi ($p>0,05$). Sodyum salisilat enjeksiyonunu takiben deney sonunda klik uyaran kullanılarak alınan kayıta sağ kulak II ve III. dalga amplitüdleri ($U=20,50$, $Z=-2,955$ $p=0,002$; $U=22,50$, $Z=-2,841$, $p=0,003$) deney grubunda anlamlı şekilde yüksek elde edildi. Sağ kulakta klik uyaran kullanılarak alınan I, IV ve V. dalga amplitüdleri anlamlı fark göstermedi ($p>0,05$). *Chirp* uyaran ile alınan sağ kulak kayıtlarında hiçbir dalgada amplitüd farklılığı görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sağ kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga amplitüdleri (μV)

İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalga Amplitüdleri						
		I.dalga	II.dalga	III.dalga	IV.dalga	V.dalga
		Medyan	Medyan	Medyan	Medyan	Medyan
		(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)
Sham grubu	Klik uyaran	3,95	2,42 ^x	0,99 ^x	1,35	0,89
		0,99-7,28	0,68-5,10	0,32-1,87	0,21-2,6	0,40-2,02
	Chirp uyaran	2,09	0,89	0,58	0,56	0,25
		0,78-4,6	0,15-2,07	0,41-1,16	0,13-1,88	0,13-1,18
Deney grubu	Klik uyaran	5,6	4,86 ^y	2,13 ^y	1,53	1,12
		1,06-1,51	2,55-7,89	0,68-3,19	1,05-2,63	0,33-2,52
	Chirp uyaran	1,91	1,23	0,88	0,75	0,41
		0,35-2,97	0,29-1,91	0,35-1,03	0,39-1,72	0,18-0,95
P değeri	Klik uyaran	$p=0,494$	$p=0,002$	$p=0,003$	$p=0,459$	$p=0,649$
	Chirp uyaran	$p=0,424$	$p=0,228$	$p=0,055$	$p=0,392$	$p=0,082$

x,y: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (Mann-Whitney U testi)
Min-max: minimum-maksimum

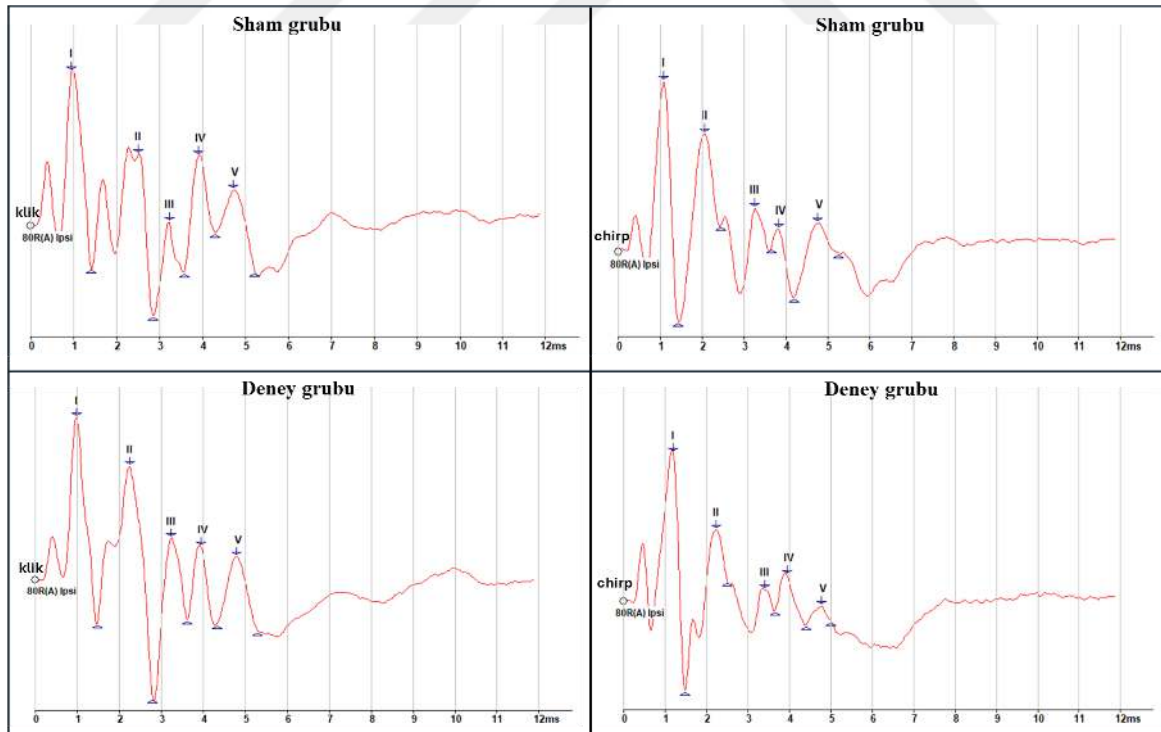
Deney başlangıcı ve sonunda sol kulaktan klik ve *chirp* uyaran kullanılarak 80 dB nHL’de alınan İBC kaydında hiçbir dalga amplitüdü gruplar arasında anlamlı fark göstermedi ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Sham ve deney gruplarında deney sonunda alınan sol kulak işitsel beyin sapı cevapları dalga amplitüdleri (μV)

