

T.C

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

TİNNİTUS İLE BEYİN-KAYNAKLI NÖROTROFİK  
FAKTÖR (BDNF) GEN POLİMORFİZMLERİ VE BDNF  
SERUM DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aysun COŞKUNOĞLU

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM

MANİSA, 2013

## ÖNSÖZ

*Tezimin oluşturularak, yürütülmesi ve tamamlanmasında deneyimlerini aktararak, katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM'a*

*Kliniklerinde çalışmamı yürütmem konusunda olanak sağlayan, bilgilerinden faydalandığım Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Vefa YÜCETÜRK'e,*

*Çalışma grubunun psikiyatrik değerlendirilmesinde büyük katkıları olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Artuner DEVECİ'ye*

*Tüm laboratuvar çalışmalarımnda sabır ve özveri ile yardımlarını esirgemeyerek çalışmamın tamamlanmasına katkı sağlayan çalışma arkadaşım Biyolog Seda ÖRENAY'a*

*Tez çalışmamda, çalışma grubunun oluşturulmasında, katkı ve yardımlarını esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı Araştırma görevlisi Dr. Kadri SERT ve Dr. Mustafa BAYAM'a, çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim görevlisi Dr. Zafer AKAN'a ve Halk Sağlığı Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Burak TUNÇ'a*

*Çalışmama katılan tüm hastalarımna,*

*Beni her zaman destekleyip yanımda olan aileme ve dostlarıma,*

**TEŞEKKÜR EDİYORUM.**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİLLER .....	VIII
TABLolar.....	IX
I. GİRİŞ.....	1
II.GENEL BİLGİLER.....	3
II.1.TİNNİTUS.....	3
II.1.1.Tinnitus Tanım ve Tarihçesi.....	3
II.1.2.Tinnitus Epidemiyolojisi.....	4
II.1.3.Tinnitus Sınıflama ve Etyoloji .....	5
II.1.4.Tinnitus Patogenezi.....	9
II.1.5 Tinnitus Tedavisi.....	11
II.2.NÖROPLASTİSİTE.....	11
II 2.1 Nöroplastisite ve Tinnitus.....	13
II.3.BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF).....	15
II.3.1.Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF).....	15
II.3.2.Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP).....	18

II.3.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	18
II.3.4.BDNF Geni ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	20
II.3.5.BDNF ve Tinnitus.....	21
III- GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
III.1.ÇALIŞMA GRUBU.....	24
III.2.ÇALIŞMA PLANI.....	24
III.3.KULLANILAN KLİNİK DEĞERLENDİRME ARAÇLARI.....	25
III.3.1. Sosyo-demografik bilgi ve görüşme formları.....	25
III.3.2. Odyolojik değerlendirme.....	26
III.3.3. SCID-I.....	27
III.4. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZ.....	27
III.4.1. Çalışmada kullanılan Cihazlar.....	27
III.4.2. Çalışmada kullanılan Kimyasallar.....	28
III.4.3. Çalışmada kullanılan Tamponlar.....	29
III.4.4. Primer ve Enzimler.....	30
III.4.5. DNA İzolasyonu.....	30
III.4.6. DNA nın Çoğaltılması (PZR İşlemi).....	31
III.4.7. PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Kontrolü.....	32
III.4.7. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)..	33
III.4.8. Kesim Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Kontrolü.....	36

III.5. ELİSA YÖNTEMİ İLE BDNF SERUM DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ.....	36
III.6. VERİ GİRİŞ VE İSTATİKSEL ANALİZ.....	37
IV. BULGULAR.....	38
V. TARTIŞMA.....	47
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	50
VII.ÖZET.....	51
VIII.ABSTRACT.....	53
XII.EKLER.....	55
XIII.KAYNAKLAR.....	57

## **KISALTMALAR**

DTH: Dış Tüy Hücresi

dB: Desibel

Hz: Hertz

MMS: Minimal Maskeleye Seviyesi

SSO: Saf Ses Ortalaması

SOAE: Spontan Otoakustik Emisyon

TF: Tinnitus Frekansı

TS: Tinnitus Süresi

TS: Tinnitus Şiddeti

VAS: Vizuel analog skala

cAMP: Siklik Adenozin Trifosfat

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual, Fourth Edition of Mental  
Disorders

SCID-I: Structured clinical interview for DSM disorders DSM-IV eksen I  
bozuklukları için yapılandırılmış klinik görüşme

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

SSS: Santral Sinir Sistemi

GABA: Gamma-Amino Bütirik Asit

BDNF: Beyinden Kaynaklanan Nörotrofik Faktör

Trk: Tirozin Kinaz

NT: Nörotrofin

NGF: Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü)

NG-3: Sinir Büyüme Faktörü 3

NG-4: Sinir Büyüme Faktörü 4

NGF: Nöron Büyüme Faktörü

LTD: long term depression

LTP: long-term potentiation

CREBP: cAMP responding element binding protein

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction  
Fragment Length Polymorphism)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

Bç: Baz çifti

Rpm: (rotatory per minute)

## ŞEKİLLER

Şekil 1. İşitme sistemi ile amigdala arasındaki bağlantı

Şekil 2. Nörotrofin ve reseptörler arasındaki ilişkiler

Şekil 3. Trk reseptör aracılığı ile olan sinyal yolu

Şekil-4. Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR)

Şekil 5. Kromozom 11 üzerinde BDNF gen lokalizasyonu

Şekil 6. BDNF geni rs2030324 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü

Şekil 7. BDNF geni rs1491850 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü

Şekil 8. BDNF geni rs6265 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü

Şekil 9. Tinnitus frekans dağılımı

Şekil 10. Tinnitus şiddetinin dağılımı



## **TABLolar**

Tablo-1. Tinnitus Engellilik anket değerlendirmesi

Tablo-2. Polimorfizmlere göre kullanılan primer dizileri ve enzimler

Tablo-3. PZR sıcaklık profili ve döngü sayısı

Tablo-4. Polimorfizmlere göre RFLP için kullanılan enzimler, distile su ve PZR ürünü miktarları

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyetlere göre dağılımı

Tablo 7. Tinnitus lokalizasyonu

Tablo 8. Hasta ve Kontrol gruplarında serum BDNF oranları

Tablo 9. Hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel dağılımı

Tablo 10. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete dayalı genotip ve allel dağılımı

Tablo 11. Hasta grubunda genotip ve serum BDNF düzeyinin karşılaştırılması

Tablo 12. Kontrol grubunda genotip ve serum BDNF düzeyinin karşılaştırılması



## I. GİRİŞ

Tinnitus, dışarıdan herhangi bir uyarı olmaksızın kişinin kulağında veya başının herhangi bir bölgesinde ses algılamasıdır (1,2). Tinnitus bir hastalık değil bir semptomdur (3). Oldukça sık görülen bir durum olup, görülme sıklığı %6-30 arasındadır ve yaşla birlikte bu oran artmaktadır (1,4,5). Tinnitusun etiopatogenezi halen tam anlaşılamamış olup etiyolojik nedenler oldukça değişkendir(4,6). Tinnitus otolojik bir semptom olarak kabul edilse de son zamanlarda hem görüntüleme yöntemleri, hem de hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda nöronal ilişki ön plana çıkmaya başlamıştır. Ortaya çıkan bu yeni patofizyolojik anlayışlar, nöronal temelli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinin önünü açmaktadır (7).

Nöral plastisite açısından önemli faktörlerden birisi olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) nöronların büyümesi, farklılaşması, yaşamlarını sürdürmesinde ve iç kulak duyu epiteli dahil gelişmekte olan işitsel yolda anahtar rol oynayan nörotrofik faktörlerden biridir (6,8-10). BDNF proteinini kodlayan genin tek nükleotid polimorfizmlerine sık olarak rastlanmaktadır. BDNF geni tek nükleotid polimorfizmlerinin [rs6265 (Val66Met), rs2030324 ve rs1491850], BDNF serum düzeyindeki değişikliklerle ve işitsel uyarılmış potansiyel test (BAER) sonuçlarındaki değişmeler ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (10,11,12).

Tinnitus ile depresyon gibi duyu durum bozuklukları arasında yakın ilişki olduğu ve BDNF düzeylerinin tinnitus ve depresyon, stres ile ilişkili olabilecek distimik bozukluk, konversiyon bozukluğu ve yaşam krizlerine bağlı intihar girişimleri gibi psikiyatrik bozukluk ve durumlarda azaldığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (13,14-18).

Tüm bu veriler, tinnitus ile BDNF gen polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyleri arasında bir korelasyon olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışmada, BDNF polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyi değişiklikleri ile tinnitus arasındaki ilişki incelenerek, BDNF değişikliklerinin tinnitus patofizyolojisinde herhangi bir rolü olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

## II. GENEL BİLGİLER

### II.1.TİNNİTUS

#### II.1.1.TinnitusTanım Ve Tarihçesi

Tinnitus, dışarıdan herhangi bir uyarı olmaksızın kişinin kulağında veya başının herhangi bir bölgesinde ses algılamasıdır (1,2). Hayalet işitsel bir algı (*phantom auditory perception*) olarak tanımlanabilir (5). Tinnitus bir hastalık olmayıp, korti organı, afferent ve efferent iletim yolları, korteks işitme merkezi ve tüm bunların koordineli bir şekilde çalışması sırasında herhangi bir basamakta meydana gelen patolojiler sonucunda tam bilinmeyen mekanizmalarla ses algısında artış olması şeklinde açıklanmaktadır (4,19,20). Tinnitus otolojik bir problem olarak kabul edilsede son zamanlarda hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda ve nöronal görüntüleme yöntemlerinde ki gelişmelerle tinnitusun Santral sinir sistemi ile olan ilişkisine dikkat çekilmektedir (7,20,21).

Tinnitusa ait ilk yazılı bilgiler M.Ö 16.yy da eski Mısır'a kadar uzanmaktadır ve "büyülenmiş kulağın tedavisi" başlığı altında tinnitus için tedavi yöntemlerinden bahsedilmektedir (4). M.Ö 4-5.yy da Hipokrat ve Aristoteles tinnitus ve tedavisinden bahsetmiş, 17.yy da Du Verney tinnitusun kulak ve beyin hastalıklarından kaynaklandığını ileri sürmüştü ve 1536'da Paracelsus yüksek ses ve gürültünün tinnitus sebebi olabileceğini, 1727 yılında da Wepfer yüksek sesin tinnitusu azalttığından bahsetmiştir. Ancak günümüzde halen tinnitus patofizyolojisi, etyolojisi ve tedavisi hakkında kesin bir görüş hakim değildir (4,22).

## II.1.2.Tinnitus Epidemiyolojisi.

Epidemiyolojik olarak farklı ülkelerde yapılmış popülasyon çalışmalarında sürekli tinnitus prevalansının yetişkin yaş grubunda %4,4- 15,1 arasında değiştiği, 50 yaş altındakilerde %7,6-20,1 iken, ilerleyen yaşla birlikte bu oranın arttığı ve 60-69 yaşları arasında yaklaşık %12.1-14.3 olduğu, 70 yaş üzerinde ise %25-30 olduğu görülmektedir. Çalışmalar İnsanların %0.5-2'sinin tinnitustan ciddi boyutta etkilendiğini göstermektedir (4,6,23-27). Bu hastalarda tinnitusa anksiyete, depresyon, irritabilite, ajitasyon, depresyon ve/veya uykusuzluk gibi semptomlar eşlik etmektedir. Geçici tinnitus oranları ise %22-32 arasında gözlenmektedir (28-31). Çocukluk döneminde tinnitus değerlendirilmesinin güçlüğü nedeniyle farklı sonuçlar görülmekte olup yapılan popülasyon çalışmalarında %6-59 arasında görüldüğü bildirilmektedir (27). İşitme kaybı veya otolojik problemleri olan çocukların ise yaklaşık % 50 oranında tinnitus görülmektedir (3). Cinsiyetin tinnitus sıklığı üzerine etkilerine bakıldığında erkek ve kadın arasında bir fark olmadığını bildiren çalışmalar yanında, 50 yaş altında kızlarda daha sık görülen spontan otoakustik emisyon ve üreme hormonlarının etkisi ayrıca nörotransmitterlerin işitsel yola etkileri nedeni ile kadınlarda erkeklere göre tinnitus sıklığının hafif daha yüksek olduğu, 50 yaşın üzerinde ise eşitlendiği ve özellikle 65 yaş sonrası erkeklerde çeşitli çevresel faktörlerin etkisi ile (gürültülü işlerde çalışma gibi) %12, kadınlarda ise yaklaşık %7 oranında tinnitus yakınması görüldüğü bildirilmektedir (4,19,27).

Kişilerin sosyoekonomik ve mesleki durumları tinnitus epidemiyolojisini etkileyebildiği, gelir düzeyi düşük bireylerde tinnitus sıklığının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (22). Tinnitus prevalansının, işitme azlığı olmayan kişilerde %26,6, işitme kaybı olanlarda ise %35,1 olduğu bildirilmiştir. Gürültüye maruz kalma ile tinnitus görülme sıklığının arttığı ve gürültüye bağlı tinnitusun görülme oranının yaklaşık %18 olduğu bildirilmiştir. Gürültüye bağlı işitme kaybı gelişmiş kişilerde tinnitus oranının % 40-80 arasında olduğu ve tinnitusun işitme kaybının en fazla olduğu frekansta

duyulduğu ancak işitme kaybının şekli ile (iletim, sensorinöral veya mixt tip) ilişkisi olmadığı bildirilmiştir (4,32-34). Tinnitus lokalizasyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve sağ – sol kulak arasında fark olmadığını bildiren çalışmaların yanında sol kulakta daha sık görüldüğünü ifade eden yayınlarda bulunmaktadır (22,35). Yapılan bir çalışmada İspanyol olmayan beyazlarda tinnitus oranlarının diğer etnik kökenlere göre daha yüksek olduğu, beyaz ırkta %9 iken, Afrika kökenli Amerikan toplumunda %5.5 olduğu gösterilmiştir (4,26).

### **II.1.3.Tinnitus Sınıflama ve Etiyoloji**

Tinnitusun etyopatogenezi halen tam anlaşılammış olup etyolojik nedenler oldukça değişkendir (5,6,8). Tinnitusun tanısında, odyometrik ve otoneurolojik araştırmalar, manyetik rezonans tomografisi gibi görüntüleme yöntemleri, bir enfeksiyon şüphesi durumunda serolojik testler, çeşitli anketler, psikoakustik ve psikosomatik ölçekler gibi birçok parametrelerle değerlendirmesi yapılmaktadır (13,36)

Etiyolojide gürültüye maruz kalma önemli bir neden olmakla birlikte nedeni bilinmeyen tinnitus grubu en büyük grubu oluşturur (7,37).

Ses dalgaları dış kulaktan, kulak zarı ve birbiri ile ilişkili üç kemik yapıdan oluşan hava dolu bir boşluk olan orta kulağa oradan denge ile ilişkili olan vestibüler sistem ile işitme merkezi olan koklear sistemi içeren orta kulağa taşınır. Üç adet skala (skala timpani, skala vestibuli ve skala media) ve ortasındaki iç ve dış tüy hücreleri ile destek hücrelerinden oluşmuş reseptör organ olan corti organı ile, buradaki reseptör hücrelere bağlı sinirler koklear yapıyı oluşturur. Skala timpani ve skala vestibuliyi ayıran zar baziller memrandır.

Seslerin frekans analizi ilk olarak kokleada, baziler zar tarafından gerçekleştirilir. Korti organı baziler zardaki titreşimlere yanıt olarak sinir uyarıları üretir ve bu işitme yolları ile beyin ve ilişkili merkezlere taşınır.

