

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**KONJENİTAL NON-SENDROMİK SENSORİNÖRAL İŞİTME
KAYIPLI HASTALARDA GJB2 (KONNEKSİN 26)
MUTASYON ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Emin KASKALAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İrfan KAYGUSUZ**

**ELAZIĞ
2011**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur

Prof. Dr. Şinasi YALÇIN

Kulak Burun Boğaz ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan KAYGUSUZ

Danışman

Uzmanlık Sınav Jüri Üyeleri

[illegible]

TEŞEKKÜR

Başta tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İrfan KAYGUSUZ olmak üzere, bizlere Kulak Burun Boğaz alanındaki uzmanlık bilgi ve becerisini kazandıran, mesleki, akademik ve sosyal tecrübelerini devamlı bizimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Şinasi YALÇIN, Prof. Dr. Üzeyir GÖK, Doç. Dr. Turgut KARLIDAĞ, Doç. Dr. Erol KELEŞ ve Doç. Dr. Hayrettin Cengiz ALPAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalıştığım dönem boyunca birlikte olduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin hemşire, sekreter ve personellerine özellikle teşekkür etmek isterim.

Ayrıca tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görev yapan Uzm. Dr. Ebru ETHEM'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca karşılıksız sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmeme vesile olan aileme minnettarım.

ÖZET

İşitme kaybı kişinin sosyal, eğitim ve zeka gelişimini olumsuz yönde etkileyen en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Bu çalışma, bölgemizde konjenital nonsendromik sensorinöral işitme kaybı olan hastalarda, işitme kaybına en sık neden olan GJB2 (konneksin 26) geni mutasyonlarını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda tanı konulan, konjenital non-sendromik sensörinöral işitme kayıplı 60 hasta üzerinde yapılmıştır. Kontrol grubu işitme açısından problemi olmayan 60 hastadan oluşturulmuştur. Çalışmaya katılan hastalardan 3 ml periferik venöz kan örneği alınarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmamızda, GJB2 genindeki 35delG, 167delT, delE120, 235delC mutasyonları ile GJB6 genindeki mutasyonlar araştırılmıştır. Ayrıca çalışma grubundaki hastalara DNA dizileme de yapılarak yeni mutasyonların varlığı araştırılmıştır.

Çalışma grubunda yer alan toplam 60 hastanın altısında (%10) mutasyon tespit edilmiştir. Bu hastaların beşinde 35delG (%8,3) ve birinde de (%1,7) delE120 mutasyonu saptanmıştır. 167delT, 235delC mutasyonları ile GJB6 geni mutasyonları görülmemiştir. Kontrol grubunda ise hiçbir hastada mutasyon saptanmamıştır. Çalışma grubundaki hastaların ailelerinde sensörinöral işitme kaybı öyküsünün varlığı ile 35delG ve delE120 mutasyonu varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak bizim çalışmamızda 35delG mutasyonu literatürle uyumlu olarak en sık görülen mutasyon olmuştur. Bu çalışma GJB2 geni mutasyonlarının araştırıldığı yöremizdeki ilk çalışmadır. Konjenital nonsendromik sensörinöral işitme kayıplı hasta ve ailelerine verilecek genetik danışmanlık, işitme kaybının etiyolojisinin belirlenmesinde ve genetik testlerle heterozigot ve homozigot bireylerin tanımlanmasında son derece önemlidir.

Anahtar kelimeler: Konjenital işitme kaybı, Otozomal resesif, GJB2

ABSTRACT

GJB2 (CONNEXIN 26) MUTATIONS ANALYSIS IN PATIENTS WITH CONGENITAL NON-SYNDROMIC SENSORINEURAL HEARING LOSS

Hearing loss is one of the most frequent sensorial defects that causes limit social and intellectual development. In this study we aimed to search GJB2 (connexin 26) gene mutations in patients with certain types of congenital hearing loss in our geographic area.

The study group consisted of 60 patients with congenital, non-syndromic sensorineural deafness diagnosed at the Firat University Faculty of Medicine ENT Department. To the control group 60 patients without hearing trouble were assigned. A 3 ml venous blood sample was drawn from all subjects to analyzed by the Medical Biology and Genetics Department of Firat University Faculty of Medicine. This analyses contained searching GJB6 and 35delG, 167delT, delE120, 235delC of the GJB2 gene mutations. DNA sequencing to screening for other new mutations was also performed.

Mutations were found in six (10%) patients of the study group, five patients with 35delG mutation (8.3%) and one patient with delE120 (1.7%). None of the other GJB6 mutations mentioned above were seen. No mutations were found in any of the control subjects. A statistically significant correlation ($p<0.05$) was detected between family history of hearing loss and 35delG or delE120 mutations.

To conclude, 35delG was the most frequent mutation, as expected from published reports, this is the first study of GJB2 mutations in our geographic area. Genetic counseling of patients with congenital, non-syndromic sensorineural deafness and their families is extremely important for determining the etiology of the hearing loss and identifying heterozygotic and homozygotic individuals through genetic testing.

Key Words: Congenital hearing loss, Autosomal recessive, GJB2

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. İşitme Duyusu ve Ses	2
1.1.2. Kulağın Yapısı	3
1.1.2.1. Temporal Kemik	3
1.1.2.2. Dış Kulak	5
1.1.2.3. Orta Kulak	6
1.1.2.4. İç Kulak	8
1.1.3. İşitme Fizyolojisi	12
1.1.4. İşitme Kaybı ve Sınıflaması	13
1.1.5. Genetik İşitme Kayıpları	15
1.1.5.1. Sendromik İşitme Kaybı	16
1.1.5.1.1. Otozomal Dominant Sendromik İşitme Bozuklukları	16
1.1.5.1.2. Otozomal Resesif Sendromik İşitme Bozuklukları	17
1.1.5.1.3. X'e Bağlı Sendromik İşitme Bozuklukları	18
1.1.5.1.4. Mitokondriyal Sendromlar	19
1.1.5.2. Non-Sendromik İşitme Kaybı	19
1.1.5.2.1. Non-Sendromik İşitme Kayıplarından Sorumlu Genler	19
1.1.5.2.2.1.1. Konneksin 26 (GJB2) Geni	20
1.1.5.2.2.1.2. Konneksin 31 (GJB3) Geni	23

1.1.5.2.2.1.3. Konneksin 30 (GJB6) Geni	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Çalışma Grubu	26
2.2. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Gereçler	27
2.3. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Kimyasallar	27
2.4. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler	28
2.5. DNA İzolasyon İşlemi	28
2.5.1. Kullanılan Solüsyon Ve Gereçler	28
2.5.2. İzolasyon Aşamaları	28
2.5.3. DNA Konsantrasyonu Ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	30
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması	30
2.6.1. PZR Materyalleri	30
2.6.2. Restriksiyon Enzimleri	30
2.6.3. GJB2 Mutasyonlarının Belirlenmesi	30
2.6.3.1. 35delG Mutasyonunun Çalışılması	30
2.6.3.2. 167delT Mutasyonunun Çalışılması	31
2.6.3.3. delE120 Mutasyonunun Çalışılması	31
2.6.3.4. 235delC Mutasyonunun Çalışılması	31
2.6.3.5. GJB6 Mutasyonunun Çalışılması	32
2.6.3.6. GJB2 Geninin DNA Dizilemesi İçin Kullanılan Primerler	32
2.6.4. PZR Kurulması İşlemi	32
2.6.5. PZR Koşulları	32
2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	33
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi	33
2.9. İstatistiksel Analizler	33
3. BULGULAR	34
4. TARTIŞMA	42
5. KAYNAKLAR	50
6. ÖZGEÇMİŞ	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Otozomal resesif non-sendromik sensörinöral işitme kaybına (NSSNİK) neden olan genler	20
Tablo 2. Non-sendromik sensörinöral işitme kaybına (NSSNİK) neden olan genlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması	22
Tablo 3. Çalışma ve kontrol gruplarının yaş dağılımı	34
Tablo 4. Çalışma ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı	34
Tablo 5. Çalışma ve kontrol gruplarının odyolojik bulgularının dağılımı	35
Tablo 6. Çalışma ve kontrol gruplarında 35delG mutasyonunun dağılımı	36
Tablo 7. Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile 35delG mutasyonu arasındaki ilişki	40
Tablo 8. Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile delE120 mutasyonu arasındaki ilişki	40
Tablo 9. Çalışma grubunda 35delG, delE120 mutasyonları ile odyoloji, ailede SNİK öyküsü ve cinsiyet arasındaki ilişki	41