		İşitsel Beyin Sapı Cevapları Dalga Amplitüdleri				
		I.dalga	II.dalga	III.dalga	IV.dalga	V.dalga
		Medyan	Medyan	Medyan	Medyan	Medyan
		(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)	(Min-max)
Sham grubu	Klik uyarı	2,98	1,23	1,38	1,36	2,08
		1,65-6,97	1,03-7,02	0,22-3,68	0,56-3,14	0,24-3,58
	Chirp uyarı	2,08	1,29	0,67	0,61	0,40
		1,10-4,52	0,49-3,23	0,21-2,31	0,24-2,10	0,04-1,17
Deney grubu	Klik uyarı	5,08	3,56	2,41	2,06	1,21
		1,48-8,05	1,37-6,19	0,2-4,14	1,35-3,18	0,28-1,71
	Chirp uyarı	1,90	1,32	0,92	0,61	0,55
		0,57-3,36	0,64-3,17	0,29-2,54	0,21-1,47	0,24-1,03
P değeri	Klik uyarı	p=0,303	p=0,150	p=0,392	p=0,055	p=0,569
	Chirp uyarı	p=0,691	p=0,691	p=0,424	p=0,955	p=0,691

Mann-Whitney U analizi, $p < 0,05$

Min-max: minimum-maksimum



Şekil 4.3. Deney sonunda sham ve deney grubundan klik ve chirp uyarı ile sağ kulaktan alınan işitsel beyin sapı cevapları dalga kayıt örnekleri.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sıçanlarda sodyum salisilat ile indüklenen tinnitus modeli davranışsal ve elektrofizyolojik olarak değerlendirildi ve daha önce bu modelde kullanılmamış olan klik ve *chirp* uyarının İBC'ye etkileri incelendi. Aynı zamanda, çalışma metodu daha önce yapılan çalışmalardan yararlanılarak modifiye edildi ve daha sonra bu konuda yapacağımız çalışmaların temelini oluşturacak şekilde standardize edildi. Bu şekilde hem bölümümüze hem de Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yürütülecek diğer araştırmalar için deneysel bir model kazandırıldı.

Sodyum salisilat enjeksiyonunun oluşturabileceği metabolik stres nedeniyle ağırlık değişimleri ve bazı sistemik etkiler bildirilmektedir (11,12). Deneysel olarak işitme sisteminde meydana gelen hasarlar ağırlık kaybı ve ölüme neden olabilir. Sodyum salisilatın yarattığı tinnitus sebebiyle oluşan stres de hayvanlarda ağırlık kaybına sebep olabilmektedir. Kellerhals ve Zogg (68), gürültü ve sodyum salisilat kaynaklı tinnitusun yarattığı stres nedeniyle sıçanlarda minimal ağırlık kaybı gözlemlendiği bildirmiştir. Araştırmamızda kullanılan sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişim, özellikle deney grubunda giderek azalan bir grafik çizse de deney sonunda *sham* grubuna kıyasla anlamlı farklılık göstermedi. İstatistiksel olmasa da bir miktar gözlenen bu ağırlık kaybının daha önceki çalışmalarda olduğu gibi tinnitus kaynaklı stres nedeniyle oluşabildiğini düşünmekteyiz. Salisilat toksisitesinin farklı metabolik etkilerinin olabileceği bildirilse de sodyum salisilat enjeksiyonunun sıçanlarda ani ağırlık kayıplarına sebep olmaması, vücut ağırlığındaki azalmanın da kontrole göre farklı olmaması sodyum salisilatın işitme sistemi harici olası sistemik etkilerinin minimum düzeyde olduğunu düşündürmektedir.