İşitme yolları afferent ve efferent sinir liflerinden oluşur. İstirahat halinde bile elektriksel uyarı sürekli olarak bu ağ aracılığı ile tüy hücreleri, beyin sapı ve talamus yolu ile kortekse ve aynı şekilde efferent yolla korteksten tüy hücrelerine ulaşır. Spiral gangliondan koklear nükleus'a ve işitme korteksine giden sinir liflerinin (8. Sinir) tonotopik (frekans organizasyonu) özelliği vardır. Korti organından koklear nükleusa kadar tek bir kanal içinde giden sinir lifleri sonrasında işitme korteksine kadar superior oliver kompleks, lateral lemniskus ve inferior kollikulus gibi üst merkezlere asendan sinir iletimi sağlayacak şekilde birçok paralele yola ayrılarak ilerler. İşitsel çekirdeklerden oluşmuş superior oliver kompleks (SOC) her iki kulaktan gelen uyarıların bir araya gelerek horizontal lokalizasyonun, frekans ve şiddet analizinin yapıldığı (8. Sinirin ilk çaprazlaştığı nokta) ilk anatomik yapıdır. Lateral SOC tan çıkan aksonlar yüksek frekans ve horizontal ses lokalizasyonu, medial SOC'tan çıkan aksonlar ise alçak frekans ve horizontal ses lokalizasyonu ile ilgili bilgileri inferior kollikulusa ve burada organize olarak önbeyine iletirler. İşitme ile ilgili primer işitme alanı ve assosiasyon alanları sol hemisferde bulunur (5,38,39). Bu yolun herhangi bir yerinde ortaya çıkan patoloji bilinmeyen bir mekanizma ile ses algısının artmasına neden olmaktadır. Gürültüye maruz kalma, stres, basınç değişiklikleri ve cerrahi girişimler gibi bazı çevresel faktörlerin tinnitusu tetikleyebileceği ileri sürülmektedir (38,40-42).

Koklea fizyolojisi ile ilgili yapılan araştırmalar ve saptanan gelişmelerden sonra, tinnitus'un, kokleadaki tüylü hücrelerde ve 8.sinir liflerindeki spontan uyarılardan meydana geldiği ileri sürülmektedir (5,39). Spontan otoakustik emisyon (SOAE) kokleanın dış saçlı hücrelerindeki küçük elektriksel aktiviteden kaynaklanan akustik sinyaller olarak kabul edilmekte ve tinnitus olarak algılanabileceği öne sürülmektedir. Ancak işitme kaybı veya aspirin ile SOAE nin kaybolmasına rağmen tinnitusun devam ettiği görülmektedir (19,43).

Korti organında çeşitli nedenlerle (gürültü, ototoksisite, ilerleyen yaşla birlikte dış saçlı hücre kaybı gibi) hasarlanmış dış saçlı hücrelerin ve sağlam



iç saçlı hücrelerin dorsal koklear nukleus nöronlarının üzerine olan uyarımlarının organizasyonun bozulması ile tinnitusun ortaya çıkabileceğine inanılır (19).

Koklear uyarılma yada hasarlar nedeniyle işitme yollarındaki nöral aktivite artarak işitsel plastisite sonucu ortaya çıkan klasik olmayan yol ile hayalet duyu şeklinde tinnitus ortaya çıkabilmektedir. İşitme bölgelerine yakınlığından dolayı hasarlı bazı kranial sinirler ile işitme siniri arasında sinaplar gelişerek eksternal uyarı yokken tinnitus algısına neden olabilir (19).

İlerleyen yaşla aktivitesinin azaldığı bilinene klasik işitme yolları dışında klasik olmayan işitme yolları ile talamus ve limbik sistemin bir parçası olan amigdala arasındaki bağlantının bazı kişilerde yeniden aktive olduğu ve tinnitusa neden olduğu ileri sürülmektedir (44,45).

Otolojik nedenler dışında Temporomandibuler eklem ve servikal nedenler, hipertansiyon, anemi ve hiper/hipotiroidi, hiperlipidemi, diabetes mellitus gibi pekçok metabolik neden de tinnitusa sebep olabilmektedir (7,20).

Tinnitus, etiyojileri göz önünde bulundurularak, Objektif tinnitus, Subjektif tinnitus, İşitsel halusinasyonlar ile Pulsatil tinnitus ve Pulsatil olmayan tinnitus olarak sınıflandırılmaktadır. Pulsatil tinnitus vasküler kaynaklı olabileceği gibi objektif ya da sübjektif karakterde olabilirken, pulsatil olmayan tinnituslar sübjektif karakterdedir (4,46).

Objektif tinnitusa vücudun herhangi bir bölgesinden kaynaklanan sesler neden olmakta iken, sübjektif tinnitus ise herhangi bir fiziksel ses yokken anlamsız seslerin algılanmasıdır. Sübjektif tinnituslar ve işitsel halusinasyonlar hayalet duyulardır.

İşitsel halusinasyonlar nadir görülür ve bazı psikiyatrik süreçlerde karşılaşılan insan sesi, müzik sesi gibi anlam taşıyan seslerin duyulması şeklinde olup tinnitus ile karıştırılmaması gerekir (19,32).

Aynı zamanda vibratuvar tinnitus, ekstrinsik tinnitus ve pseudotinnitus olarak adlandırılan objektif tinnitustalarda hastayı rahatsız eden sesler, diğer kişiler tarafından da duyulabilmektedir. Objektif tinnitus'un nedenleri başta vasküler anomaliler veya nöromusküler anomaliler olmakla birlikte ayrıca, östaki disfonksiyonları, palatal kasların veya orta kulak kaslarının istemsiz kasılmaları da objektif tinnitusa neden olabilmektedir (20,47,48).

Tinnitus, vakaların çoğunda sübjektiftir (25). Sübjektif tinnitus işitme kaybı olmayanlarda görülebildiği gibi, genelde işitme kaybı ile birlikte ve sadece hastanın kendisi tarafından duyulur (20,36,49).

Subjektif Tinnitus Nedenleri (4,32,47,50).

#### 1- Otolojik nedenler;

- Dış kulak yolunda yabancı cisim, enfeksiyon, ekzostoz, tümör, kulak zarı perforasyonu, atelektazi
- Orta kulak efüzyonu, enfeksiyon, kemik zincir fiksasyonları veya devamsızlıkları, tümörler
- Koklea Presbiyoakuzi, akustik travma, Meniere Hastalığı, ani işitme kaybı, labirentit
- Retrokoklear nedenler; İç kulak kanalı ve serebellopontin açığı tümörleri (Vestibüler schwannom, menenjiyom, vs), demiyelinizan hastalıklar, tümörler, serebrovasküler hastalıklar

#### 2- Metabolik nedenler

- Hipertiroidi, Hipotiroidi, Hiperlipidemi, Diabet mellitus, Vitamin eksikliği, Çinko, bakır, demir eksikliği, anemi, gebelik

#### 3- Nörolojik nedenler

- Kafatabanı kırıkları, Multipl Skleroz

#### 4- Farmakolojik nedenler

- Aspirin, Steroid olmayan antiinflamatuarlar, Aminoglikozidler, Antidepresanlar, Loop diüretikler, Ağır metaller, Oral kontraseptifler, Alkol, Kafein, Kokain

#### 5- Enfeksiyonlar

- Sfiliz, Lyme hastalığı, Menenjit

#### *6- Psikiyatrik nedenler*

- Depresyon, anksiyete

Objektif Tinnitus Nedenleri (4,32,47,50).

#### *1- Damarsal lezyonlar*

- Konjenital ve akkiz arteriyovenöz fistüller ve malformasyonlar
- Glomus tümörü
- Aterosklerotik karotid arter hastalığı
- Karotid arter stenozu
- Hipertansiyon
- Hidrosefali

#### *2- Nöromüsküler olaylar*

- Palatal miyoklonus
- Tensor timpani miyoklonusu
- İdiyopatik stapes kas spazmı

#### *3- Doğumsal nedenler*

- Doğumsal Silviyan kanal stenozu
- Arnold-Chiari malformasyonu

#### *4- Temporomandibuler eklem hastalıkları*

#### **II.1.4.Tinnitus Patogenezi**

Tinnitusun altta yatan nedenleri tam olarak açıklanamamış olup oluşum mekanizması ile ilgili birçok hipotez bulunmaktadır. Genellikle işitsel sistemdeki anatomik ve/veya fonksiyonel değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Tinnitusun patogenezi açıklamaya yönelik ileri sürülen hipotezlerin ortak varsayımları sinir liflerinde meydana gelen spontan aktivite artışıdır (19,32). Koklear tüy hücre hasarı ile tektoryal membranla teması kesilen tüy hücrelerinin moleküler hareketinin artması ve artan bu moleküler hareketin neden olduğu uyarıların tinnitus olarak algılandığı ileri sürülmüştür. Birbirine komşu sinir liflerinde hasar meydana geldiğinde bu sinir lifleri arasında doğal olmayan sinapslar oluşarak patolojik iletimler oluşmakta ve spontan aktivite artışı ile oluşan uyarı tinnitus olarak algılanmaktadır (7,8,34).

İşitsel kortikal alanlardaki bu aktivasyon artışı fonksiyonel ve yapısal görüntüleme teknikleri; fonksiyonel magnetik rezonans (fMRI), single Photon Emission Computerized (SPECT), Pozitron Emisyon Tomografi (PET) ile gösterilmiştir (51-53). Subjektif tinnitus vakalarının çoğunda problemin özellikle işitme sinirinin santralinde olduğu düşünülmektedir. İşitme siniri kesilen kişilerde halen tinnitusun devam etmesi bu düşüncüyü doğrular niteliktedir (20). Yapılan görüntüleme çalışmaları ile işitsel yollardaki aktivite değişikliklerine ilaveten, dikkat, farkındalık gibi değerlendirmeleri yapan prefrontal ve parietal alanlarda ve emosyonel süreçle ilişkili limbik alanlar gibi işitsel olmayan beyin alanlarında meydana gelen değişiklikler de gösterilmiştir (28,54). Ayrıca subgenua ön cingulate korteks, hipokampus ve işitsel kortekste yapısal anormallikler gözlenmiştir (55,56). Bunun yanında magnetoensefalografi (MEG) ve F-deoksyglucose positron emission tomography (FDG-PET) gibi görüntüleme yöntemleri ile tinnitusun, işitsel ve işitsel olmayan nöronal aktivitedeki değişiklikler ile olan ilişkisi gösterilmiştir (57-59).

Tinnitusun muhtemelen, santral işitsel yolda meydana gelen değişikliklere uyum sağlama özelliğindeki farklılıklar sonucu oluştuğu ileri

sürülmektedir (60,61). İşitme kaybının tinnitusu tetiklemesi mümkün görünmektedir. İşitsel nöral uyarı yokluğunda, santral işitsel yolda exitasyon-inhibisyon dengesi bozulmaktadır. Bu bozulmanın, subjektif tinnitus algılaması, önemli ölçüde işitsel kortikal ve subkortikal yapılarda nöronların spontan uyarılmasının artması, etkilenmiş frekans aralığında spontan nöral aktivitenin eşleşmesinin artması ve işitsel kortekste frekans da değişiklikler meydana gelmesi gibi işitsel sürecin tekrar uyumlanmasına yol açtığı ifade edilmektedir (60-63).

### **II.1.5.Tinnitus Tedavisi**

Tinnitus için, farmakolojik tedaviler, maskeleme, işitme cihazları, akupunktur gibi çeşitli tedavi protokolleri geliştirilmiştir ancak halen standart tedavisi yoktur. Kognitif Davranış Terapisi (Cognitive Behavioral Therapy-CBT) tinnitus ile ilişkili rahatsızlığın düzeltilmesinde etkili bir tedavi olabilmektedir (64). Nörotrofik faktörler iç kulağı çeşitli travmalara karşı korurken aynı zamanda iç kulak epitelinin onarımını da artırır. Gen terapi teknolojisi ile iç kulağa büyüme faktörleri verilerek tedavi yolları denenmektedir (65).

### **II.2.NÖROPLASTİSİTE**

Plastisite Yunanca “plastikos” kelimesinden gelir ve biçimlendirmek, şekil vermek anlamındadır. Nöroplastisite ise çeşitli iç ve dış uyarılara bağlı olarak nöronların ve nöronlar arası sinapsların yapısal özellikleri ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelmesi olarak ifade edilebilir. Oluşan değişiklikler sinaptik düzeyde ise meydana gelen adaptif yanıt “sinaptik plastisite” olarak isimlendirilebilir ve sinir sisteminin adaptasyonunda rol oynar. Santral sinir sisteminin iç ve dış uyarılara karşı verdiği en güçlü ve önemli adaptif yanıtı öğrenmedir. Öğrenme ile bilginin bellekte depolanması ve/veya elenmesi sinaptik plastisite ile gerçekleşir

(45,64). Öğrenmenin oluşabilmesi için nöronlarda sinaptik iletimde meydana gelen LTP (long-term potentialisation) adı verilen “uzun süreli potansiyelin” oluşması gerekmektedir. Depresyon gibi kronik ve şiddetli stres oluşturan nedenler olumsuz nöroadaptif değişikliklere neden olurken, kısa süreli ve belli düzeyde stres, LTP için gereklidir (45,66,67).

İnsanda nöronal migrasyon gebeliğin ilk haftalarında başlar ve ikinci trimester sonunda büyük kısmı oluşur. Eskiden inanılanın aksine bugünkü bilgiler ışığında nöronların kendilerini onarabildikleri ve yenileyebildikleri, yeni nöron oluşumunun (nörogenez) devam ettiği kanıtlanmıştır. Erişkin hipokampal nörogenezisi yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (68,69). Yapılan çalışmalarla erişkin beyninin nörogenezin yanısıra nöroplastisite kapasitesine sahip olduğu ve dendritlerin gelişmesi, sinapsların yeniden yapılanması gibi süreçlerin hayatın ilk yıllarında en fazla olmakla beraber, erişkinlikte de devam ettiği gösterilmiştir (66,69,70). Beyinde nöroplastik değişiklikler korteks, septum, amigdala ve özellikle hipokampusta görülür. Hipokampus, duygudurum kontrolünden sorumlu limbik sistem içinde yer almakta olup aynı zamanda öğrenme ve bellekle ilgili işlevler, hipotalamo-adrenal eksen ve vejetatif süreçlerle de ilişkilidir. Ayrıca Neokortekste kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesi işlemi olan bellek birleştirilmesinde de önemli bir rolü vardır (71,72). Sol hipokampus özellikle epizodik hafıza ile ilişkili iken, sağ hipokampus spatial hafıza ile ilişkilidir (45). Amigdala çeşitli durum ve koşullara bağlı olarak korku, öfke, mutluluk gibi duygu durumlarının işlenmesinde görev alır ve hipokampal hafızayı da modüle edebilir. Amigdala aynı zamanda stres hormonlarının salınımı yolu ile indirekt olarak uzun dönem hafızayı (long-term memory) düzenleyebilir (45).

Depresyon gibi kronik stres yaratan durumlarda, duygu durum bozukluklarında nöron ve gliaların boyut ve sayılarında azalma, prefrontal korteks, hipokampus ve striatumdaki gri alan hacimlerinde azalma gösterilmiştir (73,74). Her türlü zihinsel egzersiz ile hipokampus hacminde ve nörogenezde artma görülürken Major Depresif Bozukluk (MDB) ve

stresle ilişkili durumlarda hipokampus hacminde ve nörogenezde azalma olduğu çeşitli görüntüleme yöntemlerinde gösterilmiştir (75-78).

Nöroplastisite ile mevcut sinapsların etkinliğinin artması veya azalması, ortadan kalkması ya da yeni sinaps oluşumu, dendritlerde dallanmanın artması, azalması dendritlerin boylarında uzama veya kısalma olması, yeni nöron oluşumu (nörogenez) veya nöron ölümü (apoptoz), nöronların stres altında dirençlerinde değişiklikler olması ve uyarılara karşı sinaps sonrası potansiyellerinde değişiklikler olması ve nörotrofik faktörlerin etkinliklerinde değişikliklerin ortaya çıkması gibi nöron, dendrit, sinaps ve nörotrofik faktörlerin bir kısmında veya tümünde değişikliklerle yeniden şekillenme meydana gelebilir (9,69). Yani kısaca nöroplastisite sinir sisteminin kendini yenileme yeteneği, çevresel uyarılara göre sinir hücre ve sinaps oluşması ile öğrenme, hatırlama ve unutma yetilerinin şekillenmesi şeklinde tanımlanabilir (45,66).