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Kulak anatomisi.	7
Şekil 2.	Korti organının ince yapısı. Üst kısımda Korti organı ve ilişkili yapılar; altta, iç ve dış tüy hücrelerinin ayrıntılı yapısı görülmektedir.	11
Şekil 3.	Baziler membranın titreşmesi, korti organının tüylü hücrelerinin görünümü ve membranın titreşmesine bağlı olarak siliyaların eğilmesi yoluyla nöral potansiyelin oluşması.	13
Şekil 4.	Konneksinlerin yapısı.	23
Şekil 5.	İşitme kaybına sebep olan Gap Junction Beta Genleri ve kodladıkları ürünlerin lokalizasyonları.	24
Şekil 6.	35delG mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı.	36
Şekil 7.	167delT mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı.	37
Şekil 8.	delE120 mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı.	37
Şekil 9.	120delE için vahşi tip bir örneğe ait DNA dizileme sonucu.	38
Şekil 10.	120delE mutasyonuna sahip hasta bireye ait DNA dizileme sonucu.	38
Şekil 11.	235delC mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı.	39

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AS	: Alport sendromu
bç	: Baz çifti
BERA	: Brainstem evoked response audiometry
Cx26	: Konneksin 26
Cx31	: Konneksin 31
Cx30	: Konneksin 30
Cx43	: Konneksin 43
dB	: Desibel
DKY	: Dış kulak yolu
DFN	: DeaFNess (X kromozomal lokuslar için)
DFNA	: DeaFNess (otozomal dominant lokuslar için)
DFNB	: DeaFNess (otozomal resesif lokuslar için)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EKG	: Elektrokardiyografi
EtBr	: Etidium bromüd
GJB2	: Gap Junction Beta-2
GJB3	: Gap junction Beta-3
GJB6	: Gap junction Beta-6
Hz	: Hertz
İTİK	: İletim tipi işitme kaybı
JLNS	: Jervell ve Lange-Nielsen sendromu

K+	: Potasyum
Kb	: Kilo baz
KZ	: Kulak zarı
M	: Molar
µl	: Mikrolitre
MTİK	: Mikst tip işitme kaybı
NSSNİK	: Non-sendromik sensörinöral işitme kaybı
SNİK	: Sensörinöral işitme kaybı
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
UV	: Ultraviole
US	: Usher sendromu
WS	: Waardenburg sendromu
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA

1. GİRİŞ

İşitme kaybı kişinin sosyal, eğitim ve zeka gelişimini olumsuz yönde etkileyen en yaygın algılama bozukluklarından biridir. Kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde olumsuz değişikliklere neden olmaktadır. İşitme kaybı doğumsal veya edinsel olarak görülebilmektedir. Doğumsal işitme kaybı ortalama olarak her 1000 doğumda bir görülmektedir (1). Doğumsal işitme kayıplarının Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) görülme sıklığı, her 1000 doğumda 0.4 ile 1.1 arasında değişmektedir (1). Türkiye'de 2005 yılında yenidoğanlarda yapılan ilk işitme taramaları sonucunda, doğumsal işitme kaybı görülme sıklığı her 1000 doğumda 2 olarak tespit edilmiştir (2).

Doğumsal işitme kaybı bulunan olguların yaklaşık yarısı genetik diğer yarısı ise çevresel faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır (3). Genetik temeli kesin olarak belirlenmiş olgular sendromik ve non-sendromik işitme kayıpları olarak ikiye ayrılır. Non-sendromik sensorinöral işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif, %15-20'si otozomal dominant, %1-2'si ise X'e bağlı kalıtım biçimi gösterir. Mitokondrial kalıtım ise etnik guruplara göre değişmekle birlikte %1-5 arasındadır (4).

Yakın zamana kadar otozomal resesif non-sendromik sensorinöral işitme kayıpları için 60 lokus-21 gen, otozomal dominant non-sendromik sensorinöral işitme kayıpları için 56 lokus-21 gen ve X'e bağlı kalıtılanlar için 8 lokus-1 gen tespit edilmiştir (5). İşitme mekanizmasında etkin olan genlerin ürünleri arasında, iyon hemostazında görev alan "konneksin" proteinleri başta olmak üzere, transkripsiyon faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri, hücre iskeleti proteinleri ve fonksiyonu henüz tanımlanmamış olan birçok protein bulunmaktadır (6).

Konneksin genlerinden, özellikle konneksin 26 (GJB2) ve daha az sıklıkla konneksin 30 (GJB6) ve 31 (GJB3) genlerindeki mutasyonlar sendromik olmayan sinirsel tip işitme kaybında önemli bir yere sahiptir. Nonsendromik sensorinöral işitme kaybına neden olan genler içinde en önemlisi ve ilk tanımlananı Gap Junction Beta 2 (GJB2/Cx26)'dir. 1997 yılında Kelsell ve ark. (7) tarafından 13q11-q12'de yerleştiği tespit edilen bu gen, 5456 nükleotid içermekte, kodlanan ve kodlanmayan olmak üzere toplam iki ekzondan oluşmaktadır.

İç kulak, beyin, kas dokusu, prostat, plasenta, deri, böbrek ve akciğer dahil olmak üzere farklı dokularda bulunduğu bilinen GJB2 geni, küçük moleküllerin ve iyonların hücreler arasındaki difüzyonunu sağlayan “Gap Junction” kanallarının oluşumunda görevli, 226 aminoasitlik “konneksin 26 (Cx26)” proteinini kodlamaktadır (7, 8). Cx26 proteini işitme mekanizmasında işlevsel olan potasyum (K⁺) iyonlarının, tüy hücreleri ve endolenf sıvısı arasında geri dönüşümlü sirkülasyonu ve gradiyentinin korunabilmesinde son derece önemli bir role sahiptir (9).

Otozomal resesif kalıtılan nonsendromik sensorinöral işitme kayıplarının yaklaşık olarak %50’si GJB2 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır. GJB2 geninde şu ana kadar 90’nın üzerinde mutasyon tanımlanmıştır (10). Tanımlanan mutasyonlar arasında, arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşan 35delG mutasyonunun, Akdeniz Bölgesi, Kuzey Amerika, Kuzey ve Güney Avrupa kökenli otozomal resesif kalıtılan işitme kayıplı olgularının yaklaşık yarısından sorumlu olduğu saptanmıştır (7, 11). 35delG mutasyonun yüksek oranda görülmesi hem etkilenmiş bireylere hem de genetik danışma açısından ebeveynlere (taşıyıcılık açısından) analiz yapılması endikasyonunu doğurmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bölgemizde konjenital non-sendromik sensorinöral işitme kaybı olan hastalarda GJB2’nin bilinen mutasyonlarının sıklığını belirlemek ve yeni mutasyonlarını araştırmaktır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İşitme Duyusu ve Ses

İnsanlar duyuları aracılığı ile dış dünyayı algılayarak zihinsel, duygusal ve sosyal gelişiminin devamını sağlarlar. Duyulardan birinin eksikliği algılamının bütünlüğünü bozarak kişinin yaşamını etkiler.

İşitme duyusu kişinin konuşmayı öğrenip iletişim kurabilmesi için önemlidir. İşitmenin meydana gelebilmesi için bir ses kaynağı, ses dalgalarını ileten bir ortam ve bunları algılayan reseptör organ kulak gereklidir (12).

Ses bir enerji kaynağından yayılan titreşimlerin etkisi sonucu gaz, sıvı ve katı ortamlarda moleküllerin sıkışıp gevşemesi ile ortaya çıkan enerjidir. Moleküllerin bir defa sıkışıp gevşeme hareketi içinde kalan mesafe sesin dalga boyunu belirler. Bir saniyedeki titreşim sayısı o sesin frekansını ifade eder. Sesin frekansı Hertz (Hz) olarak gösterilmektedir. Normal bir insan kulağı her titreşim enerjisini ses olarak algılayamamakla beraber ancak 20-20.000 Hz arası sesleri işitebilir. Ses dalgalarının amplitüdü ise sesin şiddetini oluşturur. Sesin şiddet birimi desibel (dB) olarak gösterilir (12).

Seslerin şiddetlerine örnek verecek olursak; fısıltı sesi 20-25 dB, konuşma sesi 50-70 dB, yüksek sesle bağırma 70-85 dB, trafik gürültüsü 90-100 dB, jet motoru sesi 120-150 dB arasındadır (12).