Yüksek dozda sodyum salisilat uygulaması, geçici işitme kaybı ve geri dönüşümlü tinnitus gibi ototoksik etkiler yaratabilir. Bu etkiler, salisilatın hem koklear hem de santral sinir sistemi üzerindeki doğrudan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Ancak bu etkiler kullanılan sodyum salisilat dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Literatürde sıçanlarda tinnitus oluşumu için kullanılan sodyum salisilat dozu 150- 400 mg/kg arasında değişmektedir (24,69). Aynı zamanda salisilatın uygulama süresinin de literatürde 1 gün ile 7 gün arasında değiştiği hatta aralıklı uygulamalar ile 3 haftaya kadar uzatılabildiği gözlemlenmiştir (37,60,64). Çalışmamızda bu dozlar ve süreler esas alınarak yapılan ön çalışmalar sonucu en iyi sonuca 6 gün boyunca art arda uygulanan ip 300 mg/kg sodyum salisilat enjeksiyonu ile ulaşıldı.

Sodyum salisilat enjeksiyonu sonrasında tinnitus varlığını değerlendirmek için uygulanan davranış deneyi sonunda, deney grubundaki sıçanlar Guitton ve ark.(30)'nın çalışmasına benzer olarak ilk ve son 50 saniyede sesle ilişkilendirilen kolda daha uzun süre geçirdiler. Bununla orantılı olarak *sham* grubundaki sıçanların tinnitüsü olmadığı için sessizlik ile ilişkilendirilen kolda daha uzun süre geçirmesi beklendi. *Sham* grubu son 50 saniyede sessiz kolda daha uzun süre geçirerek beklentiyi karşıladı ancak ilk 50 saniyede sessiz kolda daha uzun süre geçirmesine rağmen anlamlı fark gözlenmedi. Bunun nedeni de ilk 50 saniyede sessiz kolda geçirilen süre için elde edilen değerlerin min-max aralıklarının çok geniş olmasına bağlanabilir. Yapılan çekimler incelendiğinde *sham* grubundaki bazı sıçanların herhangi bir kola yönelmeden orta hatta uzun süre bekleyerek bekleme süresini uzattıkları görüldü.

Deney grubundaki sıçanların test aşamasında platform bulunmamasına rağmen daha önce sesli koşulla ilişkilendirilen kolda daha uzun süre geçirmesi, tinnitus varlığının davranışsal düzeyde kanıtı olarak değerlendirildi. Bu bulgu, Guitton'un modelinde öngörülen fantom ses algısının koşullu öğrenme ile birleşerek davranışa dönüştüğü varsayımını doğrular niteliktedir. Benzer şekilde, Liu ve arkadaşları (61) da Turner ve arkadaşlarının (29) yönteminden yola çıkarak yaptıkları davranış değerlendirmesi ile tinnitus varlığında hayvanın sessizlik aralığını fark edemediğini göstermişlerdir. Rüttiger ve arkadaşları (31) da farklı koşullandırma modelleriyle tinnitus varlığını gösteren çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, Guitton'un su labirenti modelinin en önemli avantajı, hayvana herhangi bir açlık, susuzluk veya aversif uyarı (örneğin, ayak şoku) uygulanmadan sadece yönelimsel davranışlara dayalı bir ölçüm sunmasıdır. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan davranış modeli ile hem hayvan refahına duyarlı hem de öğrenilmiş davranışlar temelinde tinnitüsün değerlendirilmesini sağlayan bir metot ortaya konulmuştur.