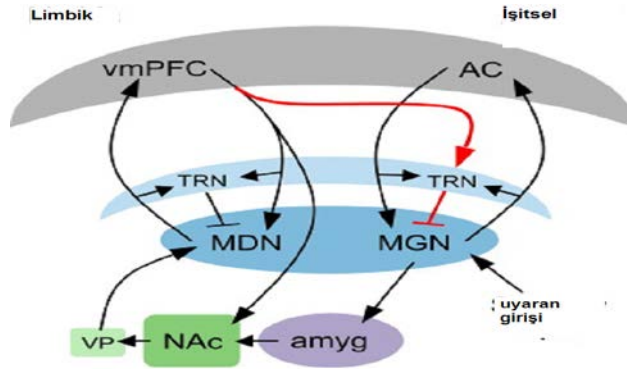
## **II. 2.1 Nöroplastisite ve Tinnitus**

Nöroplastisite ile beyin dinamik ve şekillendirilebilir bir durumdadır. Santral reorganizasyon moleküler ve hücresele seviyede başlar ve santral sinir sisteminin tümünde değişikliklere neden olabilir. Plastisite, yapıcı, kompensatuar, adaptif veya tinnitus durumunda olduğu gibi maladaptif olabilir (79).

Subjektif tinnitusun çoğu formunda görülen fizyolojik anormalliklerin anatomik lokalizasyonu genelde santral sinir sistemindedir ve nöral plastisitenin bir sonucu olarak meydana gelen değişikliklerdir (80). Tinnitusun santral orjinli olduğu fikri, işitsel sinir kesisinden sonra tinnitusun devam etmesi durumuna dayandırılmaktadır (81).

Akustik çevre aynı zamanda işitsel olmayan limbik sistem gibi beyin bölgelerini de etkiler. Hipokampus ve amigdala limbik bölge içinde yer alan iki majör yapıdır ve direk ya da indirek santral işitsel sistemden nöronal

sinyal alırlar (45,82). Amigdala, duysal fonksiyon, davranış veya otonom/ endokrin cevaplara ilaveten eksternal duysal uyarıların değerlendirilmesi fonksiyonlarına da sahiptir. Amigdala işitsel talamus (medial geniculate body) ve işitsel korteksten nöronal uyarı alır. Bu durum, körler üzerinde yapılan bir çalışmada, ses uyarısına görüntüleme yöntemleri ile güçlü amigdala cevabının alınması ile gösterilmiştir (83). Ses veya ses yokluğunda hipokampüste çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Yapılan bazı hayvan deneylerinde yüksek sesin hipokampal nörogenezisi bozduğu gösterilmiştir (84). İşitsel ve limbik sistem arasındaki fonksiyonel ve anatomik anormallikler fonksiyonel magnetik rezonans görüntüleme yöntemleri ile gösterilmiştir. Tinnitusu olan kişilerde tinnitus frekansına yakın frekanstaki seslerde limbik yapılarda ve prefrontal kortekste yapısal farklılıklar görmüşlerdir (85).



Şekil-1: İşitsel ve limbik sistem şemantik gösterimi (85)

vmPFC: ventromedial prefrontal korteks, AC: işitsel korteks, TRN: talamik retiküler nükleus, MDN: medial dorsal nükleus, MGN: medial genikulat nükleus, amyg: amigdala, NAc: nükleus akumbens

Tinnitus genelde işitme kaybı ile birlikte görülür ve işitme kaybını takiben ortaya çıkan frekansın kortikal ifadesinde meydana gelen değişiklik istenmeyen yan etki olarak tinnitusa yol açabilir (86,87). Nöral plastisitenin en güçlü düzenleyicisinden biri sinyal yokluğudur ve işitme kaybı olanlarda tinnitusun görülmesi nöral plastisiteyi ortaya koyan önemli göstergelerden biridir (88). Sinyal yokluğunda kortikal ve subkortikal nöral ağı



uyarılabilirliği artarak spontan ateşlemenin artmasına yol açar. Bu patolojik aktivite, tinnitusun hayali algısını (phantom sensory) oluşturabilmektedir (89).

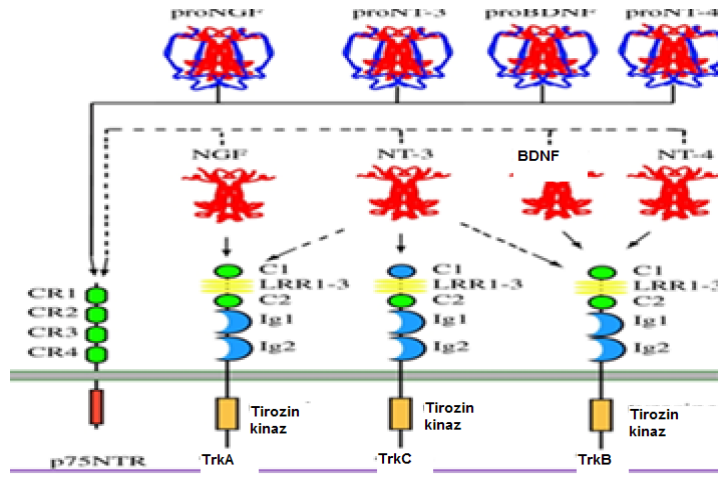
Nöroplastisite uyarılma ve inhibisyon arasındaki dengeyi değiştirerek santral sinir sisteminin spesifik parçalarının yeniden düzenlenmesine ya da santral sinir sistemine bilgilerin klasik olmayan yollar ile iletilmesine neden olabilmektedir (88).

Çeşitli çalışmalarda tinnitusun bazı formlarının klasik olmayan işitsel yolların tutulumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu klasik olmayan işitsel yollar primer işitsel serebral korteksi bypass ederek limbik yapılar ile bağlantı kurulmasına yol açmaktadır (86).

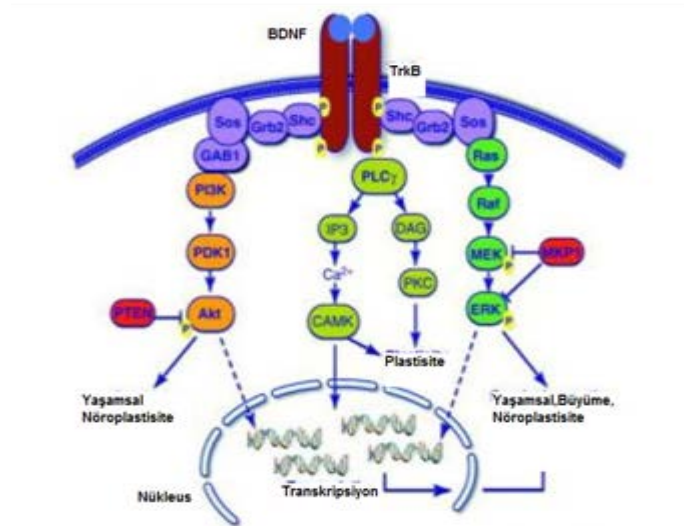
## **II.3.BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR(BDNF)**

### **II.3.1.Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF)**

Nörotrofik faktörler, nöronların gelişimi ve korunmasında ayrıca nöronların büyümesinin desteklenmesi, nöronal hayatta kalımın sürdürülmesi, morfoloji ve farklılaşmasının sağlanmasında ve hücre ölümü üzerine inhibitör etki gösteren, nöral plastisite açısından oldukça önemli olan moleküllerdir (90). Nöron Büyüme Faktörü (NGF), Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), Nörotrofin 3 ve 4 (NT3 ve NT4) sinir sisteminde etkilerini en çok gösteren ve işlevleri en çok bilinen nörotrofik faktörlerdir (66). Nörotrofik faktörler iki değişik reseptör üzerinden etki gösterirler; tirozin kinaz reseptörleri (Trk) ve daha düşük bağlanma gösterdikleri pan-nörotrofik reseptör p75'tir. P75, Trk reseptörleri ile kompleks bir yapı oluşturarak sinyal iletimini modüle eder. Pronörotrofinler, p75 nörotrofik reseptör'e (p75 NTR) bağlanırlar. Matür nörotrofinler hem p75 NTR reseptörüne hemde spesifik tropomyosin-related kinase- tirozin kinaz A, B ve C (Trk A, Trk B ve TrkC ) reseptörlerine bağlanırlar (91-93)(Şekil-2). Bu sinyal yollarının her biri gen transkripsiyonunu düzenlerler (94) (Şekil-3).



Şekil:2 Nörotrofinler ve reseptörleri (90)



Şekil-3 Trk reseptör aracılığı ile olan sinyal yolu (94)

BDNF, beyinde özellikle serebral korteks ve hipokampüste yaygın olarak bulunur ve ağırlıklı olarak nöronlarda sentezlenir. BDNF trombositlerde depolanmıştır. SSS ve serum BDNF konsantrasyonu arasında sıkı bir ilişki vardır (95,96). Beyin ve Serum BDNF seviyelerinin benzer değişiklikler gösterdiği hayvan deneylerinde ortaya konmuştur (95). BDNF, immatür

nöronların büyümesi ve farklılaşması, nöronların yaşamlarını sürdürmesinde, onların toksik zedelenmelerden korunmasında, dentrit ve sinapsların gelişmesinde, apoptozisin inhibe edilmesinde yani nöronal plastisitenin modüle edilmesinde majör öneme sahip nörotrofik faktördür (97).

BDNF, Trk- B reseptörü üzerinden etki eder ve reseptörlerine bağlandıktan sonra, reseptörleri ile beraber hücre içine alınırlar. Trk-B reseptörünün uyarılması Mitogen-activated protein kinases/ Extracellular signal-regulated kinases ( Ras/MAPK/ERK) döngüsünü ve fosfatidil inozitol-3 kinaz/Akt yol reaksiyonlarını kapsayan bir dizi büyüme ve sağkalımı etkileyen hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Ras-MAPK sinyal yolu, transkripsiyon faktörü olarak görev yapan nükleer bir protein olan cAMP responding element binding protein (CREB) fosforilasyonunu aktive eder (pCREB). pCREB bazı proteinlerin genetik transkripsiyonunu aktive eder ve böylece nöroplastisite için gerekli olan proteinlerin üretimi artar (98-100). pCREB'in işlevlerinde azalma olmasının BDNF eksikliğine katkısı olabileceği bildirilmiştir (101). Mitokondri zarı üzerinde proapoptotik ve antiapoptotik proteinler vardır ve bunlar arasındaki denge nöronların hayatta kalımı açısından önemlidir. Bcl-2 ailesi üyelerinden bcl-2 antiapoptotik etkiye sahip olup mitokondri dışı membranında bulunur. BDNF ve diğer nörotrofinler MAPK sinyal yolunun aktivasyonu ile, hem yeni sinaps oluşumlarına katkı sağlar hemde pCREB yoluyla proapoptotik protein olan Bcl-2 associated death promoter protein-Bcl-2 bağımlı ölüm destekleyici protein (BAD) yapımını engeller. Aynı zamanda majör antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunu arttırarak apoptozu inhibe eder (90,102,103). Bir nöronun yaşamını devam ettirmesi için uyarıcı alması ve sinaptik işlevlerine devam etmesi gerekir. Uyarıcı alan nöronlarda BDNF yapım ve salınımında artış izlenmiştir (96). BDNF, Noradrenerjik ve serotonerjik nöronların gelişimini de destekler ve onları toksik zedelenmelerden korur. BDNF uygulandığında dentrit ve sinapslarda gelişiminin arttığı yapılan çeşitli hayvan deneylerinde gösterilmiştir (66,104-106).

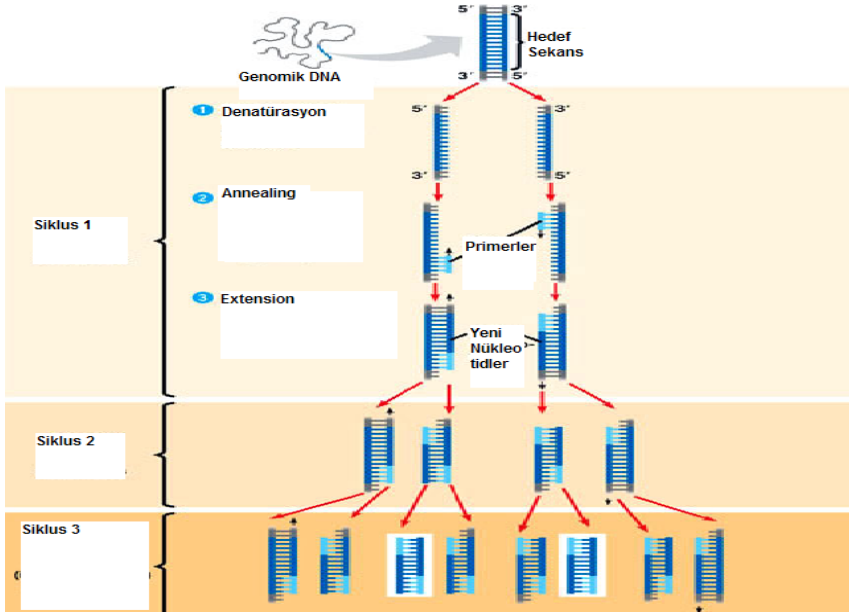
### **II.3.2. Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP)**

Populasyonda tekrarlayan ve yaygın şekilde görülen DNA varyasyonlarına polimorfizm denir. Bir varyasyonun polimorfizm olarak adlandırılabilmesi için, populasyonda tipik olarak %1 veya daha fazla oranda görülmesi gerekir. DNA dizisinde en sık görülen polimorfizmler, tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP: Single Nucleotide Polymorphism). SNP, genomda tek bir nükleotidde (A,T,C veya G) meydana gelen değişim ile ortaya çıkan DNA varyasyonlarıdır. Ortalama her 300 nükleotidde bir SNP gözlenir bu da bir genomda yaklaşık 10 milyon SNP bulunacağı anlamına gelmektedir. Bu değişimler kodlama bölgesinde (ekzon) veya kodlama yapılmayan bölgelerde (intron, promotor bölge) görülebilir. Tek nükleotid polimorfizmleri evrimde iyi korunmuşlardır. Nesilden nesile çok fazla değişim göstermezler. Bu sebeple populasyon çalışmalarında marker olarak kullanılabilirler. SNP'lerin çoğunun herhangi bir hastalık yapıcı etkisi bulunmamasına rağmen genin fonksiyonunu etkilediği durumlarda veya bazı çevresel faktörlerin de etkisi ile hastalıklara yatkınlığın ortaya çıkmasında katkısı olabilir (106). Bunun yanında SNP'ler ilaç yanıtları ve toksin gibi bazı çevresel faktörlere karşı oluşan hassasiyette de etkilidirler. Tüm bu nedenlerden dolayı hastalıkların tanılarının belirlenmesinde SNP araştırmaları önem kazanmaktadır (107).

### **II.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

1985 yılında bulunan PZR, belirli hedef DNA dizilerini invitro ortamda enzimatik olarak çoğaltılması için uygulanan bir işlemdir. Üç aşamalı 25-35 döngüden oluşan PZR sırasıyla, çift iplikli DNA ipliklerinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyon), ardından hedef bölgenin çoğaltılması için DNA zincirlerinin her birine komplementer olarak tasarlanan iki oligonükleotid primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon, annealing) ve enzimatik olarak (yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz-

Thermophilus aquaticus=Ta $\alpha$  polimeraz) zincir uzaması ve DNA'ların sentezlenmesi işlemidir. Günümüzde belirli yazılım programları ile tüm bu işlemleri gerçekleştiren thermocycler adı verilen PZR cihazları kullanılmaktadır (Şekil-4)(106,108)



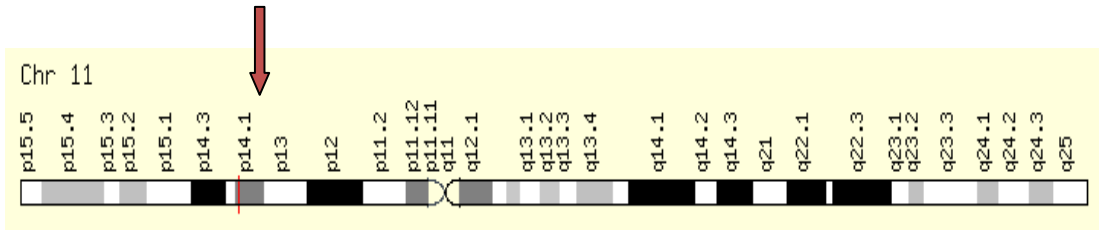
Şekil-4. Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR)

RFLP; Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, Restriksiyon endonükleazlar ile çift zincirli DNA'nın restriksiyon bölgeleri olarak bilinen sadece spesifik baz dizilerinin tanınarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Restriksiyon endonükleazlar, 200 den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan enzimlerdir. DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir. RFLP yöntemi; PZR ile DNA izolasyonu,ve elde edilen PZR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi

sonrasında kesilen fragmanların jel elektroforez ile ayrımı ve görüntülenmesi basamaklarından oluşur (106,108).