1.1.2. Kulağın Yapısı

İşitme ve dengenin periferik organı olan kulak, temporal kemik içine yerleşmiş, görevleri ve yapıları birbirinden farklı üç kısımdan oluşur. Bunlar, aurikula ve dış kulak yolunu içeren dış kulak, kulak zarı, kemikçikler, mastoid hücreleri ve Östaki borusunu içeren orta kulak ve vestibüler sistemi (semisürküler kanallar, utrikül ve sakkül), kokleayı ve internal akustik kanalı içeren iç kulak bölümlerinden oluşmaktadır (13).

1.1.2.1. Temporal Kemik

Temporal kemik kafatasının yan ve alt duvarlarının bir kısmını oluşturur. Temporal kemiğin petröz, mastoid, timpanik ve skuamöz olmak üzere dört ayrı parçası vardır (13).

Skuamöz Parça: Kafatasının yan duvarının bir kısmını oluşturur. Düz olan dış yüzeyine temporal kas yapışır. Dış yüzün alt kısmından prosesus zigomatikus adı verilen bir çıkıntı öne doğru uzanır. Bu çıkıntının alt kısmında mandibuler fossa bulunur. Dış yüzün arka kısmında a. Temporalis media'ya ait bir sulkus bulunur. Skuamöz parçanın iç yüzü orta kafa çukuru ile komşudur (13).

Mastoid Parça: Temporal kemiğin arka ve üst kısmında yer alır. Skuamöz parçanın petröz parça ile birleşmesinden meydana gelen petroskuamöz sütür, zigomatik kökten aşağıya doğru uzanır. Buna linea temporalis superior adı verilir.

Orta kafa çukurunun alt kısmının sınırını yapar. Dış kulak yolunun arka üst kısmında küçük bir kemik spin bulunur. Bu spine suprameatal spine veya Henle spini adı verilir. Bu spinin arkasında lamina kribrosa adı verilen delikli bir kısım vardır (13).

Mastoidin iç yüzünde bir oluk bulunur, buna sigmoid sulkus denir. Bu sulkusa sigmoid sinüs yerleşir. Mastoid parçanın üst yüzeyinde antrumu örten ince bir kemik tabakası vardır. Buna tegmen mastoideum denir. Arkada, petröz parçanın arka yüzü ile birlikte arka kafa çukurunun ön sınırını yapar. Mastoid kemik hava boşluklarıyla doludur. Bu hava boşluklarının en önemlisi, her zaman bulunan antrumdur (13).

Mastoid pnömatizasyonu antrumdan çevreye doğru yayılır. Pnömatizasyon skuamöz ve petröz kemiklere de yayılır. Bu iki kemik birbirinden petroskuamozal lamina ile ayrılmıştır. Bu lamina zamanla kaybolur, ancak bazen bu lamina yerinde kalarak bu iki kemiği birbirinden ayırır. Buna Körner septumu adı verilir (14).

Petröz Parça: Üç yüzlü ve üç kenarlı piramide benzer. Ön üst yüzü orta kafa çukurunun bir bölümünü yapar. Ön üst yüzde impressio trigemini adını alan bir çukur alan vardır. Bu çukurda beşinci sinirin ganglionu “Gasser ganglionu” yer alır. Bu çukur alanın hemen yanında birbirine paralel giden iki ince oluk vardır. Bu arkadaki oluktan n. petrosus superfisialis major, önünden n. petrosus superfisialis minor geçer. Bu olukların dış yan kısmında eminensia arkuata adı verilen bir kabarıklık vardır. Bu kabarıklığın yanındaki düzgün alana tegmen timpani denir. Burası kavum timpaninin tavanını oluşturur ve malleusun başı ile komşuluk yapar (13). Petröz kemiğin arka üst kısmında meatus akustikus internusun deliği olan porus akustikus internus bulunur. Buradan n. fasialis, n. koklearis, n. vestibularis superior ve n. vestibularis inferior geçer. Bu deliğin arka kısmında fossa subarkuata adı verilen küçük bir çukur alan vardır. Bu çukur alana apertura eksterna akuaduktus vestibuli açılır (14).

Petröz parçanın alt yüzünde prosesus styloideus adı verilen bir çıkıntı vardır. Bu çıkıntının hemen arkasında bulunan deliğe foremen stilomastoideum adı verilir. Bu delik fallop kanalının dış deliğidir. Prosesus stilomastoideusun ön ve iç yan kısmında fossa jugularis adı verilen geniş bir çukur alan vardır. Bu çukur alanın hemen ön kısmında kanalis karotikusun deliği bulunur (13, 14).

Timpanik Parça: Dış kulak yolunun ön ve arka kısmını ve alt kısmının bir bölümünü yapar. Ön alt bölümünün ortası çok incedir, bazen foramen huschke denen küçük delikler ihtiva eder. Timpanik kemik üst kısmı açık kalmış bir halka gibidir. Bu açıklığa Rivinus çentiği denir. Kulak zarının pars tensası sulkus timpanikusa, pars flaksidası ise halkanın açık olan kısmına yerleşir (14). Temporal kemik erişkinlerde lateral pozisyonda, çocuklarda ise lateral-inferior pozisyonundadır. Bebeklerde skuamöz parça diğerlerine oranla daha büyüktür, mastoid parça yoktur. Petröz kısım annulus timpanikus arkasında, skuamöz kısmın altında uzanmaktadır. Kavum timpani dış yanda timpanik kısım, iç yanda petröz kısım ile sınırlıdır. Antrum doğumda iyi gelişmemiştir. Dış tarafta ve önde skuamöz parça, ön ve arkada petröz parça ile komşudur (13).

1.1.2.2. Dış Kulak

Dış kulak, aurikula (kulak kepçesi) ve dış kulak yolundan (DKY) oluşur. Aurikula irregüler elastik fibrokartilaj ve bunu kaplayan perikondrium ile ciltten oluşmaktadır. Timpanik kemiğe, fibrokartilajinöz kanalla ve daha zayıf olarak anterior, superior, posterior auriküler ligamentlerle bağlanmıştır (14). Aurikulanın işitsel uyarıyı alıcı ve artırıcı fonksiyonu vardır. Ayrıca aurikula, atmosferdeki ses dalgalarının uzaklığının ve lokalizasyonunun belirlenmesine katkıda bulunur (15). Dış kulak yolu ön kısmında bulunan çıkıntıya ‘tragus’ denir (15). DKY, kavum konkadan timpanik zara kadar olan bölümdür. Lateralde kartilaj meatus (DKY’nin 1/3 dış kısmı), medialde ise kemik meatustan (DKY’nin 2/3 iç kısmı) ibaret olan S şeklinde rezonatör bir kanaldır. DKY’nin arka duvarının uzunluğu 25 mm, ön alt duvarının uzunluğu ise 31 mm dir. Bu fark kulak zarının arkadan öne doğru oblik yerleşmesinden kaynaklanmaktadır. DKY ses dalgalarını sadece yönlendirmez, aynı zamanda şiddetlendirir. 3500 Hz frekansında bir ses dalgası DKY’de yaklaşık olarak 15-20 dB kuvvetlenmektedir (14, 16). Kulak kepçesi ve DKY’nin sensoriyal inervasyonu V, VII, X kranial ve 2-3. servikal sinirlerden sağlanır (14, 17). Kulak zarı (KZ), orta kulak boşluğunu DKY’den ayıran elips şeklinde bir perdedir. Kalınlığı 0.1 mm, uzunluğu 10-11 mm, genişliği ise 8-9 mm’dir. KZ, orta kulağın dış duvarının büyük bir kısmını yapar. KZ’nin timpanik kemikte yerleştiği yer olan sulkus timpanikusa “timpanik halka” adı verilir. KZ anulus fibrozus ile timpanik

halkaya, santral bir yapışıklıkla da malleusun kısa koluna ve manibrium mallei'ye bağlıdır (16). Kulak zarı, pars tensa ve pars flaksidadan oluşur. Pars tensa KZ'nin timpanik kemik içindeki parçasıdır. KZ'nin büyük bir kısmını oluşturur ve ses dalgaları ile titreşen kısımdır. Pars flaksida (Sharpnell zarı) ise timpanik kemiğin iki uzantısı arasındaki açıklık olan rivinius çentiğini doldurur. Bu iki parça arasında gerginlik ve histolojik farklar söz konusudur. Pars tensada bulunan fibröz doku, pars flaksidada yoktur. Ayrıca pars tensa damar ve sinir yönünden daha zengindir. KZ dışta skuamöz epitel, içte mukoza ve ikisi arasında yerleşmiş olan fibröz tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşmuştur (18).