Tinnitus varlığının değerlendirmesinde davranış modelini desteklemek üzere İBC kaydı alınarak I-V. dalga latans ve amplitüdüleri de değerlendirildi. Literatürde sodyum salisilat ile indüklenen tinnitus modelinde OAE ile İBC, MLR ve LLR gibi işitsel uyarılmış potansiyelleri değerlendiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (7,59). Bu çalışmalarda İBC, tone burst uyarılar (37,60,69,70) kullanarak kaydedilmiştir. Literatürde deney hayvanlarında sodyum salisilat ile tinnitus modellemesi yapılan çalışmalarda klik ya da *chirp* uyarı ile İBC kaydı alan herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için doğrudan bir karşılaştırma yapılamamıştır.

On gün boyunca 200 mg/kg sodyum salisilat verilerek tinnitus oluşturulan çalışmalarda tone burst uyaran ile I. dalga latansında değişim gözlemezken (37) dalga amplitüdünde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (7,62). Çalışmamızın sonucunda klik ve *chirp* uyaranlarda eşik seviyesinde dahi I. dalga latansı ve amplitüdünde farklılık olmaması ve 20 dB nHLde elde edilen II. dalga eşiği sebebiyle sıçanlarda sodyum salisilat kaynaklı işitme kaybı oluşmadığı ve iç tüylü hücreler ile işitme sinir lifleri bağlantısı kaynaklı koklear etkilenim olmadığını düşündürmektedir. Ancak klik ve *chirp* uyaranların frekansa spesifik değerlendirme yapmadıkları ve tone burst uyaranlara kıyasla farklı sonuçlar elde edilebileceği göz ardı edilmemelidir.