### II.3.4. BDNF Geni ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri

BDNF geni, 11. kromozomun kısa kolu (p) üzerinde (11p14,1) yaklaşık 70 kb uzunluğundadır (Şekil-5)(109-112).



Şekil-5. Kromozom 11 üzerinde BDNF gen lokalizasyonu (109).

BDNF gen proteolitik olarak matur proteine dönüşen öncül bir peptit olan pro BDNF'yi kodlar (113).

BDNF geni üzerinde çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır. BDNF gen tek nükleotid polimorfizmlerinin, BDNF serum düzeyindeki değişikliklere etkileri, kronik tinnitusa etkileri ve [rs6265 (Val66Met), rs2030324 ve rs1491850] polimorfizmlerinin işitsel uyarılmış potansiyel test (BAER) sonuçlarındaki değişimler ile ilişkisi üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar vardır (10-12,24).

rs6265 polimorfizminde 196 numaralı nükleotidde Guanin-Adenin(G/A) değişimi meydana gelir ve bu değişiklik sonucunda kodonun 66. pozisyonunda valin-metiyonin aminoasid (val66met) değişimi ortaya çıkar (113,114).

Val66met polimorfizminin, prefrontal ve hipokampal anatomi ve fonksiyonda olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır. BDNF geni Met allel taşıyıcısı sağlıklı kişilerin daha küçük hipokampal hacime sahip oldukları ve

Major Depressif Bozukluğa (MDB) yatkınlıklarının olabileceği ifade edilmiştir (115,116).

BDNF Val66Met polimorfizminin BDNF sekresyonunu etkilediği ve aynı zamanda parkinson (özellikle hastalığın şiddeti ve hastalarda kognitif bozulma ile ilişkisi olabileceği) alzheimer (hastalığın seyrinde görülebilen psikotik semptomlarla ilişkisi olabileceği) ve epilepsi gibi çeşitli santral sinir sistemi hastalıkları ile şizofreni, bipolar hastalık, obsesif kompulsif bozukluk gibi birçok psikiyatrik hastalıkla ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (72,117-122).

Ayrıca val66met polimorfizminin yüksek ses ile aktive edilen işitme potansiyeli (loudness dependence of auditory evoked potentials-LDAEP) değişiklikleri ile ilişkisi gösterilmiştir (12).

BDNF geninin kodlamayan-intronik bölgesinde bulunan rs2030324 polimorfizmi ve BDNF genin promoter bölgesinde bulunan rs1491850 polimorfizmlerinin yüksek ses ile aktive edilen işitme potansiyeli LDAEP değişiklikleri ile ilişkisini gösteren çalışma dışında, rs1491850 polimorfizminin, duygudurum bozuklukları ve MDB hastalarında antidepressan tedavilere yanıt ile ilişkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (12,122,123). rs2030324 polimorfizminin şizofren hastalar, astım hastaları ve nikotin bağımlısı kişilerde bu durumlara yatkınlıklarla ilişkisinin olabileceği bildirilmiştir (124,125).

### **II.3.5. BDNF ve Tinnitus**

Nöral plastite açısından önemli faktörlerden birisi olan BDNF, nöronların büyümesi, farklılaşması, yaşamlarını sürdürmesinin, iç kulak duyu epiteli dahil işitsel yolun ve işitsel uyarıların işlendiği santral sinir sistemini kapsayan yapıların gelişmesinde anahtar rol oynayan nörotrofik faktördür (6,9,10,13).

BDNF embriyonik gelişim süresince spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek nöronal hücre ölümünü önlediği ve gürültüye bağlı saçlı hücre kaybını ve ekzotoksin ve cisplatinin toksik etkilerine karşı iç kulağı koruduğu saptanmıştır. Kronik süperatif otitis medianın en yaygın nedeni olan ve ratlarda sensorinöral işitme kaybına neden olduğu gösterilmiş olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın ekzotoksinine maruziyetten sonra tek doz BDNF verilmesi ile ekzotoksinin sebep olduğu Auditory Brainstem Response (ABR) da meydana gelen bozulmanın önlendiği görülmüştür (126). Yine yapılan bir başka çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksinine maruz bırakılan sıçanlara, maruziyetten 12 saat sonra verilen BDNF ile işitme kaybının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (127).

Akustik travma ile sistemik veya kokleaya lokal olarak uygulanan salisilatın tetiklediği tinnitusta koklea spiral ganglion nöronlarında BDNF mRNA ekspresyonunun arttığı çeşitli hayvan çalışmalarında ortaya konmuştur. Bu nedenle tinnitusta BDNF düzeyinde artış tespit edilmesi, santral işitsel sistemde BDNF artışını gösteriyor olabilir (12,65,128-130). Genetik duyarlılık ve çevresel faktörlerin etkilerinin biraraya gelmesi ile hipokampal nöronlar strese daha duyarlı hale gelmektedir (131). Tinnitus ile depresyon gibi duygu durum bozuklukları arasında yakın ilişki vardır ve birlikte görülme oranı yaklaşık % 30 lara kadar çıkmaktadır (132). BDNF düzeylerinin tinnitus ve depresyon, stres ile ilişkili olabilecek distimik bozukluk, konversiyon bozukluğu ve yaşam krizlerine bağlı intihar girişimleri gibi psikiyatrik bozukluk ve durumlarda azaldığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (13,14-17).

Primer işitsel nöronların kortikal nöronlar ile aynı N-Metil D-Aspartat (NMDA) bağlı plastisiteyi paylaştığı görülür. Kortikal nöronlarda bu özellik hafıza formasyonuna yol açarken periferde tinnitusun başlamasına yol açabilir (133). Glutamat sinyal yolağında meydana gelen değişiklikler işitsel kortekste spontan nöronal ateşlenme üzerine etkili olabilir (6). BDNF ve glutamat sinaptik iletişim ve nöronal gelişim için ortak bir düzenleme içindedirler (134).



Bütün bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler tinnitus ile BDNF gen polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyleri arasında bir korelasyon olabileceğini düşündürmektedir. Buradan hareketle yaptığımız çalışmada, BDNF polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyi değişiklikleri ile tinnitus arasındaki ilişki incelenerek, BDNF değişikliklerinin tinnitus patofizyolojisinde herhangi bir rolü olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

### **III. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **III.1.Çalışma Grubu**

Çalışmaya, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve en az 3 aydır devam eden tinnitusu olan, 18 - 55 yaş aralığında, toplam 65 hasta (20 kadın, 35 erkek) dahil edildi. (iki aydan kısa süren tinnitus akut, iki aydan fazla süredir devam eden tinnitus kronik olarak tanımlanır) (27). Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara onam formları imzalatıldı. Bu hastalardan 13 tanesi çalışma kriterlerine uygun olmadığı (DSMIV kriterlerine göre Major Depressif Bozukluk-MDB tanısı alan hastalar) ve odyolojik testleri tamamlanamadığı için çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Yerel Etik kuruldan onay alındı.

Kontrol grubu olarak herhangi bir KBB ve sistemik rahatsızlığı saptanmayan 18-55 yaş aralığında 13 kadın ve 29 erkek olmak üzere toplam 42 denek çalışmaya dahil edildi.

#### **III.2.Çalışma Planı**

Belirtilen özelliklere uygun olan olgular için ilk olarak Kişisel Bilgi Formu, Celal Bayar Üniversitesi KBB polikliniği Hasta Bilgi Formu dolduruldu. Olgulara odyolojik değerlendirmeler hakkında bilgi verildi. Sonrasında odyolojik değerlendirmeler uygulandı ve gerekli veriler elde edildi.

Psikiyatri polikliniğinde DSM-IV eksen I bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme ölçeği (SCID-I) kullanılarak psikiyatrik tanılarının ayırıcı tanısı yapıldı.

Olgulardan genetik analiz için 5-10 cc arası venöz kan alınarak EDTA'lı tüpler içerisinde -20 derecede derin dondurucuda, test edilene kadar muhafaza edildi.

Ayrıca olgulardan ELİSA yöntemi ile BDNF serum protein düzeyinin analizi için jelli tüp içine alınan 8-10 cc venöz kan +4 derecede 3600 devirde 10 dk santüfuj edildi ve iki ayrı ependorf tüpe alınarak -80 derecede test edilinceye kadar muhafaza edildi.

### **III.3.Kullanılan Klinik Değerlendirme Araçları**

#### **III.3.1. Sosyo-demografik bilgi ve görüşme formları**

- Klinik Bilgi Formu: Hastalara Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı polikliniğinde rutinde kullanılan ve olguların ilk başvurusunda doldurulan, klinik tanıya yönelik bilgiler, sistemik hastalıkların varlığı ve KBB hekimi tarafından yapılan otoskopik muayene bulgularının yer aldığı form dolduruldu. (ek 1)

- Kişisel Bilgi Formu: Hastalara adı- soyadı, yaş, cinsiyet, eğitim, meslek, medeni durumu, çocuk sayısı, adres-telefon ve tinnitus ile ilgili bilgileri ile 0'dan 10'a kadar artan bir cetvel üzerinde, olgunun her soruya verdiği subjektif algı düzeyini ölçen 'Visual Analogue scale' (VAS) sorularından oluşan bilgileri içeren form dolduruldu (ek 2).

- Tinnitus Engellilik Anketi (TEA): TEA formunda her bir soruda "evet", "hayır" ve "bazen" olmak üzere üç cevap seçeneği olup, olguların verdikleri cevapların puanlandırılması sırasıyla "4", "2", "0" puanları kullanılarak yapıldı. Anketten alınabilecek en düşük puan 0, en yüksek puan da 100 olacak şekilde ek-3 deki sınıflamaya göre değerlendirildi (Tablo-1)(135).

Tablo- 1 Tinnitus Engellilik anket değerlendirmesi

Grade 1	0-16	Zayıf	Sadece sessiz ortamlarda duyulur.
Grade 2	18-36	İlİmlİ	Çevre gürültüsü ile kolayca maskelenebilir ve aktivite ile unutulabilir
Grade 3	38-56	Orta	Arkadan gelen gürültüde fark edilmesine rağmen günlük aktiviteleri engellemez
Grade 4	58-76	Şiddetli	Hemen hemen her zaman duyulur, uykuyu böler ve günlük aktivitelere engel olabilir.
Grade 5	78-100	Felaket	Her zaman duyulur, uykuyu böler ve günlük aktivitelere engel olur

### III.3.2. Odyolojik değerlendirme

Odyolojik testler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Odyoloji birimi tarafından, interacoustics AC40 audiometer kullanılarak yapıldı. Saf Ses Ortalaması; 125-8000 Hz aralığında hava yolu işitme eşikleri Telephonics TDH39P hoparlör kullanılarak ve 500-4000 Hz aralığında, kemik yolu işitme eşikleri Radioear B71 vibrator kullanılarak ölçülmüş ve 500-1000-2000-4000 Hz eşiklerinin ortalamaları alınmıştır. Minimal Maskeleme, 5dB'lik artırımlarla şiddetin kademeli artırılması ile maske sesinin tinnitus sesini bastırıldığı seviye belirlendi

İşitme kaybı değerlendirilmesi; (136).

10dB-15 dB	Normal işitme
16 dB -25 dB	Çok hafif derecede işitme kaybı
26 dB -40 dB	Hafif derecede işitme kaybı
41 dB -55 dB	Orta derecede işitme kaybı
56 dB -70 dB	Orta- ileri derecede işitme kaybı
71 dB -90 dB	İleri derecede işitme kaybı
90 dB üzeri	Derin işitme kaybı

### **III.3.3. SCID-I**

Deneklerin depresyon düzeyleri ile ilgili bilgileri bir psikiyatri uzmanı tarafından uygulanan DSM-IV eksen I bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme ölçeği (SCID-I) kullanılarak elde edildi.

### **III.4.GENETİK ANALİZ**

Genetik analiz için hastalardan EDTA'lı tüpler içine alınan 5-10 cc arası venoz kan -20 °C derin dondurucuda, test edilene kadar muhafaza edildi. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu ve BDNF gen rs6265, rs1491850 ve rs2030324 polimorfizmlerinin çalışması yapıldı.

#### **III.4.1. Çalışmada kullanılan Cihazlar**

-20 derin dondurucu (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

Soğutmalı santrifüj (Hettich)

Santrifüj Hettich mikro 120)

Etüv (Nüve EN 500)

DNA Thermal Cycler (NyxTechnik ve SensoQuest)

Isıtıcı blok (Giosan-Dry block)

Vortex (Biosan Combispin)

Nanodrop (Maestro Gen)

Hassas terazi

Mikrodalga fırın(Premier)

Elektroforez tankı ve güç kaynağı (NyxTectik)

Elektroforez Görüntüleme cihazı (NyxTechnik)

Mikro pipetler

### III.4.2. Çalışmada kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyon kiti ( QIAGEN)

Primerler (Metabion)

dNTP mix (SolisBioDyne)

HotTaq DNA Polimeraz (5 unite/ µl)

Taq DNA polimeraz (SolisBioDyn)

MgCl<sub>2</sub> (SolisBioDyne)

PZR Buffer (SolisBioDyne)

Restriksiyon Enzimleri (NEB)

.PmlI



.AflIII



.AclI



Agaroz (Bioshop)

10 X TBE (Gibco)

100 bç DNA Ladder (Solis BioDyne)

Safe-T-Stain (SimplyBlue)

BDNF Elisa Kiti ( Millipore CYT306)

### **III.4.3. Çalışmada kullanılan Tamponlar**

#### **-Agaroz Jel Elektforezi Tamponları:**

Agaroz %2 ve %4 'lük;

2 ve 4 g agaroz

100 ml 1X TBE

#### **-TBE tamponu (10X) ;**

108 g Tris baz

55 g Borik asit

9.3 g EDTA

#### **-TBE tamponu (1X) ;**

100 ml 10X TBE tampon

900 ml distile su

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır

#### **-Yükleme tamponu;**

DNA loading dye (Solis BioDye)

#### III.4.4. Primer ve Enzimler

BDNF gen ekzon 2 deki rs6265 SNP (kromozomal pozisyon; 27636492 ), BDNF genin promoter bölgesinde bulunan rs1491850 SNP (kromozomal pozisyonu;27706301) ve kodlamayan intronik bölgesinde bulunan rs2030324 SNP (kromozomal pozisyonu;27683491) belirlemek için ileri ve geri olmak üzere her polimorfizm için iki primer kullanıldı (Tablo-2).

Tablo-2. Polimorfizmlere göre kullanılan primer dizileri ve enzimler

Gen	Snps	Primerler (5'→3' Sequence)	Enzim
BDNF	rs6265	F primer; 5' ACT GTC GAG AGC GTG AAT GG 3' R primer; 5' AGA AGA GGA GGC TCC AAA GG 3'	PmII
	rs1491850	F primer; 5' CAC TCC AAA CAT CAC ACA GCC 3' R primer; 5' ACC AAA GGG TTT CAG GAC ATT 3'	AfIII
	rs2030324	F primer; 5' GGA CCA GAG TAG TGA GCT AAC 3' R primer; 5' CAG CAG GGG AAT ATA AAG GTC 3'	AcII

#### III.4.5. DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamına giren tinnituslu bireylerin kanları EDTA'lı tüplere alındı. Kan örneklerinden hemen izolasyon yapılmayacak ise -20°C'de bekletildi. DNA örnekleri bekletilmiş ya da taze kandan test kitinin (QIAGEN) öngördüğü şekilde aşağıdaki işlemlerle izole edildi.