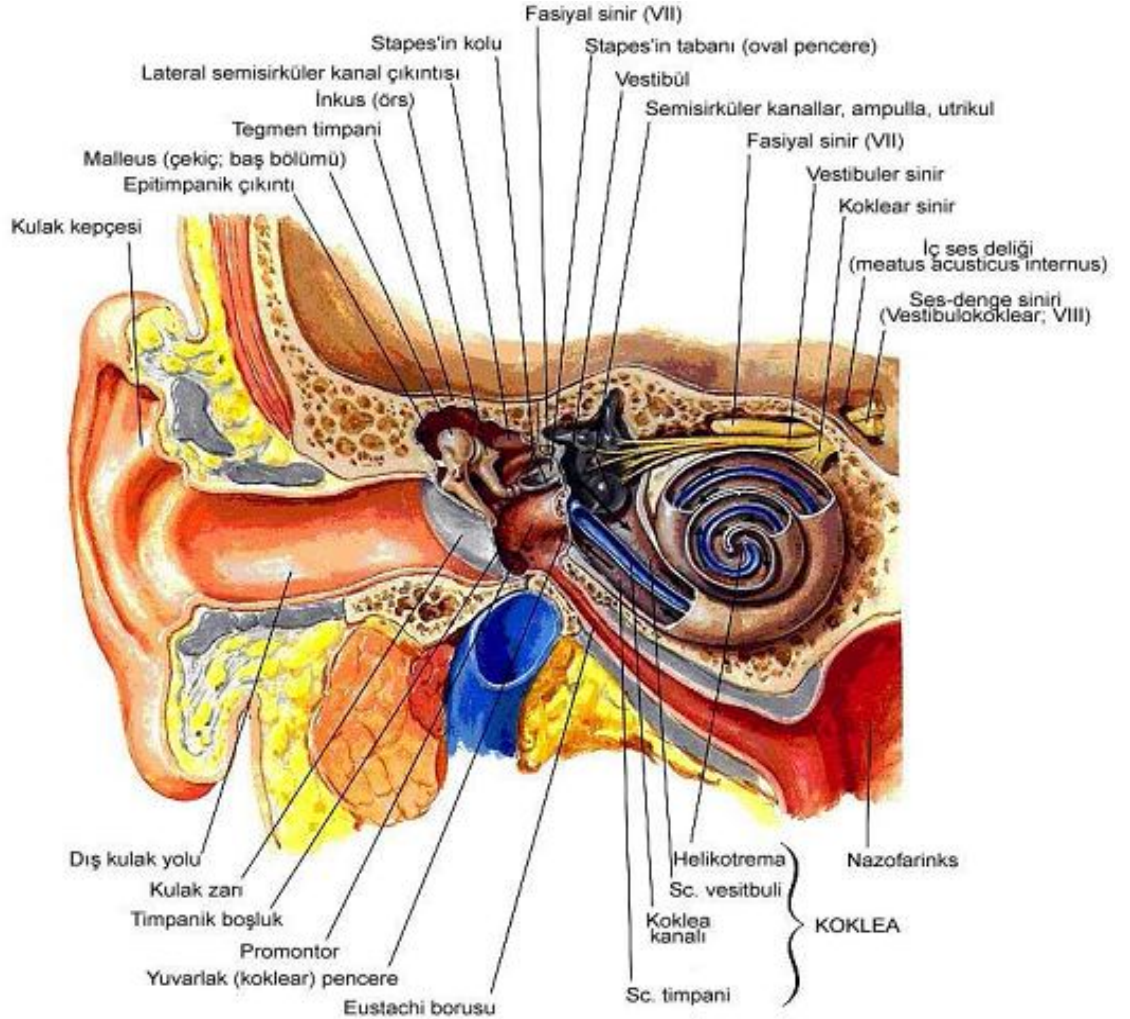
1.1.2.3. Orta Kulak

Orta kulak, KZ ile kemik labirent arasında müköz membran ile kaplanmış kemik mesafedir. Vertikal ve ön arka çapı 15 mm'dir. İç derinliği ise yukarı kısımlarda 6 mm, umbo çevresinde ise 2 mm kadardır. Orta kulak boşluğunda dış kulaktan iç kulağa ses dalgalarının iletimini sağlayan malleus, inkus ve stapes denilen üç adet kemikçik vardır. Bu kemikçikler orta kulak boşluğunda kulak zarı ile iç kulağın fonksiyonel girişi olan oval pencere arasında bir köprü oluşturur. Kemikçikleri orta kulak duvarlarına bağlayan iki kas (m. tensor timpani, m. stapedius) ve dört ligament (arka, ön, üst ve dış malleolar ligament) bulunur (16, 18). Tensor timpani kası, malleusun manibriumuna yapışırken, stapes kası ise stapesin boynuna yapışır. Bu kaslar kemikçik sisteminin hareketini kısıtlayarak şiddetli seslere karşı iç kulak yapılarının korunmasında da rol oynarlar (16, 19).

Orta kulak boşluğunun altı adet duvarı bulunur. Tavanı tegmen timpani oluşturur ve orta kulak boşluğunu orta kafa çukurundan ayırır. Tabanı ise hipotimpanik resesi meydana getirir ve alt ön kısımda arteria karotis interna ile alt arka kısımda juguler bulbusla yakın komşuluktadır (16, 19). Orta kulak boşluğunun arka duvarı aditus ad antrum vasıtasıyla mastoid antrum ve havalı hücreler ile devamlılık gösterir. Önde orta kulak boşluğu östaki tüpü aracılığıyla nazofarenks ile ilişkilidir. Orta kulak boşluğunun lateral duvarı kulak zarı ile epitimpanik resesin yan duvarı tarafından oluşturulmuştur. Medial duvarın en önemli yapılarından biri kokleanın bazal turunun yan duvarının yaptığı kabarıklık nedeni ile dışa doğru

bombeliği ile oluşan promontoryumdur. Orta kulak boşluğunun medial duvarındaki diğer önemli yapılar stapes tabanının oluşturduğu oval pencere ile koklear kapsülün orta kulak boşluğuna diğer açılım yeri olan yuvarlak penceredir (16, 18, 19).

Orta kulağın fonksiyonu, timpanik membrana ulaşan ses dalgalarını koklear sıvıları titreştirecek biçime dönüştürmektir. Kokleaya direkt olarak gelen ses dalgaları kokleadaki sıvıları titreştirmek için çok etkisizdir. Orta kulak, hava ile koklea içi sıvı arasındaki akustik impedans farkını azaltır. Bu mekanizmada başlıca kulak zarı ile stapes tabanı arasındaki oran farkı ve orta kulak kemikçiklerinin kaldıraç fonksiyonu rol oynar (20, 21). Şekil 1’de dış ve orta kulak şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. Kulak anatomisi.

1.1.2.4. İç Kulak

İç kulak petröz kemikte, kemik labirent içinde yerleşmiş nöromembranöz bir yapıdır. Anatomik olarak labirent terimi posterosüperior yerleşimli semisirküler kanalları, anteroinferior yerleşimli koklea ve vestibülü ifade etmektedir. Her biri yaklaşık 1 mm çapında olan üç kemik semisirküler kanalı (lateral, süperior, inferior) perilenf deneni sıvı doldurur. Perilenf vestibülü, kokleanın skala vestibülisi ve skala timpanisini de doldurmaktadır. Skala timpanideki perilenf yuvarlak pencere yakınlarından başlayan akuaduktus koklearis denilen ve çoğunlukla ağsı bir fibröz doku ile dolu olan kanal aracılığıyla subaraknoid boşluktaki serebrospinal sıvı ile ilişkidir (18, 19, 21). Vestibül yaklaşık olarak 4 mm çapında oval şekilli bir kavitedir. Timpanik kavitenin medialinde lokalize olmuştur. Timpanik kavite fenestra koklea ve fenestra vestibülü ile ilişkilidir (18, 19).

Otik kapsül içinde iç kulağın esas yapısı olan otik labirenti çevreleyen periotik labirent vardır. Otik labirent, endolenf içeren ve birbirleriyle devamlılık halinde olan epitel ile döşeli bir takım tüpler ve boşluklar sisteminden oluşmuştur. Otik labirent ayrı fonksiyonlara sahip birbirleriyle bağlantılı süperior parça (vestibüler labirent), inferior parça (koklea), endolenfatik duktus ve kese olmak üzere üç parçadan oluşmuştur (18, 19).