Castaneda ve ark. (7) 3 gün boyunca 350 mg/kg sodyum salisilat enjeksiyonunu takiben tone burst uyaran kullanarak yaptıkları çalışmalarında 4 kHz ve 8 kHz’de II, III ve IV. dalga latanslarında değişim görülmezken, aynı dalga amplitüdlerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışma sonuçlarımızda da Castaneda ve ark.’na benzer olarak 4 ve 8 kHz bölgesinin değerlendirilebildiği klik uyaranda II ve III. dalga amplitüdlerinde artış gözlenmiştir. II ve III. dalga amplitüdlerinde görülen bu artışın koklear çekirdeklerin lokasyonundan orijin almaları sebebiyle bu bölgede artan spontan nöral ateşlemelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca klik ve *chirp* uyaran kullanılarak hem eşik seviyesinde hem de 80 dB nHL’de yapılan tanısal değerlendirmede diğer dalga latanslarında da farklılık gözlenmemesi hem koklear hem de retrokoklear işitme sisteminde kalıcı yapısal bozulmalar meydana gelmediğini düşündürmektedir. Ayrıca, amplitüdteki artışlar, özellikle superior olivary kompleks ve ilgili beyin sapı çekirdeklerinde nöronal senkronizasyonun arttığını düşündürmektedir. Bu bulgular, tinnitusun yalnızca periferik değil, aynı zamanda santral mekanizmalara da dayandığını desteklemektedir (2,37). Yine de nihai sonuç için salisilat enjeksiyonunu takiben orta latans (MLR) ve P1, N1, P300 gibi geç latans işitsel potansiyellerin (LLR) kaydı ile üst işitsel yolları değerlendiren ek yöntemler ile sonuçlar desteklenebilir. Beyin sapı düzeyine kadar olan işitsel yollardaki etkilenimi göstermek için literatürde yer alan işitsel beyin sapı kayıtlarında kullanılan uyaran çeşidi, uyaran rate’i gibi farklı kayıt parametreleri ve değerlendirme kriterleri nedeniyle ortak görüş bulunmamaktadır. Bu sebeple bundan sonra yapılacak çalışmalarda kayıt parametreleri ve değerlendirme kriterlerinin standardize edilmesinin faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Sodyum salisilat enjeksiyonu ile deneysel tinnitus modeli oluşturulan sıçanlarda uyguladığımız sese şartlandırma temelli davranış deneyinde, tinnitusu olan sıçanların sesle ilişkilendirilen kolda daha uzun süre geçirdiği görüldü. Davranış deneyindeki bu yönelim, yapılan elektrofizyolojik ölçüm ile elde edilen beyin sapı dalgalarında amplitüd artışı ile de desteklendi. Araştırmanın en büyük avantajı tercih edilen elektrofizyolojik yöntemde kullanılan uyaranlar sayesinde hayvanlarda anestezide geçirilen sürenin kısılması ve davranışsal yöntemde herhangi bir yoksunluğa maruz kalmamasıdır. Deneysel tinnitus modelinde İBC kayıtlarında klik uyaran kullanımının sınırlı sayıda olması ve daha önce *chirp* uyaran kullanılmamış olması sebebiyle literatürdeki çalışma sayısının yetersiz olmasından dolayı tartışmanın yeterince yapılamaması da araştırmanın kısıtlı yanları olarak görüldü. Sıçanlarda tinnitus değerlendirmesinde, işitsel beyinsapı cevaplarının yanı sıra, koklear dış tüy hücrelerinin işlevini yansıtan otoakustik emisyon ölçümlerinin de yapılması, işitme sisteminin periferik düzeydeki durumunun değerlendirilmesine katkı sağlayabileceğinden ileride planlanacak çalışmalara eklenmesi önerilebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile laboratuvarımızda tinnitus araştırmalarında kullanılmak üzere dizayn edilen bir deney hayvanı modeli standardize edilerek, tinnitusun göstergesi olarak kullanılabilecek davranışsal ve elektrofizyolojik yöntemlerin birbirini desteklediği kombine bir metot oluşturuldu. Bu metodun tinnitus etiyojisi, patofizyolojisi veya tedavi yöntemleri ile ilgili diğer araştırmalarda, literatürdeki diğer yöntemlere kıyasla daha kısa süreli ve hayvan refahı açısından daha etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Eggermont, Jos J. The Neuroscience of Tinnitus. 2012.
2. Noreña AJ, Farley BJ. Tinnitus-related neural activity: Theories of generation, propagation, and centralization. C. 295, Hearing Research. 2013. s. 161-71.
3. Baguley D, McFerran D, Hall D. Tinnitus. İçinde: The Lancet. Elsevier B.V.; 2013. s. 1600-7.
4. Han BI, Lee HW, Kim TY, Lim JS, Shin KS. Tinnitus: Characteristics, causes, mechanisms, and treatments. C. 5, Journal of Clinical Neurology (Korea). Korean Neurological Association; 2009. s. 11-9.
5. Nondahl DM, Cruickshanks KJ, Huang GH, Klein BEK, Klein R, Javier Nieto F, vd. Tinnitus and its risk factors in the Beaver Dam Offspring Study. Int J Audiol. Mayıs 2011;50(5):313-20.
6. Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M. Behavioral model of chronic tinnitus in rats. C. 121, Otolaryngol Head Neck Surg. 1999.
7. Castañeda R, Natarajan S, Yule S, Na B. Electrophysiological changes in auditory evoked potentials in rats with salicylate-induced tinnitus. Brain Res [Internet]. 2019;1715(April):235-44. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.04.004>
8. Domarecka E, Olze H, Szczepek AJ. Auditory brainstem responses (Abr) of rats during experimentally induced tinnitus: Literature review. Brain Sci. 2020;10(12):1-27.
9. Jastreboff PJ, Sasaki CT. An animal model of tinnitus: a decade of development. Am J Otol. Ocak 1994;15(1):19-27.
10. Wei L, Ding D, Salvi R. Salicylate-induced degeneration of cochlea spiral ganglion neurons-apoptosis signaling. Neuroscience. Haziran 2010;168(1):288-99.
11. Holstege CP. Acetylsalicylic Acid. İçinde: Wexler P, editör. Encyclopedia of Toxicology (Second Edition) [Internet]. Second Edition. New York: Elsevier; 2005. s. 36-8. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123694000000193>
12. ZAKI OA. Effects of salicylate on adrenal function and carbohydrate metabolism in rats. Am J Physiol. 1960;199.
13. Stolzberg D, Salvi RJ, Allman BL. Salicylate toxicity model of tinnitus. Front Syst Neurosci. 2012;6(APRIL 2012):1-12.
14. Eggermont JJ, Roberts LE. Tinnitus: animal models and findings in humans. C. 361, Cell and Tissue Research. Springer Verlag; 2015. s. 311-36.
15. Fang L, Fu YY, Zhang T yu. Salicylate-Induced Hearing Loss Trigger Structural Synaptic Modifications in the Ventral Cochlear Nucleus of Rats via Medial