1. 1,5ml' lik ependorf tüpüne 200 µl kan örneği alındı.
2. 200 µl AL Buffer
3. 20 µl Proteinaz K
4. Vortexlenen örnek 56 °C de 15 dk ısıtıcı blokta bekletildi
5. 210 µl % 96 lık etanol ( etil alkol) ilave edildi ve vortexlendi



6. Örnekler spin kolona aktarıldı
7. 8000 rpm(rotatory per minute) de 1 dk santüfuj edildi
8. Filtreli kısım temiz tüpe alınarak üzerine 500 µl AW1 wash buffer ilave edildi
9. 8000 rpm de 1 dk santüfuj edildi
10. Filtreli kısım temiz tüpe alınarak üzerine 500 µl AW2 wash buffer ilave edildi
11. 8000 rpm de 1 dk santüfuj edildi
12. Filtreli kısım temiz tüpe alındı üzerine bir şey koymadan 14000 rpm de 2 dk santüfuj edildi
13. Bu arada elation buffer(AE Buffer) dan her hastaya 200 µl olacak şekilde ayrı bir ependorf tüpe alınarak 56 °C ısıtıcı blokta bekletildi.
14. Filtreli kısım ependorf tüpüne alındı üzerlerine AE Buffer dan hasta başına 200 µl olacak şekilde ilave edilerek 14000 rpm de 1 dk santüfuj edildi.
15. Filtreli kısım atıldı kalan ependorf tüpler PZR işlemine alındı.

#### **III.4.6. DNA nın çoğaltılması (Polimeraz zincir reaksiyonu-PZR İşlemi)**

BDNF nin hedef bölgelerini çoğaltılması için seçilen primerlere göre PZR reaksiyonlarının koşulları aşağıda belirtildiği gibi uygulandı;

- 1.PZR buffer (1X); 3 µl
- 2.MgCl<sub>2</sub> (1,5mM) ;1,8 µl
- 3.dNTP mix (0,2mM); 0.3 µl

- 4.Forward Primer(0,3µM); 0.45 µl
- 5.Revers Primer(0,3µM); 0.45 µl
- 6.Hot Taq DNA Polymerase(2,2 U); 0.44 µl
- 7.DNA; 4 µl
- 8.Su; 19,56 µl

PZR grade su ile 30 µl ye tamamlandı ve PZR işlemini gerçekleştirmek için, PZR cihazı (SensoQuest) aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı;

Tablo-3. PZR sıcaklık profili ve döngü sayısı

	Sıcaklık (Tm C <sup>0</sup> )	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	13 dk	1
Denaturasyon aşaması	95 °C	30 sn	38
Hibridizasyon aşaması	57°C	30 sn	38
Sentez (Uzama) aşaması	72°C	33 sn	38
Son sentez aşaması	72°C	7 dk	1

Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Bu şekilde elde edilen karışım tablo-3 de gösterildiği gibi PZR cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tepkime sonunda; rs6265 için 198bç, rs1491850 için 153bç ve rs2030324 için 92bç uzunluğunda PZR ürünü elde edildi.

#### III.4.7. PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü

PZR reaksiyonları ile elde edilen amplifikasyon sonuçlarının kontrolü için, %2 lik agaroz jel 1,5 cm kalınlıkta olacak şekilde hazırlandı ve elektrofrez tankına boşaltıldı, uygun tarak yerleştirildi. Polimerizasyonun tamamlanması

için en az 1/2 saat beklendi. Polimerizasyon sonrası tarak çıkarıldı ve 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler ilk kuyucuğa 10 µl marker(100 bç lik DNA Ladder) ve 10 µl örnek + 6 µl DNA Loading dye olacak şekilde jel kuyucuklarına yüklendi.

Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisini ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek 90 volt akımda 100 dk elektroforez cihazında yürütüldü. Süre sonunda jel çıkartılarak elektroforez görüntüleme cihazında UV ışığı altında görüntü alındı.

#### III.4.7. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

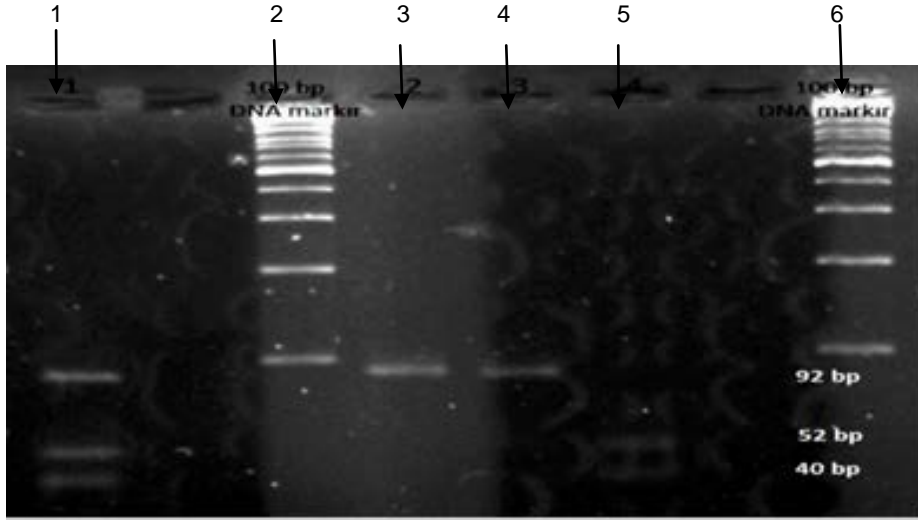
Ürünler her enzime uygun olmak üzere, 10X NE Buffer tampon çözeltisi, enzim, PZR ürünü ve steril distile su ile total reaksiyon volümü 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Her polimorfizm için kullanım kılavuzunda belirtildiği ve aşağıda tabloda (Tablo-4) verildiği gibi uygun ısı ve sürelerde inkübe ve inaktive edildi. Daha sonra kesim ürünleri agaroz jelde yürütülüp, görüntülendi ve kaydedildi (Şekil-2,3 ve 4).

Tablo-4. Polimorfizmlere göre RFLP için kullanılan enzimler, distile su ve PZR ürünü miktarları

	Enzim	PZR ürünü	NE buffer	Su	İnkübasyon	İnaktivasyon
Rs6265	0.8µlPmLI	10 µl DNA	4 µl	25,2 µl	37°C 15 dk	65°C 20 dk
Rs1491850	0.8µl AflIII	10 µl DNA	4 µl	25,2 µl	37°C 60 dk	80°C 20 dk
Rs2030324	0.8 µl AcLI	10 µl DNA	4 µl	25,2 µl	37°C 15 dk	-

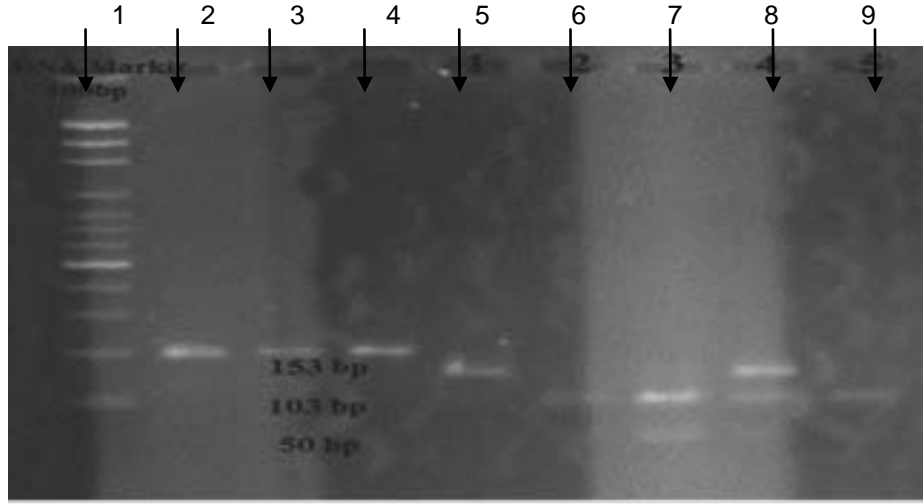
PCR ürünüde kesim için mutasyonu tanıyan AcI1 enzimi kullanıldı. %4'lük agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirildiğinde;

her iki allelede bu mutasyonu taşımayan (TT için homozigot) bireylerde kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde tek bir band (92bç-92bç), baz değişimini tek allelede taşıyan (TC için heterozigot) bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde ve diğerleri onun altında iki band (92bç-52bç-40bç), iki allelede de bu mutasyonu taşıyan (CC için homozigot) bireylerde iki band (52bç-40bç) olarak görüntülendi (Şekil-6).



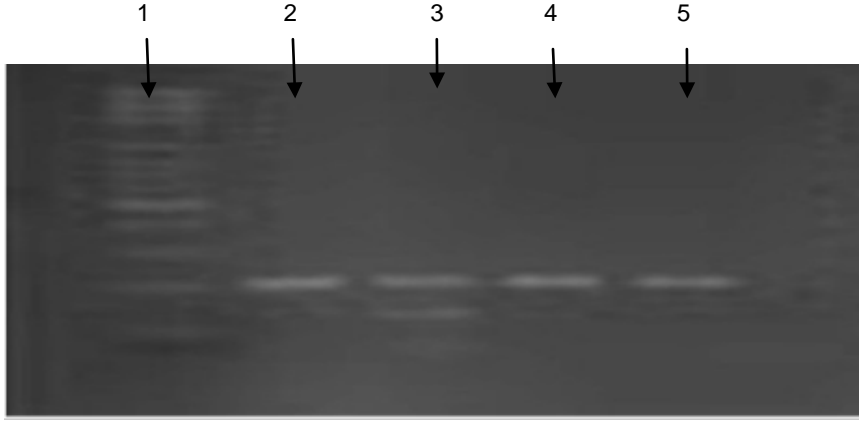
**Şekil 6.** BDNF geni rs2030324 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü (1:TC- 92 bç, 52bç, 40bç, 2: 100bç DNA marker, 3 ve 4: kesilmemiş PZR ürünü - 92bç, 5: CC- 52bç, 40bç, 6: 100bç DNA marker)

PCR ürününde kesim için mutasyonu tanıyan AflII enzimi kullanıldı. %2'lik agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirildiğinde; her iki allelede mutasyon taşımayan (TT için homozigot) bireylerde kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde tek bir band (153bç,153bç), baz değişimini tek allelede taşıyan (TC- heterozigot) bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde ve diğerleri onun altında iki band (153bç-103bç-50bç), iki allelede de bu mutasyonu taşıyan (CC için homozigot) bireylerde iki band (103bç-50bç) olarak görüntülendi (Şekil-7).



**Şekil-7.** BDNF geni rs1491850 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü (1: 100bç DNA marker 2,3,4,5: kesilmemiş PZR ürünü-153 bç , 6: CC -103 bç, 50 bç, 7: CC-103 bç, 50 bç, 8: CT-153 bç, 103 bç, 50 bç, 9: CC-103 bç, 50 bç)

PCR ürününde kesim için Pml1 enzimi kullanıldı (137). %2'lik agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirildiğinde; her iki allelede bu mutasyonu taşıyan (AA(met/met) için homozigot) bireylerde kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde tek bir band (198bç-198bç), baz değişimini tek allelede taşıyan (GA (val/met) için heterozigot) bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde ve diğerleri onun altında iki band (198bç-128bç-70bç) olarak görüldü ancak çalışmamızda iki allelede de (GG (val/val) için homozigot) kesim ürünü tespit edilmedi (Şekil-8).



**Şekil 8.** BDNF geni rs6265 polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü (1: 100bç DNA marker, 2: AA (met/met)-198 bç-kesilmemiş PZR ürünü; 3: GA(val/met)- 198 bç, 128bç, 70bç, 4 ve 5: AA (met/met)- 198 bç)

#### **III.4.8. Kesim ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü**

PZR reaksiyonları ile elde edilen RFLP sonuçlarını yürütmek için %2' lik agaroz jel 1,5 cm kalınlıkta olacak şekilde hazırlandı ve elektrofrez tankına boşaltıldı, uygun tarak yerleştirildi. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi. Polimerizasyon sonrası tarak çıkarıldı ve 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler ilk kuyucuğa 10 µl marker(100 bç lik DNA Ladder) ve 10 µl örnek + 6 µl DNA Loading dye olacak şekilde jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisini ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek 100 volt akımda 100 dk elektrofrez cihazında yürütüldü. Süre sonunda jel çıkartılarak elektrofrez görüntüleme cihazında UV ışığında görüntüsü alındı.

#### **III.5. ELİSA (Enzyme linked immunosorbent assay) YÖNTEMİ İLE BDNF SERUM DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ**

BDNF serum protein düzeyinin analizi için jelli tüp içine alınan 8-10 cc venöz kan +4 derecede 3600 devirde 10 dk santüfjüj edildi ve iki ayrı

ependorf tüpe alınarak -80 derecede test edilinceye kadar muhafaza edildi. ELİSA yöntemi ile BDNF serum düzeyleri eldesi çalışması yapıldı.

Hasta ve kontrol gruplarına ait serum BDNF düzeyleri ticari bir ELİSA kiti (CYT306, ChemiKine BDNF, Millipore, Billerica, U.S.A.) kullanılarak kitin içerisinde yer alan kılavuza uygun şekilde, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında sandviç ELİSA yöntemi ile ölçüldü. İnsan BDNF proteinine spesifik, fareden elde edilen monoklonal antikorlarla kaplanmış 96 adet kuyucuk içeren mikropolanın her bir kuyucuğuna farklı yoğunluklarda seyreltilmiş rekombinant BDNF içeren standartlar ve araştırılacak hasta ve kontrol örnekleri eklenerek, BDNF antijenlerinin antikorlar tarafından kuyucuklara sabitlenmesi sağlandı. Plak, 2-8 °C bir gece inkübe edildi. Sonrasında Wash Buffer yıkama tamponu ile dört kez yıkama işlemi yapılarak antikora bağlanmayan örnek içeriği ortamdaki uzaklaştırıldı. Ardından, biyotinlenmiş monoklonal mouse anti-Human antikorları kuyucuklara yüklendi, sonrasında dört kez yıkama ve ardından HRP (Horseradish peroksidaz) ile işaretlenmiş streptavidin kuyucuklara eklendi, dört kez yıkama yapılarak bağlanmayan antikor ve enzim ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklara TMB/E (tetrametil benzidin )substratı eklenerek, 15 dakika enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi sağlandı. Reaksiyon sonucu renklenme(mavi renk) meydana geldi. Son olarak reaksiyon stop solusyonu (HCl) ile durduruldu. Bu esnada ürün mavi renkten sarı renge döndü ve oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm'de ölçüldü. Kite ait analiz-içi değişim (intra-assay varyasyon) katsayısı (CV) %3.7 (125pg/ml), analiz arası değişim (inter –assay varyasyon) katsayısı (CV) %8.5 (125pg/ml) 'dur. Kitin duyarlılığı(sensitivity) 7.8 pg/mL dir. Kitin algılama aralığı (range of detection) 7.8pg/ml-500 pg/ml dir.

### **III.6. VERİ GİRİŞ VE İSTATİKSEL ANALİZ:**

Elde edilen veriler 'SPSS-WINDOWS 15 paket programına aktarıldı ve One-way ANOVA ve Ki-kare ( $X^2$ ) testleri uygulandı.

#### IV. BULGULAR

Tinnitus ile BDNF gen ve serum düzeyi arasındaki ilişkiyi inceleyen bu çalışmada PZR-RFLP yöntemi ile BDNF geni için 3 adet polimorfizm ve serum düzeyi için ELİSA yöntemi ile BDNF serum düzeyi incelenmiştir. 52 tinnitus ve 42 kontrol grubunun genotiplemesi yapılmıştır.