Vestibüler otik labirent sakkulus, utrikulus ve semisirküler duktuslardan oluşur (18, 19). Utriküler duktus, utrikulusun ön yüzünden ayrılır ve ön duvarın çevresinde arkaya doğru kıvrılır. Utriküler duktus, sakkulustan gelen benzeri bir kanal (sakküler duktus) ile birleşerek endolenfatik duktusu oluşturur. Endolenfatik duktus, vestibüler akuaduktus denilen kemik kanal içinde yerleşmiştir. Vestibüler akuaduktusun terminal parçasında endolenfatik duktus genişler ve endolenfatik keseyi oluşturur. Endolenfatik kese kemik akuaduktusun içinde yerleşmiştir. Endolenfatik duktusun distal eksternal parçası dereceli olarak düz hale gelir ve petröz kemiğin arka yüzünde, sigmoid sinüse çok yakın olarak durada sonlanır (18, 19).

Sakkulus, utrikulusa benzer ama utrikulusdan daha küçüktür. Küçük bir duktus, sakkulusun duvarından ayrılarak vestibülün tabanında seyrederek koklear duktusa girer ve duktus reuniens olarak adlandırılır. Duktus reuniens koklea ile labirentin diğer kısımları arasındaki tek bağlantı yeridir (18, 19). Koklea iç kulağın

işitme sistemi ile ilgili olan spiral şekilli, yaklaşık olarak 35 mm uzunluğunda, 5 mm yüksekliğinde, en geniş tabanında 9 mm çapında koni şeklinde, iki tam $\frac{3}{4}$ kıvrım yapmış yapıdır. Koklea skala vestibüli, skala media (duktus koklearis) ve skala timpani olarak üç bölümden oluşur (18, 19).

Koklea, koklear kıvrımları ayırmaya yarayan modiulus denilen bir yapı ile desteklenir. Sekizinci sinirin işitsel parçasının fibrilleri modiulus içinde ve kemik spiral lamina içindeki küçük kanallar boyunca ilerleyerek tüylü hücrelerde sonlanırlar. Bu nöronların hücre gövdeleri spiral lamina tabanında modiulus boyunca gruplanarak spiral ganglionu oluşturur (18, 19).

Koklear duktus (skala media) üçgen şeklindedir. Skala media ile skala timpani arasındaki sınırı kemik spiral laminanın radial fibröz uzanımı olan baziller membran yapar. Baziller membranın yüzeyinde işitmenin end organı olan korti organı bulunur. Duktus koklearis ve skala vestibüli arasındaki sınırı ise iki hücre tabakasından oluşmuş reissner membranı oluşturur. Skala timpani, yuvarlak pencere vasıtasıyla orta kulakla bağlantılıdır. Skala timpaninin sonu ile subaraknoid mesafe arasını bağlayan kemik pasaja “koklear akuaduktus” adı verilir. Bu akuaduktus, spinal sıvı ile perilemf arasındaki değişime izin verir (17, 19).

Skala vestibüli ise direkt olarak vestibüle açılır. Skala vestibuli ile skala timpani arasındaki ilişkiyi sağlayan yapıya ise “helikotrema” adı verilir. Korti organı destek hücreleri, tüylü hücreler ve tektoryal membran denilen jelatinöz bir yapıyı ihtiva eden kompleks bir yapıdır. Tüylü hücreler, tek sıra iç tüylü hücreler ve 3-5 sıra dış tüylü hücreler şeklinde yerleşmişlerdir. İç ve dış tüylü hücreleri, iç ve dış pillar hücreleri tonofibrilleri ile oluşturulan ters “V” şeklinde yapı ile ayrılmışlardır. Pillar hücreleri arasındaki mesafe korti tüneli olarak adlandırılır ve burada endolenften farklı bir sıvı olan kortilenf bulunur (17, 19). Şekil 2’de iç kulak yapıları şematik olarak gösterilmiştir.

Tüylü hücreler falangeal hücreler tarafından desteklenmektedir. Diğer destek hücreleri henssen hücreleri, klaudius hücreleri ve sınır hücreleridir. Tektoryal membran santral olarak limbus tarafından desteklenmektedir. Limbus kemik spiral lamina üzerine yaslanan kalın bir hücre tabakasıdır ve aynı zamanda reissner membranında tutunmasına yardımcı olur. Tektoryal membran serbest kenarında

hensen hücrelerine sıkıca tutunarak tüylü hücrelerin silyalarını ihtiva eden tüylü hücreler ile tektoryal membran arasındaki bir mesafe oluşumunu sağlar (17, 19).

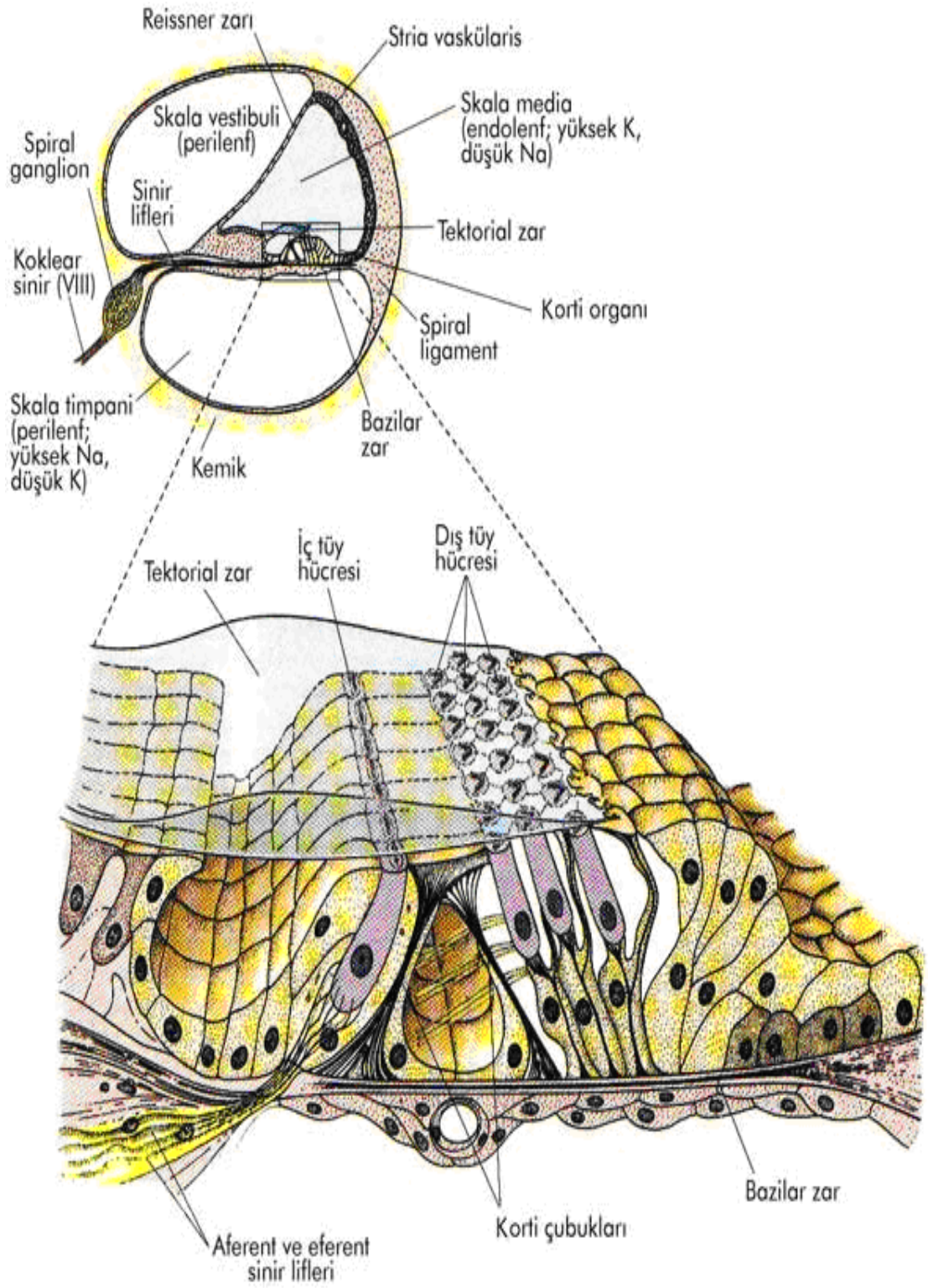
Tüylü hücreler birkaç nöron tarafından innerve edilirler. Tüylü hücrelerde biri afferent, diğeri efferent fonksiyonundan sorumlu iki tip sinir sonlanması vardır. Bazen de tek nöron birkaç tüylü hücreyi innerve etmek üzere bölünebilir (18, 19). İç kulak içindeki alıcı organlar esas olarak aynı yapılardan oluşmuştur. Fakat her biri özel mekanik stimuluslara cevap verecek tarzda organize olmuşlardır. Membranöz koklea, korti organını içerir (19).