Olivocochlear (MOC) Feedback Circuit. *Neurochem Res.* 01 Haziran 2016;41(6):1343-53.

16. Jastreboff PJ, Brennan JF, Coleman JK, Sasaki CT. Phantom auditory sensation in rats: An animal model for tinnitus. *Behavioral Neuroscience.* 1988;102(6):811-22.
17. Guitton MJ, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, Puel JL. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *Journal of Neuroscience.* 2003;23(9):3944-52.
18. Chen J, Wang X, Li Z, Yuan H, Wang X, Yun Y, vd. Thalamo-cortical neural mechanism of sodium salicylate-induced hyperacusis and anxiety-like behaviors. *Commun Biol.* 01 Aralık 2024;7(1).
19. Üstündağ Y. Kulak Çınlaması Oluşturulmuş Ratların Koklear Çekirdeklerinde Bazı İyon Kanalı Ekspresyonlarının İncelenmesi. *Anatomi;* 2013.
20. Chen G Di, Kermay MH, D'Elia A, Ralli M, Tanaka C, Bielefeld EC, vd. Too much of a good thing: Long-term treatment with salicylate strengthens outer hair cell function but impairs auditory neural activity. *Hear Res.* Haziran 2010;265(1-2):63-9.
21. Santos-Sacchi J, Song L, Zheng J, Nuttall AL. Control of mammalian cochlear amplification by chloride anions. *Journal of Neuroscience.* 2006;26(15).
22. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT. An animal model for tinnitus. *Laryngoscope.* 1988;98(3):280-6.
23. Jastreboff PJ, Hansen R, Sasaki PG, Sasaki CT. Differential Uptake of Salicylate in Serum, Cerebrospinal Fluid, and Perilymph. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;112(10).
24. Jang CH, Lee S, Park IY, Song A, Moon C, Cho GW. Memantine attenuates salicylate-induced tinnitus possibly by reducing NR2B expression in auditory cortex of rat. *Exp Neurobiol.* 2019;28(4):495-503.
25. Ouyang J, Pace E, Lepczyk L, Kaufman M, Zhang J, Perrine SA, vd. Blast-Induced Tinnitus and Elevated Central Auditory and Limbic Activity in Rats: A Manganese-Enhanced MRI and Behavioral Study. *Sci Rep.* 01 Aralık 2017;7(1).
26. Zheng Y, McNamara E, Stiles L, Darlington CL, Smith PF. Evidence that memantine reduces chronic tinnitus caused by acoustic trauma in rats. *Front Neurol.* 2012;AUG.
27. Turner JG, Larsen D. Effects of noise exposure on development of tinnitus and hyperacusis: Prevalence rates 12 months after exposure in middle-aged rats. *Hear Res.* 01 Nisan 2016;334:30-6.
28. Jastreboff PJ, Brennan JF. Evaluating the Loudness of Phantom Auditory Perception (Tinnitus) in Rats. *Int J Audiol.* Ocak 1994;33(4):202-17.
29. Turner JG, Brozoski TJ, Bauer CA, Parrish JL, Myers K, Hughes LF, vd. Gap detection deficits in rats with tinnitus: A potential novel screening tool. *Behavioral Neuroscience.* Şubat 2006;120(1):188-95.