Hasta grubu 22-55 yaş, kontrol grubu ise 24-55 yaş aralığında olup ortalama yaş hasta grubu için  $44 \pm 11$ , kontrol grubu için  $41 \pm 10$  dur. (Tablo-5)

Tablo-5. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve cinsiyete göre dağılımları (One-way Analysis of Variance= ANOVA) ( $p > 0.05$ )

Grup	Cinsiyet	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	S.Sapma	P
Tinnitus	Kadın	19	22	55	42,7	10,2	0,1264
	Erkek	33	23	55	44,1	11,0	
	Toplam	52	22	55	43,6	10,7	
Kontrol	Kadın	13	24	55	38,5	7,5	
	Erkek	29	23	55	39,7	10,7	
	Toplam	42	24	55	39,3	9,8	

Hasta grubun %36,5 (19) kadın, %63,5 (33) ise erkek bireyden; Kontrol grubu ise 13 (%30,7) kadın, 29 (%69,1) erkekten oluşmaktadır. (Tablo-6)



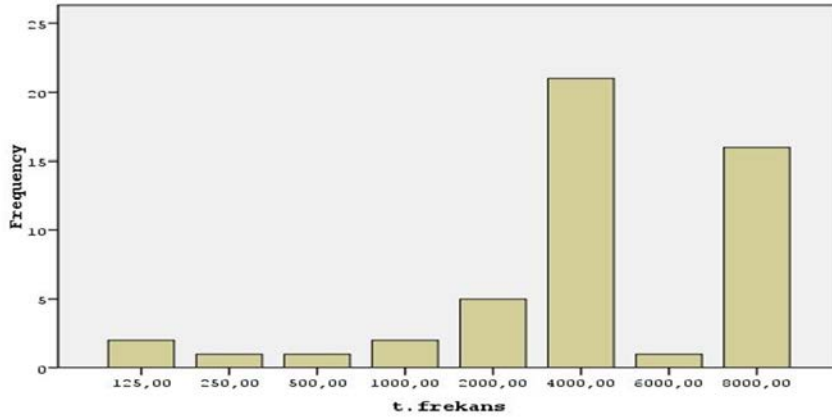
Tablo 6. Tinnitus hasta ve kontrol gruplarının cinsiyetlere göre dağılımı

Grup	Hasta	ortalama	SD	Kontrol	Ortalama	SD
Kadın	19	42,8	10	13	38,5	7,5
Erkek	33	44,1	11	29	39,7	11

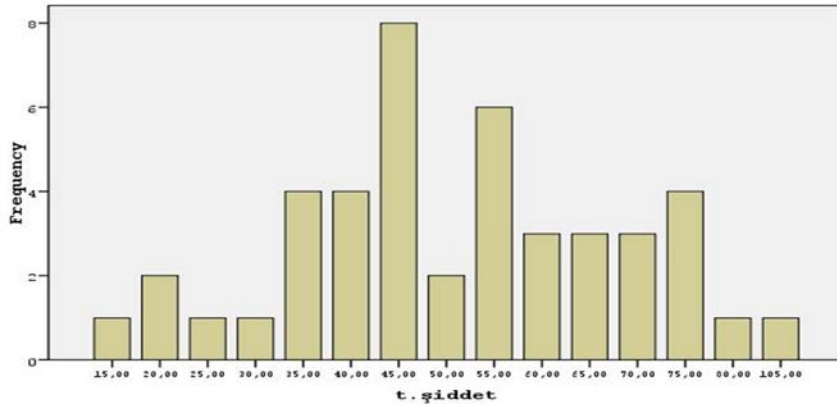
Hastaların, 26'sı bilateral, 21'i sol kulak ve 5'i sağ kulakta tinnitusu lokalize etmektedir. (Tablo-7)

Tablo 7. Tinnitus lokalizasyon dağılımı

		n
Bilateral		26
Unilateral	Sol	21
	Sağ	5



Şekil-9. Tinnitus frekans dağılımı



Şekil-10. Tinnitus şiddet dağılımı

Hasta grubunda serum BDNF düzeyi ortalama 1374pg/ml+326, kontrol grubunda 1640pg/ml+ 193 olup istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. (One-way Analysis of Variance = ANOVA)( $p < 0.0001$ ) ( Tablo-8).

Tablo 8. Hasta ve Kontrol gruplarında serum BDNF oranları

	Grup	Cinsiyet	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	S.D	p
BDNF	Hasta	Kadın	19	644,9	1832,8	1398,6	358	<0,0001
		Erkek	33	699,8	2110	1360,2	312	
		Toplam	52	644,9	2110	1374,2	326	
	Kontrol	Kadın	13	1394,5	1844,1	1673,6	117	
		Erkek	29	1178,7	2224,1	1625,4	219	
		Toplam	42	1178,7	2224,1	1640,0	193	

Yapılan genotip analizi sonucunda; BDNF gen polimorfizmlerinin genotip dağılımı ;

rs6265 için: hasta grubunda; %84,6 GA, %15,4 AA, % 0 GG; kontrol grubunda ise; %81 GA, %19 AA, olarak saptandı.

rs1491850 için: hasta grubunda; %32,7 CC, %49,9 CT, %17,4 TT, kontrol grubunda; %30,9 CC, %40,5 CT, %28,6 TT

rs 2030324 için: hasta grubunda; %23,4 CC, %42 CT, %34,6 TT, kontrol grubunda; %23,8 CC, %42,8 CT, %33,4 TT olarak saptandı.

Allel frekansları ise: hasta grubunda;

rs6265 için; G allel frekansı; %57,7, A allel frekansı; %42,3 dür.

rs1491850 için; T allel frekansı; %42,3, C allel frekansı; %57,7

rs 2030324 için; T allel frekansı; %55,6 C allel frekansı, %44,4 olarak bulundu.

Kontrol grubunda;

rs6265 için; G allel frekansı; %59,5, A allel frekansı; %40,5dür.

rs1491850 için; T allel frekansı; %48,8, C allel frekansı; %51,2

rs 2030324 için; T allel frekansı; %54,8, C allel frekansı, %45,2 olarak bulundu.

Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel dağılımları açısından fark yoktur. (ki-kare testi)(  $p > 0.05$ )(Tablo-9).

Tablo-9. Hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel dağılımı

SNP	Gruplar	Dağılım	AA	GA	GG	Toplam	Allel(%)	
							G	A
Rs6265	Hasta	n	8	44	-	52	57,7	42,3
		%	15,4	84,6		100,0		
	Kontrol	n	8	34	-	42	59,5	40,5
		%	18,7	81,3	-	100,0		
Rs1491850	Gruplar	Dağılım	TT	TC	CC	Toplam	T	C
	Hasta	n	9	26	17	52	42,3	57,7
		%	17,4	49,9	32,7	100,0		
	Kontrol	n	12	17	13	42	48,8	51,2
		%	28,6	40,5	30,9	100,0		
	Rs2030324	Gruplar	Dağılım	TT	TC	CC	Toplam	T
Hasta		n	18	22	12	52	55,6	44,4
		%	34,6	42	23,4	100,0		
Kontrol		n	14	18	10	42	54,8	45,2
		%	33,4	42,8	23,8	100,0		

Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından genotip ve allel dağılımlarının istatistiksel anlamı yoktur (ANOVA)(  $p>0.05$ )(Tablo-10).

Tablo 10. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete dayalı genotip ve allel dağılımı

		Rs6265							
		GG		GA		AA		Toplam	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Kadın	Hasta	5	9,8	14	26,1	-	-	19	35,9
	Kontrol	2	5,2	11	26,2	-	-	13	31,4
Erkek	Hasta	3	5,6	30	58,5	-	-	33	64,1
	Kontrol	6	14	23	55	-	-	29	69
		Rs1491850							
		TT		TC		CC		Toplam	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Kadın	Hasta	4	7,8	9	17,3	6	11,6	19	36,7
	Kontrol	2	4,7	8	19,2	3	7,1	13	31
Erkek	Hasta	5	9,6	17	32,6	11	21,1	33	63,3
	Kontrol	10	23,9	9	21,3	10	23,8	29	69
		Rs2030324							
		TT		TC		CC		Toplam	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Kadın	Hasta	7	13,2	7	13,2	5	10,1	19	36,5
	Kontrol	3	7,2	8	19	2	4,8	13	31
Erkek	Hasta	11	21,4	15	28,8	7	13,3	33	63,5
	Kontrol	11	26,2	10	23,8	8	19	29	69

Hasta grubunda rs6265, rs1491850 ve rs2030324 ile serum BDNF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur (One-way Analysis of Variance = ANOVA)( $p>0,2247$ ) (Tablo-11)

Tablo-11. Hasta grubunda polimorfizmlerinin serum BDNF düzeyleri ile karşılaştırılması

Snp	Genotip	Cinsiyet	N	BDNF-ortalama	S.Sapma
<b>Rs6265</b>	AA	Kadın	5	1123,1	297
		Erkek	3	13330,6	212
	GA	Kadın	14	1496,9	332
		Erkek	30	1363,1	323
	GG	Kadın	-	-	-
		Erkek	-	-	-
	Toplam	52			
<b>RS1491850</b>	TT	Kadın	4	1166,1	201
		Erkek	5	1216	388
	CT	Kadın	9	1581,1	170
		Erkek	17	1377	345
	CC	Kadın	6	1279,6	519
		Erkek	11	1399,8	218
	Toplam	52			
<b>RS2030324</b>	TT	Kadın	7	1127,9	367
		Erkek	11	1231,7	403
	CT	Kadın	7	1542,3	182
		Erkek	15	1408,5	266
	CC	Kadın	5	1576	346
		Erkek	7	1458,6	187
	Toplam	52			

Kontrol grubunda rs6265, rs1491850 ve rs2030324 ile serum BDNF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur (One-way Analysis of Variance = ANOVA)( $p>0,3264$ ) (Tablo-12).

Tablo-12. Kontrol grubunda polimorfizmlerin serum BDNF düzeylerinin karşılaştırılması

Snp	Genotip	Cinsiyet	N	BDNF ortalama	S.Sapma
Rs6265	GG	Kadın	2	1776	7
		Erkek	6	1647,5	290
	GA	Kadın	11	1653,7	118
		Erkek	23	1619,5	205
	AA	-			
		Toplam	42		
Rs1491850	TT	Kadın	2	1485,2	128
		Erkek	10	1600,6	143
	CT	Kadın	8	1731	78
		Erkek	9	1659,9	165
	CC	Kadın	3	1641,5	50
		Erkek	10	1600,9	321
	Toplam	42			
Rs2030324	TT	Kadın	3	1617,2	197
		Erkek	11	1604,8	208
	CT	Kadın	8	1687,2	81
		Erkek	10	1608,9	171
	CC	Kadın	2	1618,4	42
		Erkek	8	1668,5	325
	Toplam	42			

TEA ile BDNF gen polimorfizmleri ve TEA ile BDNF serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

Tinnitus frekansları ile BDNF gen polimorfizmleri ve Tinnitus frekansları ile BDNF serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ( $p>0,05$ ).

Tinnitus şiddeti ile BDNF gen polimorfizmleri ve Tinnitus şiddeti ile BDNF serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ( $p>0,05$ ).

Tinnitus VAS değerleri ile BDNF gen polimorfizmleri ve Tinnitus VAS değerleri ile BDNF serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).



## V. TARTIŞMA

Tinnitus ile BDNF gen ve BDNF serum düzeyi arasındaki ilişkiyi inceleyen bu çalışmamızda, PZR-RFLP yöntemi ile BDNF geni için 3 adet polimorfizm (rs6265, rs1491850, rs2030324) ve serum düzeyi için ELİSA yöntemi ile BDNF serum düzeyi incelenmiş olup hasta ve kontrol grupları arasında serum BDNF düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0.0001$ ). Yapılan bu çalışma bu hali ile literatüre göre alanında yapılan ilk çalışma özelliğinde bulunmaktadır. Hasta grubunda serum BDNF düzeyi ortalama  $1374 \text{pg/ml} + 326$ , kontrol grubunda ise  $1640 \text{pg/ml} + 193$  olarak gözlenmiştir.

Birçok çalışma majör depresyonda BDNF serum ve plasma seviyelerindeki azalmadan bahsetmektedir (14,138,139). Ayrıca depresyon gibi duygudurum bozuklukları ile tinnitusun birlikte görülme oranlarının yüksek olduğundan bahsedilmektedir (132,140).

Goto ve ark. larının 43 (14 erkek, 29 kadın) tinnituslu ve 30 (15 erkek, 15 kadın) sağlıklı kişi üzerinde yaptıkları çalışmada, plasma BDNF düzeylerinin tinnitus şiddeti ile değiştiği bu nedenle tinnitusun objektif değerlendirilmesinde ve ayrıca eşzamanlı bir psikiyatrik bozukluğun ortaya konmasında kullanılabilir olduğundan bahsetmişlerdir (12). Bizim çalışmamızda incelenen tinnitus olguları DSM-IV eksen I bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme ölçeği (SCID-I) değerlendirmesine göre MDB ya da herhangi bir duygudurum bozukluğu saptanmayan ve antidepressan tedavi almayan bireylerden seçilerek oluşturuldu. Kontrol grubunda daha yüksek BDNF protein değerleri saptandı.

Bu çalışmada Hasta ve kontrol grubunda BDNF genindeki rs6265, rs1491850 ve rs2030324 polimorfizmleri ile serum BDNF düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığı gözlenmiştir [ $p > 0,2247$ ] ve

( $p > 0,3264$ )]. BDNF val66met polimorfizmi G allel frekansı hasta grubunda %57,7; A allel frekansı ise %42,3 olarak saptanmıştır.

2010 yılında TL Petryshen ve arkadaşları tarafından 58 farklı popülasyon üzerinde yapılan çalışmada BDNF rs6265 polimorfizminin Met allel frekansının %0 - %72 arasında olduğu ifade edilmiştir (141). 100 sağlıklı koreli olgunun incelendiği bir çalışmada met allel taşıyan bireylerin val homozigotlu bireylere göre daha düşük serum BDNF düzeyine sahip oldukları gösterilmiştir (116).

Sklar P. Ve ark.larının aile tabanlı 136 kişide yaptıkları çalışmada Bipolar bozuklukta met allel frekansının daha düşük olduğu ifade edilmiştir (142). R.Hünnerkopf ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada met/met genotipi ile nevrotik yapı arasında daha düşük bir ilişki olduğu ve dolayısı ile val allelinin depresyon ve anksiyete bozuklukları için artmış risk sebebi olabileceğini öne sürülmüştür (143).

F. miyajima ve ark.larının çalışmasında ise tüm kognitif testlerde met allel varlığında kognitif performansın azaldığı ve met allellerinin non demansif bireylerde koruyucu rolünün olmadığı gösterilmiştir (144). Brang S. ve ark.larının 100 sağlıklı bireyde yaptıkları diğer bir çalışmada da BDNF val66met polimorfizminde val alleli taşıyanlara göre met allel taşıyıcısı olan kişilerde daha düşük BDNF serum düzeyi bulunmuştur (145).

Michael F.Egan ve ark. larının invitro ve invivo yaptıkları çalışmalar ile met allelin, BDNF'nin uyarıma bağlı salınımını ve intrasellüler fonksiyonlarını etkileyerek, anormal hipokampal fonksiyon ve daha zayıf sözel epizodik hafızaya neden olabileceğini ifade etmişlerdir (113). Karşılaştırmalı olarak hayvan modelleri ve insanda BDNF polimorfizmlerinin sinaptik plastisite üzerine etkilerinin paralellliğini vurgulayan çalışmalar yapılmıştır (146).

Bunların yanında BDNF rs1491850 polimorfizmi ile ilgili olarak, duygudurum bozuklukları ve MDB hastalarında antidepressan tedavilere yanıt konusunda çeşitli çalışmalar ortaya konulmuştur (122,123). BDNF

rs2030324 polimorfizmi ise şizofreni, astım hastalıkları ile nikotin bağımlısı kişilerde yatkınlıklar ile ilişkisi birçok çalışmada incelenmiştir (24,125).

Georg Juckel ve ark.larının doksanbeş sağlıklı bireyde rs6265, rs1491850 ve rs2030324 polimorfizmleri ve yüksek ses ile aktive edilen işitme potansiyeli değişiklikleri arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmada G(val)-C-T haplotip taşıyıcılarında daha güçlü LDAEP değerlerini ortaya koymuşlardır (11). LDAEP'in merkezi seratonerjik nörotransmisyon için bir indikatör olduğu ve güçlü LDAEP ve azalmış seratonin aktivitesi arasındaki korelasyon vurgulanmakta (11) ve ayrıca Hegerl ve ark.larının SSRI tedavisi gören seratonin sendrom hastalarında zayıf LDAEP cevabını gösteren çalışmalarında dikkat çekmektedir (147). Lang ve arkadaşları BDNF ile seratonerjik aktivite arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında düşük serotonin aktivitesi ile düşük serum BDNF düzeylerinin BDNF G-C-T (rs6265, rs2030324-rs1491850 için) taşıyıcıları ile olan ilişkisi ortaya konmuştur (148,149).