Utrikulus, semisirküler kanallar ve sakkulus ise durum ve hareket hissi reseptörlerini içermektedir. Duktus ve sakkus endolenfatikusun iç kulaktaki hidrolik basıncın düzenlenmesi ile ilgili oldukları düşünülmektedir (21, 22).

Nöronlar kemik spiral laminanın kanalcıklarında ilerleyerek laminanın tabanında spiral ganglion hücreleri ile buluşurlar. Daha sonra aksonlar modiolusun merkezindeki kanallar içinde ilerleyerek sekizinci sinirin işitsel parçasını oluştururlar. Bu fibrillerde iki koklear nükleus (dorsal ve ventral) bölgesinde, ponsa girerler (17, 19). Perilenfatik sıvı kimyasal ekstrasellüler sıvılarda olduğu gibi düşük potasyum ve yüksek sodyum konsantrasyonuna sahiptir. Endolenfatik sıvı ise hücre içi sıvı niteliğinde elektrolit yoğunluğuna sahiptir ve yüksek potasyum, düşük sodyum içerir (23). Lawrence (22), insanda toplam 78.3 mm^3 perilenf, 2.76 mm^3 endolenf olduğunu bildirmiş ve iç kulak sıvılarının fonksiyonlarını şöyle sıralamıştır:

1. İç kulaktaki hücrelerin kanla ilişkisini sağlayarak hücrelere besin temin etmek ve onların katabolik ürünlerini uzaklaştırmak.
2. Enerji değişimi için uygun ortam sağlamak.
3. Titreşimleri stapes tabanından enerji değişimi yapan elemanlara iletmek.
4. Basıncın, sistem içinde dağılmasını sağlamak.

İç kulak sıvılarının kaynağı kesin belli değildir. Ancak büyük olasılıkla perilenf, beyin omurilik sıvısı filtrasyonu ile endolenf ise stria vaskularis ve vestibüler labirentinde bulunan dark hücrelerinden salgılanma ile oluşur. Baziller membran üzerindeki kan damarları kortilenfin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Kortilenf ve perilenf yüksek sodyum içermeleri nedeniyle birbirlerine benzemekle beraber, hem kaynaklarının farklı oluşu hem de perilenfin tüylü hücreler için toksik oluşu bakımından birbirlerinden farklıdır (18, 19, 22).



Şekil 2. Korti organının ince yapısı. Üst kısımda Korti organı ve ilişkili yapılar; altta, iç ve dış tüy hücrelerinin ayrıntılı yapısı görülmektedir.

1.1.3. İşitme Fizyolojisi

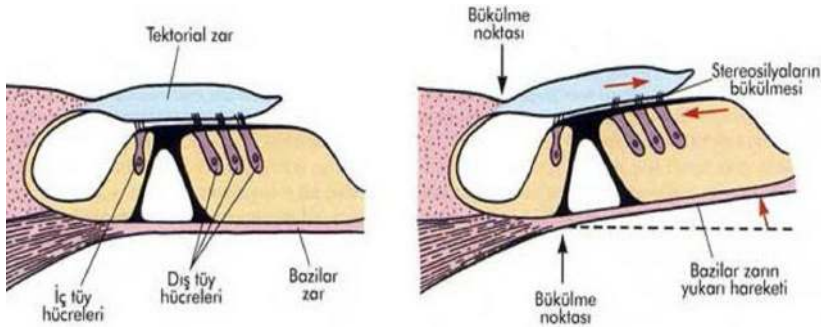
Dış ortamdan gelen ses dalgalarının karşılaştığı ilk organ kulak kepçesidir. Kulak kepçesi sesleri toplayıp DKY'ye iletir. Yetişkinlerde ortalama boyu 2.7 cm olan DKY ses dalgalarını kulak zarına amplifiye ederek iletim görevini gerçekleştirir (15).

Kulak zarı ve orta kulakta bulunan kemikçiklerin en önemli görevi sesin hava ortamından sıvı ortama geçişi ve iç kulak sıvılarının akustik direncinden oluşan enerji kaybını karşılamaktır (17).

Malleus ve inkus arasındaki eklem, kaldıraç kanunlarına göre, malleus kolundaki enerjiyi inkus koluna 1.3 kat büyütür. Kulak zarının titreşen bölümü ile stapes tabanı arasındaki oran, yaklaşık olarak 17 kat civarındadır (zarın titreşen alanı 64 mm^2 , stapes tabanı ise 3.2 mm^2 dir). Böylece kulak zarındaki ses enerjisi, kemikçik zincirinin kaldıraç etkisi ve zarın aktif bölgeleri ile stapes tabanı arasındaki farkın oluşturduğu hidrolik etki sonucu, iç kulağa yaklaşık olarak 22 kat daha artırılmış olarak iletilir. Burdaki kazanç yaklaşık olarak 30 dB'e tekabül eder (15, 17).

Orta kulakta bulunan tensor timpani ve stapedius kasları, kokleanın aşırı yüksek seslerin neden olacağı harap edici titreşimlerden korunması ve gürültülü ortamlarda düşük frekanslı seslerin maskelenmesine olanak tanımaktadır. Tensor timpani ve stapedius kaslarının bir diğer işlevi kişinin kendi konuşma sesine olan duyma duyarlılığını azaltmaktır (15).

Stapesin tabanı oval pencereye karşı içeri doğru hareket ettiğinde kokleanın kemik duvarlar tarafından çepeçevre sarılı olmasından ötürü yuvarlak pencere dışa doğru çıkıntı yapar. Baziller liflerde, oval pencereye doğru bükülürken oluşan esnek gerim baziller zar üzerinde ilerleyen bir dalga başlatır (Şekil 3). Bu durum **ilerleyen dalga teorisi** olarak adlandırılır. Yayılma hem enine, hem boyuna olmakla birlikte amplitüd giderek artarak maksimuma ulaşır, devamında ise sönerek faz değiştirir. Dalgaların baziller membran üzerinde en büyük titreşim yaptığı yer her frekans için belirli bir bölgedir. En büyük amplitüdle titreşen bölge, yüksek frekanslarda bazal bölgede, yani oval pencereye yakındır. İşitsel enerjinin frekansı düştükçe baziller membranın en çok titreşen bölgesi kokleanın tepesine yaklaşır (17).



Şekil 3. Baziler membranının titreşmesi, korti organının tüylü hücrelerinin görünümü ve membranın titreşmesine bağlı olarak siliyaların eğilmesi yoluyla nöral potansiyelin oluşması.

Baziler membranının uyarılması ile taktorialiyal membran ve tüy hücreleri uyarılmaktadır. Uyarım sırasında tüy hücrelerinin meydana getirdiği enerji yolu ile sinir uçları uyarılmış olur, sinir impulsarı ile ses 8. sinir lifleri ile merkeze iletilir. Primer işitme merkezi gyrus temporalis transversi veya Heschel gyrusu'dur. İşitme merkezinde de pes ve tiz seslerin alındığı yerler ayrılmıştır. Yüksek tonlar işitme merkezinin derinliklerinde, düşük tonlar ise yüzeyinde sonlanır (17, 24).