30. 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.
31. Rüttiger L, Ciuffani J ürgen, 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(1-2):39-50.
32. Lobarinas E, Sun W, Cushing R, Salvi R. A novel behavioral paradigm for assessing tinnitus using schedule-induced polydipsia avoidance conditioning (SIP-AC). *Hear Res.* Nisan 2004;190(1-2):109-14.
33. Heffner HE, Koay G. Tinnitus and hearing loss in hamsters (*Mesocricetus auratus*) exposed to loud sound. *Behavioral Neuroscience.* Haziran 2005;119(3):734-42.
34. Kaltenbach JA. Tinnitus: Models and mechanisms. *Hear Res* [Internet]. 2011;276(1-2):52-60. Erişim adresi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2010.12.003>
35. Brozoski TJ, Ciobanu L, Bauer CA. Central neural activity in rats with tinnitus evaluated with manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Hear Res.* Haziran 2007;228(1-2):168-79.
36. Lobarinas E, Sun W, Stolzberg D, Lu J, Salvi R. Human brain imaging of tinnitus and animal models. C. 29, *Seminars in Hearing.* 2008. s. 333-49.
37. Zhang W, Peng Z, Yu SK, Song QL, Qu TF, He L, vd. Loss of Cochlear Ribbon Synapse Is a Critical Contributor to Chronic Salicylate Sodium Treatment-Induced Tinnitus without Change Hearing Threshold. *Neural Plast.* 2020;2020.
38. Squires K, Hecox K. Electrophysiological Evaluation of Higher Level Auditory Processing. *Semin Hear.* 1983;4(04).
39. Chertoff M, Lichtenhan J, Willis M. Click- and chirp-evoked human compound action potentials. *J Acoust Soc Am.* 2010;127(5).
40. Elberling C, Don M, Cebulla M, Stürzebecher E. Auditory steady-state responses to chirp stimuli based on cochlear traveling wave delay. *J Acoust Soc Am.* 2007;122(5).
41. Kristensen SGB, Elberling C. Auditory brainstem responses to level-specific chirps in normal-hearing adults. *J Am Acad Audiol.* 2012;23(9).
42. Rodrigues GRI, Ramos N, Lewis DR. Comparing auditory brainstem responses (ABRs) to toneburst and narrow band CE-chirp® in young infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77(9).
43. Jafarzadeh S, Pourbakht A. Morphology variations of click-evoked auditory brainstem response with low and high rate stimuli in rat. *Auditory and Vestibular Research.* 2019;28(1).
44. Schmidt FH, Dörmann A, Ehrt K, Grossmann W, Mlynski R, Zhang L. The curvature quantification of wave I in auditory brainstem responses detects cochlear synaptopathy in human beings. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 01 Eylül 2024;281(9):4735-46.

45. Prendergast G, Tu W, Guest H, Millman RE, Kluk K, Couth S, vd. Supra-threshold auditory brainstem response amplitudes in humans: Test-retest reliability, electrode montage and noise exposure. *Hear Res.* 2018;364.
46. Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Jareño-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: A study in wistar rats. *Neurosci Res.* Ağustos 2012;73(4):302-11.
47. Henry KR. Auditory brainstem volume-conducted responses: Origins in the laboratory mouse. *J Am Aud Soc.* 1979;4(5).
48. Chen TJ, Chen SS. Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Exp Brain Res.* 1991;85(3).
49. Moller AR, Jannetta PJ. Auditory evoked potentials recorded from the cochlear nucleus and its vicinity in man. *J Neurosurg.* 1983;59(6).
50. Overbeck GW, Church MW. Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hear Res.* 1992;59(2).
51. Kamerer AM, Neely ST, Rasetshwane DM. A model of auditory brainstem response wave I morphology. *J Acoust Soc Am.* 2020;147(1).
52. Burke K, Burke M, Lauer AM. Auditory brainstem response (ABR) waveform analysis program. *MethodsX.* 2023;11.
53. Hamza Y, Yang Y, Vu J, Abdelmalek A, Malekifar M, Barnes CA, vd. Auditory brainstem responses as a biomarker for cognition. *Commun Biol.* 01 Aralık 2024;7(1).
54. Maddox RK, Lee AKC. Auditory brainstem responses to continuous natural speech in human listeners. *eNeuro.* 2018;5(1).
55. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *Journal of Neuroscience.* 2009;29(45).
56. Fernandez KA, Jeffers PWC, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG. Aging after noise exposure: Acceleration of cochlear synaptopathy in “recovered” ears. *Journal of Neuroscience.* 2015;35(19).
57. Sergeyenko Y, Lall K, Charles Liberman M, Kujawa SG. Age-related cochlear synaptopathy: An early-onset contributor to auditory functional decline. *Journal of Neuroscience.* 2013;33(34).
58. Montazeri K, Farhadi M, Akbarnejad Z, Asadpour A, Majdabadi A, Fekrazad R, vd. Acoustic and optoacoustic stimulations in auditory brainstem response test in salicylate induced tinnitus. *Sci Rep.* 2023;13(1).
59. Rezapour M, Akbari M, Dargahi L, Zibaii MI, Shahbazi A. The Auditory Brainstem Response (ABR) Test, Supplementary to Behavioral Tests for Evaluation of the Salicylate-Induced Tinnitus. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery.* 2023;75.