## VI. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nöronal hayatta kalış, apoptosiz, hipokampal plastisite ve hipokampal hafıza, aralarında nörotrofinlerinde olduğu birçok molekül tarafından düzenlenmektedir. Bu süreçlere etki eden en önemli nörotrofinlerden biri BDNF dir.

Bu çalışmada altta yatan nedenleri ve patogenezi henüz tam olarak bilinmeyen tinnitusun çeşitli çevresel etkilere (yüksek sese maruziyet ile olabilen akustik travma, işitme kaybı, farmakolojik toksisite vs.) nöroplastisite cevabının bir sonucu (yan etkisi) olabileceğinden yola çıkarak, nöral plastisite ve nörogenezde etkin rolü olduğu düşünülen BDNF nörotransmitterinin serum düzeyi ile BDNF gen polimorfizmlerinin tinnitus ile olası ilişkisini incelemek amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucunda temel olarak Tinnituslu hastalarda kontrol grubuna göre serum BDNF protein düzeyi daha düşük olarak saptanmış ancak BDNF gen polimorfizmleri ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gözlenmiş olup bu değer BDNF geninin dinamik fonksiyonel regülasyon göstermesi sonucu farklı doku ve patolojilerde çeşitli ekspresyon paternine sahip olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle çalışmanın daha geniş hasta grubu ve farklı dokulardaki ekspresyon paternlerinin de incelemeye dahil edilerek geliştirilmesi ve kapsamının genişletilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Toplumumuzda ve literatürde ilk çalışma olması dolayısıyla elde edilen bulguları sağlıklı olarak karşılaştırabilecek yeterli veri bulunmamakta ve bu bulguları literatüre kazandırmış olmaktadır.

Bunun yanında Tinnitus frekans, şiddet ve VAS değerleri ile BDNF gen polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığı da gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

## VII. ÖZET

Patofizyolojisi hakkında halen çok az şey bilinen tinnitus işitme sisteminin yaygın bir semptomudur ve dışarıdan herhangi bir uyarı olmaksızın kulakta veya başının herhangi bir bölgesinde ses duyulması olarak tarif edilmektedir.

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöronların büyümesi, farklılaşması, yaşamlarını sürdürmesinde ve iç kulak duyu epitelyumu dahil gelişmekte olan işitsel yolda anahtar rol oynayan nörotrofik faktörlerden biridir. BDNF gen polimorfizmleri [rs6265 (Val66Met), rs2030324 ve rs1491850], BDNF salgılanmasının düzenlenmesindeki anormalliklerle ve işitsel uyarılmış beyin sapı potansiyel test (BAER) sonuçlarındaki değişimler ile ilişkili olduğunu ve ayrıca BDNF düzeylerinin tinnitusta ve depresyon, stres ile ilişkili olabilecek distimik bozukluk, konversiyon bozukluğu ve yaşam krizlerine bağlı intihar girişimleri gibi psikiyatrik bozukluklar ve durumlarda azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Tinnitus sıklıkla depresyon gibi duygudurum bozuklukları ile yakından ilişkilidir.

Tüm bu veriler, tinnitus ile BDNF gen polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyleri arasında bir korelasyon olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışmada, BDNF polimorfizmleri ve BDNF serum düzeyi değişiklikleri ile tinnitus arasındaki ilişki incelenerek, BDNF değişikliklerinin tinnitus patofizyolojisinde herhangi bir rolü olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, en az 3 aydır devam eden, tinnitus tanısı almış kişilerde, tinnitusa yatkınlıkta BDNF varyantlarının olası etkileri incelendi.

Çalışmaya CBÜ Tıp Fakültesi Kulak BurunBoğaz (KBB) polikliniğine başvuran 18-55 yaş arası 52 hasta ve herhangi bir KBB ve sistemik

hastalığı saptanmayan aynı yaş grubunda 42 kişi kontrol grubu olarak seçildi. Bu özelliklere uygun seçilen olgular değerlendirmeye alınarak, klinik muayeneleri ve psikiyatri polikliniğinde uygulanacak DSM-IV eksen I bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme ölçeği (SCID-I) kullanılarak psikiyatrik tanıların ayırıcı tanısı yapıldı. Venöz kanlar kullanılarak elde edilen DNA örneklerinden BDNF polimorfizmleri genetik incelemesi ve BDNF serum düzeyi ölçümleri yapıldı.

Sonuç olarak Tinnituslu hastalarda kontrol grubuna göre serum BDNF protein düzeyi daha düşük olarak saptanmış olup BDNF gen polimorfizmleri ile hastalık arasında ise anlamlı bir ilişki olmadığı gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tinnitus, BDNF gene, polimorfizm, serum BDNF

## VIII. ABSTRACT

Tinnitus is a common symptom of hearing system and defined as perception of sound in the ear or any part of the head without any external stimuli. Still very little is known about the pathophysiology of tinnitus.

Brain-derived neurotrophic factor(BDNF) is one of the neurotrophic factors which play key role in growth, differentiation, survival of neurons and developing auditory pathway including the sensory epithelium of the inner ear. BDNF gene polymorphisms [rs6265 (Val66Met), rs2030324 ve rs1491850] is associated with abnormalites of regulated secretion of BDNF and there are studies which associated with changes in brainstem auditory evoked potentials (BAER) test results and furthermore BDNF levels are reduced tinnitus and psychiatric disorders and cases such as depression, dysthymic disorder that may be associated with stress, conversion disorder and suicide attempts due to crises of life. Tinnitus is often closely associated with mood disorders such as depression.

All these data suggest may be correlation between tinnitus with BDNF gene polimorphysm and BDNF serum levels. This purpose, we investigated whether there is any role of BDNF changes in the pathophysiology of tinnitus.

In this study, we will examine the possible effects of BDNF variants in individuals with a diagnosis of tinnitus continuing for more than 3 months. We will select 52 subjects for examination between the ages of 18-55 and as control group at the same age group, 42 subjects which were free of any otorhinolaryngology and systemic disease. Patients which selected appropriately with these characteristics will be evaluated and examine. The severities of tinnitus and depression will be measured using the tinnitus handicap inventory (THI) and the differential diagnosis of psychiatric

diagnoses made using the Structured Clinical Interview(SCID-I) for DSM-IV in the psychiatry department. Genomic DNA will be extracted from the venous blood and BDNF gene single nucleotide polymorphism will be analyzed in the DNA samples and the serum levels of BDNF will be measured.

As a result, level of serum BDNF was found lower in the patients with tinnitus than controls and appeared to have no correlation between BDNF gene polymorphism and disorder.

**Keywords:** Tinnitus, BDNF gene, polymorphism, serum BDNF



## XII. EKLER

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
HAFA SULTAN HASTANESİ






**K.B.B. ANABİLİM DALI POLİKLİNİK HASTA MUAYENE FORMU**



Hastanın  
Adı : \_\_\_\_\_ Soyadı : \_\_\_\_\_  
Cinsiyeti : \_\_\_\_\_ Yaşı : \_\_\_\_\_ Protokol No : \_\_\_\_\_

---

Şikayeti : \_\_\_\_\_  
Hikayesi : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Kulak - Burun - Boğaz muayenesi**

 Sağ Otoskop : \_\_\_\_\_  
 Sol Otoskop : \_\_\_\_\_  
 Rinoskopi Anterior : \_\_\_\_\_  
 Orofarenks : \_\_\_\_\_  
 İndirekt Larinksoskopi : \_\_\_\_\_  
Boyun muayenesi : \_\_\_\_\_

 Sağ  
 Sol

ON TANIM

Ek-1



### XIII. KAYNAKLAR

1. DM Nondahl, KJ Cruickshank, TL Wiley, et al. The 10-year Incidence of Tinnitus Among Older Adults. *Int j Audol.*2010 August; 49(8):580-585
- Soleymani T, Pieton D, Pezeshkian P, et al. Surgical approaches to tinnitus treatment: A review and novel approaches. *Surg Neurol Int.* 2011;2:154.
2. Noell CA, Meyerhoff WL. Tinnitus. Diagnosis and treatment of this elusive symptom. *Geriatrics.* 2003 Feb;58(2):28-34.
3. Dr. Yusuf VAYISOĞLU, Dr. Murat ÜNAL. Tinnitus Sınıflaması, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi. *Türkiye Klinikleri JENT.-Special Topics* 2010;3(2):11-7
4. Pawel J. Jastreboff, Jonathan W.P.Hazell. Tinnitus Retraining Therapy. ISBN 0 521 59256 9, 2004
5. Sand PG, Langguth B, Kleinjung T,et al. GENETICS OF CHRONIC TINNITUS. *Prog. Brain Res.* 2007;166:159-68
6. Langguth B, Kreuzer PM, Kleinjung T, De Ridder D. Tinnitus: causes and clinical management. *Lancet Neurol.* 2013 Sep;12(9):920-30.
7. Eggermont JJ. Central Tinnitus. *Auris. Nasus Larynx.* 2003;30 (suppl): 7–12
8. Zeynep Kotan, Aslı Sarandöl, Salih Saygın Eker ve ark, Depresyon, Nöroplastisite ve Nörotrofik Faktörler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry* 2009;1: 22-6
9. Çağdaş Eker, Ömer Kitis, Erol Ozan ve ark. BDNF Gene Val66met Polymorphism Associated Grey Matter Changes in Human Brain. *BCF.*2005;15(3):104

10. Karege F, Perret G, Bondolfi G, et al, Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in Major depressed patients. *Psychiatry Res.* 2002 Mar 15;109(2):143-8.
11. Georg Juckkel, Christiane Schumacher, Ina Giegling, et al. Seratonegic functioning as measured by the loudness dependence of auditory evoked potentials is related to a haplotype in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Journal of Psychiatric Research* 44 (2010) 541-546
12. Goto F, Saruta J, Kanzaki S, et al. Various levels of plasma brain-derived neurotrophic factor in patients with tinnitus, *Neurosci Lett* 2012 Feb 29;510(2):73-7. Epub 2012 Jan 17.
13. Shih-Jen Tsai,<sup>1,2</sup> Chih-Ya Cheng,<sup>1</sup> Younger W.Y. Yu et al. Association Study of a BDNF Genetic Polymorphism and Major Depressive Disorders, Symptomatology and Antidepressant Response. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 123B:19–22 (2003)
14. Deveci A, Aydemir O, Taskin O, Taneli F, Esen-Danaci A. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in conversion disorder: Comparative study with depression. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2007;61: 571-573
15. Aydemir O, Deveci A, Taskin OE, Taneli F, Esen-Danaci A. Serum brain-derived neurotrophic factor level in dysthymia: a comparative study with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2007; 31: 1023-1026
16. Deveci A, Aydemir O, Taskin O, Taneli F, Esen-Danaci A. Serum BDNF levels in suicide attempters related to psychosocial stressors: A comparative study with depression. *Neuropsychobiology* 2007; 56: 93-97
17. Andrea Crocetti, BS, Stella Forti, BS, Umberto Ambrosetti, MD and Luca Del Bo, MSc, Questionnaires to evaluate anxiety and depressive levels in tinnitus patients, *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* (2009) 140, 403-405

18. Jastreboff PJ, Gray WC, Mattox DE. Tinnitus and Hyperacusis Otolaryngology - Head and Neck Surgery 1998; 3198-222.
19. Dr. Ülkü TUNCER, Dr. Özgür SÜRMEİİÖĞLU. Tinnitusta Patofizyoloji. Türkiye Klinikleri J E.N.T.-Special Topics 2010;3(2):6-10
20. Schecklmann M, Landgrebe M, Poepl TB,et al. Neural correlates of tinnitus duration and distress: a positron emission tomography study. Hum Brain Mapp. 2013 Jan;34(1):233-40.
21. Murat Deniz. Tinnitus hastalarında seratonin transporter gen polimorfizminin tinnitus parametreleri üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi KBB AD. Odyoloji bilim dalı; Haziran 2008.
22. B.Langguth, G.Hajak, T.Kleinjung, A.T.Cacace, A.R.Moller, Tinnitus pathophysiology and Treatment. 2007,ISBN-13:97804444531674
23. Heller AJ. Classification and epidemiology of tinnitus. Otolaryngol Clin North Am. 2003 Apr;36(2):239-48.
24. Christo Pantev and et al. Tinnitus: the dark side of the auditory cortex plasticity. Ann. N.Y. Acad. Sci.2012, 253-258
25. Josef Shargorodsky, MD, Gary C. Curhan, MD, ScD, Wildon R. Farwell, MD, MPH, Prevalence and Characteristics of Tinnitus among US Adults; ne, Vol 123, No 8, August 2010
- 26- Hoffman HJ.,Reed GW. Epidemiology of Tinnitus. Tinnitus and theory and Management Ed; snow JB. Hamilton,BC Decker Inc; 2004 p.16-41
- 27- Aage R. Moller, Berthold Langguth, Dirk De Ridder, Tobias Kleinjung. Textbook of Tinnitus. ISBN 978-1-60761-144-8, 2011
- 28- Khedr EM, Ahmed MA, Shawky OA,et al. Epidemiological study of chronic tinnitus in Assiut, Egypt. Neuroepidemiology. 2010;35(1):45-52. (12)

- 29- Langguth B. et al. Tinnitus Severity, depression and a big five personality traits. *Prog Brain Res* 2007;166:221-225
- 30- Ooms E, Meganck R, Vanheule S, et al. Tinnitus severity and the relation to depressive symptoms: a critical study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Aug;145(2):276-81.
- 31- Ben-David J, Podoshin L, Fradis M. Tinnitus in Children - Still a Neglected Problem. *Int Tinnitus J.* 1995;1(2):155-157.
- 32- Yang J, Zhou H, Yang D. To analyse the impact of tinnitus loudness and hearing loss on the life of tinnitus patient. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2013 May;27(10):458-60, 464.
- 33- Guitton MJ. Tinnitus: pathology of synaptic plasticity at the cellular and system levels. *Front Syst Neurosci.* 2012 Mar 8;6:12.
- 34- Axelsson A, Ringdahl A. Tinnitus--a study of its prevalence and characteristics. *Br J Audiol.* 1989 Feb;23(1):53-62.
- 35- Koester M, Storck C, Zorowka P. Tinnitus--classification, causes, diagnosis, treatment and prognosis. *MMW Fortschr Med.* 2004 Jan 15;146(1-2):23-4, 26-8; quiz 29-30
- 36- Stouffer JL, Tyler RS. Characterization of tinnitus by tinnitus patients. *J Speech Hear Disord.* 1990 Aug;55(3):439-53
- 37- Doç. Dr. N.A. Madanoğlu, İşitme mekanizmasında İşitme yollarının fonksiyonu. *Otoskop* 2002; 3: 121-124
- 38- Doç.Dr. Nevma Atay MADANOĞLU. Kohleanın İşitme Mekanizmasındaki Yeri. *OTOSKOP* 2003; 2: 78-82
- 39- Juichi Ito MD1, Junji Sakakihara MD. Tinnitus suppression by electrical stimulation of the cochlear wall and by cochlear implantation; *Laryngoscope* 104: 752-754, 1994

- 40- Moller AR. ,Pathophysiology of Tinnitus. *Ann. Otol. Rhinol.* 1984; 93: 39-44
- 41- Newman CW, Jacobson GP, Spitzer JB. Development of the Tinnitus Handicap Inventory. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Feb;122(2):143-8.
- 42- Kevin J. Bender and Laurence O. Trussell Synaptic plasticity in inhibitory neurons of the auditory brainstem, *Neuropharmacology.* 2011 April; 60(5): 774–779.
- 43- Penner MJ, Burns EM. The dissociation of SOAEs and tinnitus. *J Speech Hear Res.* 1987 Sep;30(3):396-403.
- 44- Møller AR, Møller MB, Yokota M. Some forms of tinnitus may involve the extralemniscal auditory pathway. *Laryngoscope.* 1992 Oct;102(10):1165-71.
- 45- Kraus KS, Canlon B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear. Res.* 2012 Jun;288(1-2):34-46.
- 46- Chan Y. Tinnitus: etiology, classification, characteristics, and treatment. *Discov Med.* 2009 Oct;8(42):133-6.
- 47- Mosnierl, Teixeira M, Loiseau A, et al. Effects of acute and chronic hypertension on the labyrinthine barriers in rat. *Hear Res* 2001;151: 227-36.
- 48- Shulman A. Epidemiolgy of Tinnitus. In: Vernon JA, Moller AR, editors. *Tinnitus Diagnosis and Treatment.* Philadelphia: Lea and Febiger Pres; 1991, sayfa: 237-245.
- 49- Lockwood AH, Salvi RJ, Burkard RF. Tinnitus. *N Engl J Med.* 2002 Sep 19;347(12):904-10.