1.1.4. İşitme Kaybı ve Sınıflaması

İnsanlar arasındaki iletişim yollarından en önemlisi ve en sık kullanılanı konuşarak anlaşma yoludur. Konuşmanın öğrenilmesinde ise en önemli unsur işitmedir. İşitme kaybı doğumsal veya edinsel olarak görülebilmektedir. Doğumsal işitme kaybı ortalama olarak her 1000 doğumda bir görülmektedir. Bu rakamın yaklaşık yarısı genetik nedenlere ve diğer yarısı çevresel nedenlere bağlıdır (3). İşitme kayıpları, aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

İşitme Kayıplarının Sınıflandırılması (25):

I- Odyolojik fenotipine göre:

Tip

İletim tipi

Miks tip

Sensorinöral tip

Progresyon

Progresif

Progresif olmayan

Düzensiz değişim gösteren

Frekans

Düşük (<500 Hz)

Orta (501–2000 Hz)

Yüksek (>2000 Hz)

Şiddet

25 dB HL'nin altında: Normal işitme

26-40 dB HL: Hafif işitme kaybı

41-55 dB HL: Orta derecede işitme kaybı

56-70 dB HL: Orta derecede ileri işitme kaybı

71-90 dB HL: İleri derecede işitme kaybı

90 dB HL' yi aşan: Çok ileri derecede işitme kaybı

II- Nedenlerine göre (1):

a) Genetik (%50–60)

Fenotip

Sendromik (%30–40)

Non-sendromik (%60–70)

Kalıtım kalıbı

Otozomal resesif (%70–80)

Otozomal dominant (%10–20)

X kromozomal (%1–2)

Mitokondriyal (%0–20)

Multigenik

Kromozomal anomali

b) Genetik olmayan (%40–50)

Teratolojik ajan (Sitomegalovirüs, rubella v.b)

Prematürite

Postnatal infeksiyon (menenjit, otitis media v.b)

Ototoksik ilaç alımı

Akustik veya kranial travma

(Not: Yüzdeler konjenital veya erken başlangıçlı işitme kaybı içindir.)

İşitme Kaybının Tipleri (15):

a. İletim tipi işitme kaybı (İTİK): Aurikula, dış kulak yolu, timpanik membran ile orta kulak kavitesi ve kemikcikleri tutan patolojilerde kokleaya ulaşan ses şiddetinin azalmasına bağlı gelişen işitme kayıplarıdır.

b. Sensörinöral işitme kaybı (SNİK): Koklea ve/veya koklear sinir ve işitme yollarındaki patolojilere bağlı işitme kaybıdır. Prenatal, perinatal ve postnatal patolojiler bu tip işitme kaybına neden olabilir.

c. Mikst tip işitme kaybı (MTİK): İletim ve sensörinöral işitme kaybına neden olan patolojilerin aynı kulakta bir arada bulunması halinde mikst tip işitme kaybindan söz edilir.

d. Santral tip işitme kaybı: İşitsel sinir sistemini ve özellikle korteks bölümünü tutan patolojilerle birlikte ortaya çıkar ve özellikle konuşmayı anlama zorluğu yapar.

e. Fonksiyonel tip işitme kaybı: İşitme kaybı yakınması olan hastada yapılan subjektif ve objektif işitme ölçüm yöntemleri ile işitme kaybının olmadığı veya yakınmayı açıklayacak düzeyde bir patolojinin bulunmadığı durumlardır.

1.1.5. Genetik İşitme Kayıpları

Genetik etiyolojisi belirlenmiş olgular sendromik ve non-sendromik olarak ikiye ayrılmaktadır. İşitme kaybına başka hiçbir patolojik organ veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği duruma non-sendromik işitme kaybı denilmektedir. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir. Bunun dışında kalan %30'luk grupta işitme kaybı dışında bulgular olmakta ve bu bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde bir sendrom tanısı konabilmektedir (26).

Günümüzde, bulguları arasında işitme kaybı olan yüzlerce sendrom tanımlanmıştır. Bunların büyük bir kısmı klasik Mendel tipi kalıtım biçimlerine uymakta, bir kısmı ise mitokondrial kalıtım göstermektedir. Non-sendromik grupta da benzer biçimde Mendel tipi kalıtım biçimlerinden birine veya mitokondrial kalıtıma uyan geçiş biçimleri tanımlanmıştır. Otozomal resesif kalıtım, sendromik olmayan grupta yaklaşık %80 sıklıkta görülmektedir. Otozomal dominant ve X kromozomal kalıtım biçimleri sırasıyla %15-20 ve %1-2 olguda saptanmaktadır.

Mitokondrial kalıtımın non-sendromik işitme kaybı içindeki yeri etnik gruplara göre değişim göstermekle birlikte %1 ile %20 arasındadır (7, 26).

1.1.5.1. Sendromik İşitme Kaybı

Sendromik işitme kaybı, sağırılık ile birlikte bir veya birkaç spesifik anomalinin kombinasyonunu ifade etmektedir (26).

1.1.5.1.1. Otozomal Dominant Sendromik İşitme Bozuklukları

Brakiyo-Oto-Renal Sendrom: Prevalansı 1/40.000'dir. Brankial sinüs ve fistüller, basit ve belirgin dış kulaklar, iç kulakta Mondini malformasyonu ve basit üriner sistem malformasyonundan renal agenezise kadar değişen üriner sistem patolojileri ile karakterize bir sendromdur (27). Sendroma neden olan gen 8q13 kromozomal bölgede bulunan EYA1 (drosophila 'eyeless') genidir (26).

Nörofibromatozis Tip II: Bilateral vestibüler Schwannoma ve diğer intrakraniyal ve spinal tümörlerin (schwannoma, meningioma, glioma ve ependimoma) gelişimine ek olarak hastalarda posterior subkapsüler lentiküler opasite görülebilir. Neden olan gen 22q12 kromozomu üzerinde bulunan merlin 48 ismi verilen gendir. İnsidansı 1:40.000 ile 1:90.000 arasındadır (28).

Stickler Sendromu: Hastalığın prevalansı 1:10.000'dir. Hastalığın nedeni tip II proteinlerin ve tip IV kollajenin yapılanması için kodlanan COL2A1, COL11A2 ya da COL11A1 genlerindeki mutasyonlardır. Hastalarda görülebilecek anomaliler mikrognati, konjenital vitreus anomalisi, myopi, retina dekolmanı yada katarakt, eklem hipermobilitesi, spondiloepifiziyal displazi, sensorinöral işitme kaybı ve orta hat yarıklarıdır (29, 30).

Waardenburg Sendromu (WS): Prevalansı 1:10.000 ile 1:20.000 arasındadır. Dört alt tipi bulunmaktadır. Hastaların yaklaşık olarak %20'sinde tek yada iki taraflı SNİK vardır. Ayrıca pigmenter bozukluklarda görülür.

WS tip I: Sensorinöral işitme kaybı, beyaz perçem, iriste pigmenter bozukluklar, distopia kantarum, iç kantusta ve lakrimal punktumda yer değişikliği ile tanınır.

WS tip II: WS tip I'den distopia kantarum'un olmaması ile ayrılır.

WS tip III: Klein-Waardenburg sendromu olarak adlandırılır. WS tip I'in

özelliklerine ek olarak üst ekstremitelerde kontraktür ya da hipoplazi ile karakterizedir.

WS tip IV: Waardenburg-Shah sendromu olarak adlandırılır. Hirschsprung hastalığı ile beraber WS'yi içerir. WS tip I, II ve III kalıtsal olarak otozomal dominant bir hastalık olduğu halde WS tip IV otozomal resesiftir.

Waardenburg Sendromu'nda işitme kaybı genellikle derin, bilateral ve zaman içerisinde sabit seyir gösteren bir işitme kaybıdır (8, 9).

Treacher-Collins Sendromu: Mandibulofasiyal dizostozis olarak da adlandırılmaktadır. Maksilla ve mandibulada gelişim geriliği, zigomatik arkların gelişmemesine bağlı malar hipoplazi, anormal kantus yerleşimi, palpebral fissürlerin aşağı çekikliği, kulakların ileri derece küçük veya belirgin olması, oküler koloboma, koanal atrezi ve SNİK yada ossiküler fiksasyona bağlı gelişen iletim tipi işitme kaybı belirtileri arasındadır. Treacher Collins sendromu 5q32-33 kromozomal bölgesinde bulunan TCOF1 genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Genin sentezlediği protein nükleolus ile sitoplazma arasında molekül taşınmasında aracılık etmektedir (9).

1.1.5.1.2. Otozomal Resesif Sendromik İşitme Bozuklukları

Pendred Sendromu: Hastalığın prevalansı 7,5-10/100.000'dir. Pendred sendromu herediter sağırılıkların %10'undan sorumlu tutulmaktadır. Pendred sendromunun en önemli klinik bulguları konjenital SNİK ile guatrdir. Fakat guatr olguların tümünde bulunmayabilir. Hastaların yaklaşık yarısında hipotiroidi saptanmaktadır (31). Etkilenmiş kişilerde genellikle ikinci dekatta gelişen guatra ek olarak prelingual, bilateral ve derin işitme kaybı vardır. Radyolojik olarak hemen daima geniş vestibuler kanal ya da Mondini displazisi gibi temporal kemik anomalileri saptanmaktadır. Pendred sendromuna neden olan "PDS" geni 7. kromozomda lokalizedir ve pendrin proteinini kodlamaktadır. Pendrin proteinini iyon/klor taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır ve iç kulak, tiroid ile böbrek en sık lokalizasyonlarıdır (32).