60. Liu XP, Chen L. Auditory brainstem response as a possible objective indicator for salicylate-induced tinnitus in rats. *Brain Res.* 16 Kasım 2012;1485:88-94.
61. Liu XP, Chen L. Forward acoustic masking enhances the auditory brainstem response in a diotic, but not dichotic, paradigm in salicylate-induced tinnitus. *Hear Res.* 2015;323.
62. Farhadi M, Gorji A, Mirsalehi M, Müller M, Poletaev AB, Mahboudi F, vd. The human neuroprotective placental protein composition suppressing tinnitus and restoring auditory brainstem response in a rodent model of sodium salicylate-induced ototoxicity. *Heliyon.* 2023;9(8).
63. Montazeri K, Farhadi M, Majdabadi A, Akbarnejad Z, Fekrazad R, Shahbazi A, vd. Photobiomodulation therapy in improvement of harmful neural plasticity in sodium salicylate-induced tinnitus. *PLoS One.* 01 Nisan 2024;19(4 April).
64. Bauer CA, Brozoski TJ, Holder TM, Caspary DM. Effects of chronic salicylate on GABAergic activity in rat inferior colliculus [Internet]. 2000. Erişim adresi: www.elsevier.com/locate/heares
65. Sawka B, Wei S. The effects of salicylate on auditory evoked potential amplitude from the auditory cortex and auditory brainstem. *J Otol.* 2014;9(1).
66. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? C. 4, *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics.* 2013.
67. Spankovich C, Hood LJ, Wesley Grantham D, Polley DB. Application of frequency modulated chirp stimuli for rapid and sensitive ABR measurements in the rat. *Hear Res.* Kasım 2008;245(1-2):92-7.
68. Kellerhals B, Zogg R. Tinnitus-induced weight loss in rats: An animal model for tinnitus research. *ORL.* 1991;53(6).
69. Duron J, Monconduit L, Avan P. Auditory Brainstem Changes in Timing may Underlie Hyperacusis in a Salicylate-induced Acute Rat Model. *Neuroscience.* 2020;426.
70. Ralli M, Lobarinas E, Fetoni AR, Stolzberg D, Paludetti G, Salvi R. Comparison of salicylate- and quinine-induced tinnitus in rats: Development, time course, and evaluation of audiologic correlates. *Otology and Neurotology.* 2010;31(5).

EK 1: Proje Onayı



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu



Sayı :
Konu :

31.01.2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Fizyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan

Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Berfin Eylül Aydemir'in sorumluluğunda yürütülecek olan DA23/25 nolu "Ratlarda salisilat ile indüklenmiş tinnitus modeli oluşturarak klik ve chirp uyaran faktörünün değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 18/12/2023 tarih ve 23/24 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Not: Çalışma bildirisi ve/veya makale halince geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Resarch on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

Kurul Başkanı



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu



Sayı :
Konu :

31.01.2024

DENEY HAYVANLARI ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİNE

Fizyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan danışmanlığında Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Berfin Eylül Aydemir'in sorumluluğunda yürütülecek olan DA23/25 nolu "Ratlarda salisilat ile indüklenmiş tinnitus modeli oluşturarak klik ve chirp uyaran faktörünün değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Deney Hayvanları Etik Kurulunun 18/12/2023 tarih ve 23/24 sayılı kararı ile uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim

Kurul Başkanı