- 50- Smits M. et al. Lateralization of functional magnetic resonance imaging (fMRI) activation in the auditory pathway of patients with lateralized tinnitus. *Neuroradiology* 2007; 49: 699-679
- 51- Marcondes R. et al. Tinnitus and brain activation: Insights from transcranial magnetic stimulation. *Ear Nose Throat J* 2006; 85: 233-234,236-238.
- 52- Plewnia C. et al. Dose-dependent attenuation of auditory phantom perception tinnitus by Pet-Guided Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation. *Hum Brain Mapp* 2007;28: 238-246
- 53- Adjamian P. et al. The mechanisms of tinnitus: Perspectives from human functional neuroimaging. *Hear Res* 2009; 253: 15-31
- 54- Leaver AM. Et al. Dysregulation of limbic and auditory networks in tinnitus. *Neuron* 2011; 69:33-43
- 55- Landgrebe M. et al. Structural brain changes in tinnitus: Grey matter decrease in auditory and non-auditory brain areas. *Neuroimage* 2009; 46:231-218
- 56- Winfried Schlee, Thomas Hartmann, Berthold Langguth. Abnormal resting-state cortical coupling in chronic tinnitus. *BMC Neuroscience* 2009, 10:11
- 57- Winfried Schlee, Nadia Mueller, Thomas Hartmann,et al. Mapping cortical hubs in tinnitus. *BMC Biology* 2009, 7:80
- 58- Martin Schecklmann, Michael Landgrebe, Timm B. Poepl,et al. Neural correlates of tinnitus duration and Distress: A positron emission tomography study. *Human Brain Mapping* 2013; 34:233–240
- 59- Rauschecker JP, Leaver AM, Mühlau M. Tuning out the noise: limbic-auditory interactions in tinnitus. *Neuron*. 2010 Jun 24;66(6):819-26



- 60- Eggermont JJ. Pathophysiology of tinnitus. Prog Brain Res. 2007;166:19-35.
- 61- Noell CA, Meyerhoff WL. Tinnitus. Diagnosis and treatment of this elusive symptom. Geriatrics. 2003 Feb;58(2):28-34
- 62- Eggermont JJ. Central tinnitus. Auris Nasus Larynx. 2003 Feb;30 Suppl:S7-12.
- 63- Baguley D, McFerran D, Hall D. Tinnitus. Lancet. 2013 Jul 1. pii: S0140-6736(13)60142-7
- 64- James A. Henry, Kyle C. Denni, Martin A. Schechter. General Review of Tinnitus: Prevalence, Mechanisms, Effects, and Management. Journal of Speech, Language, and Hearing Research ,Vol. 48 : 1204–1235 ;October 2005
- 65- Qun LX, Pirvola U, Saarma M, Ylikoski J. Neurotrophic factors in the auditory periphery. Ann N Y Acad Sci. 1999 Nov 28;884:292-304.
- 66- Gürpınar D.ve ark. Depresyon ve Nöroplastisite. Klinik Psikofarmakoloji bülteni 2007, 17: 100-110
- 67- S.Gümrü, F.Arıcıoğlu. Neurotrophic Factors and Depression: Pathophysiology and Beyond, MÜSBED 2012; 2(2):53-56
- 68- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. J Neurosci. 2002 Feb 1;22(3):619-623
- 69- Uzbay T. Nöroplastisite ve Depresyon. 1. baskı, Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, 2005: 39-42
- 70- Gil-Loyzaga P. Neuroplasticity in the auditory system. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 2005;126(4):203-7.
- 71- Wittenberg GM., Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. Trends Neurosci 2002; 25: 501-505

- 72- Dr. Ömer AYDEMİR, Dr. Artuner DEVECİ. Stres ile İlişkili Duygudurum Bozukluklarında BTNF Ölçümleri: Klinik Çalışmaların Gözden Geçirilmesi. Türk Psikiyatri Dergisi 2009;20(4):381-394
- 73- Manji HK. And et al. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorder. Mol Psychiatry 2000 Nov; 5(6): 578-593
- 74- Fossati P., Radtchenko A. Neuroplasticity: From MRI to depressive symptoms. Eur Neuropsychopharmacology 2004; 14: 503-510
- 75- Czeh B. et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. Proc. Natl Acad Sci USA 2001; 98: 12796-12801
- 76- Işık E. Depresyon ve Bipolar bozukluklar. 1. baskı, Görsel sanatlar Matbaacılık, 2003: 123-124
- 77- Van der Hart MG, Czeh B. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. Mol Psychiatry 2002; 7: 933-941
- 78- Kuipers SD, Trentani A. Molecular correlates of impaired prefrontal plasticity in response to chronic stress. J Neurochem 2003; 85: 1312- 1323
- 79- Ashleigh Wells. THE ROLE OF NEURAL PLASTICITY IN THE MECHANISMS AND TREATMENT OF TINNITUS, Capstone Project, The Ohio State University, 2011
- 80- Møller AR. Neural plasticity in tinnitus. Prog Brain Res. 2006;157:365-72.
- 81- Knipper M, Zimmermann U, Müller M. Molecular aspects of tinnitus. Hear Res. 2010 Jul;266(1-2):60-9.
- 82- .Bartels H, Staal MJ, Albers FW. Tinnitus and neural plasticity of the brain. Otol Neurotol. 2007 Feb;28(2):178-84.

- 83- Klinge C, Röder B, Büchel C. Increased amygdala activation to emotional auditory stimuli in the blind. *Brain*. 2010 Jun;133(Pt 6):1729-36.
- 84- Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z et al. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2010 Jun 2;167(4):1216-26
- 85- Amber M. Leaver, Laurent Renier, Mark A. Chevillet, et al. Dysregulation of Limbic and Auditory Networks in Tinnitus. *Neuron* Volume 69, Issue 1, 13 January 2011, Pages 33–43
- 86- Larry E. Roberts, Daniel J. Bosnyak, and David C. Thompson. Neural plasticity expressed in central auditory structures with and without tinnitus. *Front Syst Neuraci*.2012;6:40
- 87- Eggermont JJ. The role of sound in adult and developmental auditory cortical plasticity. *Ear Hear*. 2008 Dec;29(6):819-29.
- 88- Møller AR. The role of neural plasticity in tinnitus. *Prog Brain Res*. 2007;166:37-45.
- 89- Engineer ND, Møller AR, Kilgard MP. Directing neural plasticity to understand and treat tinnitus. *Hear Res*. 2013 Jan;295:58-66
- 90- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.
- 91- Gönül AS, Akdeniz F. Depresyon, nöroplastisite, nörogenesis ve nörotrofik faktörler. *Klinik Psikiyatri* 2002; 4: 51-56
- 92- Lockwood AH, Salvi RJ, Coad ML, Towsley ML, Wack DS, Murphy BW. The functional neuroanatomy of tinnitus: evidence for limbic system links and neural plasticity. *Neurology*. 1998 Jan;50(1):114-20.
- 93- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 2004; 22:123-131.

- 94- Zohi Sternberg, PhD. MONOAMINE, NEUROTROPHIC FACTOR, & PHARMACOKINETIC HYPOTHESES OF DEPRESSION, OLD AND NEWER TREATMENTS. *Pharmaceutical Intelligence*, December 5, 2012
- 95- Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002 Aug 16;328(3):261-4
- 96- Karage F, Bandolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Abury JM, Bertschy G. Low brain derived neurotrophic factor levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*. 2005;57(9):1068-1072
- 97- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S. BDNF produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 2002;22: 3251-3261
- 98- McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:105-122
- 99- Kendler KS. And et al. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 837-841
- 100- Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T. Expression of the neurotrophin receptor Trk-b is regulated by the sAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2004;26: 470-480
- 101- Dowlatshahi D, MacQuenn GM, Wang JF. Increased temporal cortex CREB concentration and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 1998; 352: 1754-1755
- 102- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription- dependent and independent mechanism. *Science* 1999;286:1358-1362

- 103- Haiyun Xu, J Steven Richardson and Xin-Min. Dose-Related Effects of Chronic Antidepressants on Neuroprotective Proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in Rat Hippocampus *Neuropsychopharmacology* (2003) 28,53–62
- 104- Palizzvan MR, Sohya K. Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience* 2004; 126: 955-966
- 105- Horch HW. Local effects of BDNF on dendritic growth. *Rev. Neuroscience* 2004;15(2):117-129
- 106- Eberhard Passarge. *Color Atlas of Genetics*. ISBN-13: 978-3-13-100363-8,2202
- 107- Nicholas Gilham, *Genes, Chromosomes and disease*. ISBN-10:0-13-707544-8, 2011 )
- 108- R.L.Nussbaum,R.R. McInnes, H.F.Willard, C.F.Boerkel. Thompson& Thompson Tibbi Genetik. ISBN: 975-277-031-2; 44-45
- 109- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BDNF>
- 110- <http://omim.org/entry/113505>
- 111- Haroon I. Sheikh, Elizabeth P. Hayden, Katie R. Kryski, et al. Genotyping the BDNF rs6265 (val66met) polymorphism by one-step amplified refractory mutation system PCR. *Psychiatr Genet*. 2010 June; 20(3): 109–112
- 112- Priit Pruunsild, Anna Kazantseva, Tamara Aid, et al. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007 September; 90(3): 397–406.
- 113- Michael F. Egan, Masami Kojima, Joseph H. Callicott, et al. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of

BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell*, Vol. 112, 257–269, January 24, 2003

114- Luciana Ribeiro, João V. Busnello and Julio Licinio, The brain-derived neurotrophic factor rs6265 (Val66Met) polymorphism and depression in Mexican-Americans. *Neuroreport*. 2007 Aug 6;18(12):1291-3.

115- Frodl T, Schüle C, Schmitt G, et al, Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Apr;64(4):410-6.

116- Bhang S, Ahn JH, Choi SW. Brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter gene-linked promoter region genes alter serum levels of brain-derived neurotrophic factor in humans. *J Affect Disord*. 2011 Feb;128(3):299-304.

117- Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2009 Nov;16(11):1240-5.

118- Foltynie T, Lewis SG, Goldberg TE, et al. The BDNF Val66Met polymorphism has a gender specific influence on planning ability in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2005 Jul;252(7):833-8. Epub 2005 Mar 21.

119- Pivac N, Nikolac M, Nedic G, et al. Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Mar 30;35(2):356-62

120- Gall C, Lauterborn J, Bundman M, Murray K, Isackson P. Seizures and the regulation of neurotrophic factor and neuropeptide gene expression in brain. *Epilepsy Res Suppl*. 1991;4:225-45.

121- Licinio J, Dong C, Wong ML. Novel sequence variations in the brain-derived neurotrophic factor gene and association with major depression and antidepressant treatment response. *Arch Gen Psychiatry*. 2009 May;66(5):488-97

- 122- Real E, Gratacòs M, Soria V, et al. A brain-derived neurotrophic factor haplotype is associated with therapeutic response in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2009 Oct 1;66(7):674-80
- 123- Kocabas NA, Antonijevic I, Faghel C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms: influence on treatment response phenotypes of major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*. 2011 Jan;26(1):1-10.
- 124- Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Dupont RT, et al. Significant association of BDNF haplotypes in European-American male smokers but not in European-American female or African-American smokers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Nov 5;139B(1):73-80.
- 125- Qian L, Zhao J, Shi Y, Zhao X, et al. Brain-derived neurotrophic factor and risk of schizophrenia: an association study and meta-analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 16;353(3):738-43
- 126- Lidian A, Linder B, Anniko M, Nordang L. BDNF as otoprotectant in toxin-induced hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 2013 Jan;133(1):4-11.
- 127- Lidian A, Stenkvist-Asplund M, et al. Early hearing protection by brain-derived neurotrophic factor. *Acta Otolaryngol*. 2013 Jan;133(1):12-21.
- 128- Tan J, Rüttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, et al. Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience*. 2007 Mar 16;145(2):715-26.
- 129- Panford-Walsh R, Singer W, Rüttiger L, Hadjab S, et al. Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic factor and arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity. *Mol Pharmacol*. 2008 Sep;74(3):595-604

- 130- T. J. Brozoski, C.A. Bauer, and D.M.Caspary. Elevated Fusiform Cell Activity in the Dorsal Cochlear Nucleus of Chinchillas with Psychophysical Evidence of Tinnitus. *The journal of neuroscience*, March 15, 2002, 22(6):2383–2390
- 131- Kotan V.O. Ve ark. Depresyon ve N-Metil D-Aspartik Asit (NMDA) Reseptör ilişkisi. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches In Psychiatry* 2009; 1: 36-44
- 132- Folmer RL, Shi Y. SSRI Use By Tinnitus Patients: Interactions Between Depression and Tinnitus Severity. *Ear Nose Throat J* 2004; 83:107–108.
- 133- Dudai Y. The neurobiology of consolidations or how stable is engram. *Annu. Rev. Psychol.* 2006. 55, 51-86
- 134- Martin JL, Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol.* 2011 Jan;4(1):14-6.
- 135- Hayriye KARABULUT, Baran ACAR, Emre GÜNBEY ve ark. ları, TİNNİTUS HASTALARINDA TİNNİTUS ENGELLİLİK ANKETİ İLE ODYOMETRİK BULGULAR ARASINDAKİ İLİŞKİ. *Anatol J Clin Investig* 2010;4(1):22-27).
- 136- Elçin Orçan. Tinnitusun ölçülebilir değerlerinin (frekans, amplitüd, minimal maskaleme seviyesi ve rezidüel inhibisyon) epidemiyolojik, klinik, odyolojik ve psikosomatik veriler ile ilişkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, 2007
- 137- Oliver Gruber, Alkomiet Hasan, Harald Scherk, et al. Association of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism with magnetic resonance spectroscopic markers in the human hippocampus: in vivo



evidence for effects on the glutamate system. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012 February; 262(1): 23–31)

138- Gülfizar Sözeri-Varma, Yaşar Enli, Tuğçe Toker-Uğurlu, et al. Decreased serum BDNF levels in major depressive patients. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* Volume 17, Issue 4, December 2011, Pages 84–88

139- Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, et. al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry.* 2010 Sep;11(6):763-73

140- Zöger S, Svedlund J, Holgers KM. Relationship between tinnitus severity and psychiatric disorders. *Psychosomatics.* 2006 Jul-Aug;47(4):282-8.

141- TL Petryshen, PC Sabeti, KA Aldinger, et al. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry.* 2010 August;15(8): 810–815

142- Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, et al. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Brain-derived neurotrophic factor. Mol Psychiatry.* 2002;7(6):579-93.

143- Regina Hünnerkopf, Alexander Strobel, Lise Gutknecht, Burkhard Brocke and Klaus Peter Lesch. Interaction between BDNF Val66Met and Dopamine Transporter Gene Variation Influences Anxiety-Related Traits. *Neuropsychopharmacology* (2007) 32,2552–2560

144- F.Myajima, W. Ollier, A. Mayes, et al. brain-derived neurotrophic factor polymorphism val66met influences cognitive abilities in the elderly. *genes, brain and behavior* (2008) 7: 411–417)

145- Bhang S, Ahn JH, Choi SW. Brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter gene-linked promoter region genes alter serum levels

of brain-derived neurotrophic factor in humans. *J Affect Disord.* 2011 Feb;128(3):299-304.

146- Soliman F, Glatt CE, Bath KG, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science.* 2010 Feb 12;327(5967):863-6

147- Hegerl U, Bottlender R, Gallinat J, et al. The serotonin syndrome scale: first results on validity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;248(2):96-103.

148- Young-Min Park, Seung-Hwan Lee, Heon-Jeong Lee, et al. Association between BDNF Gene Polymorphisms and Serotonergic Activity Using Loudness Dependence of Auditory Evoked Potentials in Healthy Subjects. *PLoS One.* 2013; 8(4)

149- Lang UE, Hellweg R, Gallinat J. Association of BDNF serum concentrations with central serotonergic activity: evidence from auditory signal processing. *Neuropsychopharmacology.* 2005 Jun;30(6):1148-53.