Jervell ve Lange-Nielsen Sendromu (JLNS): Konjenital SNİK, uzamış QT intervali ve senkop atakları ile karakterizedir. Ani ölümler görülebilir. Mutasyona uğramış genler kalpte ve iç kulakta potasyum kanallarını hedef alırlar. İşitme kaybı

genellikle konjenital, bilateral ve derin karakterdedir. Konjenital SNİK'li çocuklar arasında JLNS'nin prevalansı %0.21 olmasına rağmen kardiyak belirtilerinden dolayı teşhisi önemlidir (33).

Usher Sendromu (US): SNİK, retinitis pigmentosa ve sıklıkla vestibüler fonksiyon bozuklukları ile karakterize bir sendromdur. Usher sendromu genetik olarak heterojendir. Klinik olarak üç tipi vardır; US tip I: Çocukluk döneminde ciddi ya da derin konjenital işitme kaybı, vestibüler fonksiyon bozuklukları ve retinitis pigmentosa varlığı ile karakterizedir. US tip II: Orta ya da ciddi konjenital SNİK, normal vestibüler fonksiyonlar ve üçüncü ya da dördüncü dekadlarda ortaya çıkan retinitis pigmentosa ile karakterizedir. US tip III: Progresif işitme kaybı, değişken vestibüler fonksiyonlar ve retinitis pigmentosa ile karakterizedir (34).

1.1.5.1.3. X'e Bağlı Sendromik İşitme Bozuklukları

Alport Sendromu (AS): Progresif hematürik nefrit, SNİK ve oküler değişikliklerle karakterize tip IV kollajen hastalığıdır. Tip IV kollajen, bazal membranların temel bileşenidir. Tip IV kollajenin a3, a4, a5 zincirlerini sentezleyen COL4A3, COL4A4 ve COL4A5 genlerindeki mutasyonlar, anormal bazal membran sentezine neden olurlar (anormal glomerüler bazal membran, oküler ve kohlear bazal membranlar) (35). Tip IV kollajenin a5 zincirini kodlayan COL4A5 genindeki mutasyonlar X'e bağlı AS'nin nedenidir. Bu proteindeki yetersizlik böbrek, koklea ve gözde bazal membrandaki trimerize 3-4-5 kompleksinde parsiyel ya da tam yetmezliğe neden olmaktadır (36). Bu kompleksin baziler membranda radyal gerginlik için önemli olduğu düşünülmektedir (37). Tanısal kriterler dört karakteristik özellikten en az üç tanesini içermelidir (38):

- 1) Kronik böbrek yetmezliği ile beraber olan ya da olmayan hematüriye ait pozitif aile hikayesi
- 2) Progresif yüksek ton sensörinöral işitme kaybı
- 3) Anterior lentikonus ve/veya maküler benekler gibi tipik göz bulguları
- 4) Böbreklerde glomerüler bazal membranda histolojik değişiklikler

Hastalık X'e bağlı hastalıklarda beklendiği üzere daha çok erkeklerde görülür. Hematüri hastalığın esas belirtisi olmakla birlikte oküler belirtiler hastaların 1/3'ünde görülmektedir (36). İşitme kaybı çoğunlukla simetrik, geç çocukluk

döneminde saptanabilen ve yüksek frekanslarda başlayıp daha sonra tüm frekansları tutan SNİK şeklindedir (36).

1.1.5.1.4. Mitokondriyal Sendromlar

Mitokondriyal hastalıklar tipik olarak kas, retina, beyin sapı, pankreas ve koklea gibi yüksek enerji talebi olan dokularda fenotipe neden olurlar. Sendromik mitokondriyal hastalıklar genellikle multisistemiktir ve hastaların %70'inde işitme kaybı eşlik eder (39).

MELAS Sendromu: Mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz ve epizodik felcin tipik olduğu sendromda işitme kaybı sensörinöral, progresif, bilateral ve yüksek frekanslardadır (39).

MERRF Sendromu: İşitme kaybı, ataksi, demans, optik sinir atrofisi ve kısa boy ile karakterizedir (39).

Kearns-Sayre Sendromu: Progresif eksternal oftalmopleji, atipik retinal pigmentasyon ve tipik olarak 20 yaş öncesinde başlayan kalp bloğunu kapsar. Hastaların %50'sinde sensörinöral işitme kaybı ve kokleosakküler dejenerasyon mevcuttur (39).

1.1.5.2. Non-Sendromik İşitme Kaybı

Non-Sendromik işitme kayıpları hereditör işitme kayıplarının %70'ini oluşturur. Kalıtım, %18 otozomal dominant, %80 otozomal resesif, %2 X'e bağlı ya da mitokondriyal kalıtım şeklindedir (4). Non-Sendromik işitme kayıplarının terminolojisinde çok sayıda gen lokusu DFN (DeaFNess) olarak adlandırılmış ve keşiflerindeki kronolojik sıraya göre numaralandırılmıştır (Tablo 1). DFN'yi takip eden "A" dominant kalıtımı, "B" resesif kalıtımı ve hiçbir harfin konmaması X'e bağlı kalıtımı ifade etmektedir. Son takı keşfedilen lokusu gösterir. Sağırılığın nonsendromik formu için, otozomal dominant lokuslar DFNA, otozomal resesif lokuslar DFNB ve X kromozomal lokuslar DFN olarak gösterilmektedir (40).

1.1.5.2.1. Non-Sendromik İşitme Kayıplarından Sorumlu Genler

İşitme kaybına neden olan genler ve bu genlerin fonksiyonel analizi hakkında hızla artan bilgiler, işitmenin moleküler mekanizmasını anlamamızı kolaylaştırmaktadır. İşitme kaybından sorumlu olduğu bilinen genlerin büyük bir

kısının fonksiyonu bilinmemektedir. Bununla birlikte işitme kaybı ile ilgili tanımlanan genler arasında iyon kanalları ve gap junction proteinlerini kodlayan genler, yapısal bütünlükte rol alan proteinleri kodlayan genler ve regülatör proteinleri kodlayan genler yer almaktadır (41,42). Bu genlerin bir kısmı fonksiyonlarına göre sınıflandırılmış olarak Tablo 2’de görülmektedir.

1.1.5.2.2. İyon Transportundan Sorumlu Olan Genler

1.1.5.2.2.1. Konneksin Proteinlerini Kodlayan Genler

Konneksin genleri, komşu hücreler arasındaki hızlı haberleşmenin sağlanması için iyonların, ikincil habercilerin ve küçük metabolitlerin hızlı geçişine imkan veren “gap junction” proteinlerinin alt birimlerini kodlarlar. Altı konneksin alt ünitesi birleşerek konneksonu meydana getirir (Şekil 4). Her biri iki komşu hücrede bulunan birer çift konneksin bir arada intersellüler kanalı meydana getirirler (41). GJB2 (konneksin 26), GJB3 (konneksin 31), GJB6 (konneksin 30) ve GJA1 (konneksin 43) olmak üzere dört konneksin geni tanımlanmıştır (42).

1.1.5.2.2.1.1. Konneksin 26 (GJB2) Geni

GJB2 (gap junction β -2) geni konneksin 26 olarak adlandırılan 26 kD’lik bir konneksin protein kodlamaktadır. GJB2’nin stria vasküleriste, basement membranda, limpu ve spiral çıkıntıda (Şekil 5) eksprese olduğu gösterilmiştir (43). GJB2 geni kromozom 13q11-q12 bölgesinde haritalanmıştır (44). GJB2 geni 2 ekzondan oluşmakta ve birinci ekzon translasyona uğramamaktadır (45).

Konneksin 26’nın fonksiyonunun işitme uyarılarının mekanik uyarıdan elektriksel uyarıya dönüşümünden sonra, potasyum iyonlarının silyalı hücrelerden destek hücrelere ve oradan da tekrar endolenfe dönmelerini sağlayan kanallar olabileceği üzerinde durulmaktadır (46).

Non-sendromik otozomal resesif işitme kayıplarının yaklaşık %50’sini GJB2 mutasyonları oluşturmaktadır. Bu gendeki önemli mutasyonlardan biri 35delG’dir. Avrupa, Kuzey Amerika ve Akdeniz toplumlarında görülen patolojik GJB2 mutasyonlarının yaklaşık %70’ini 35delG oluşturmaktadır (47).

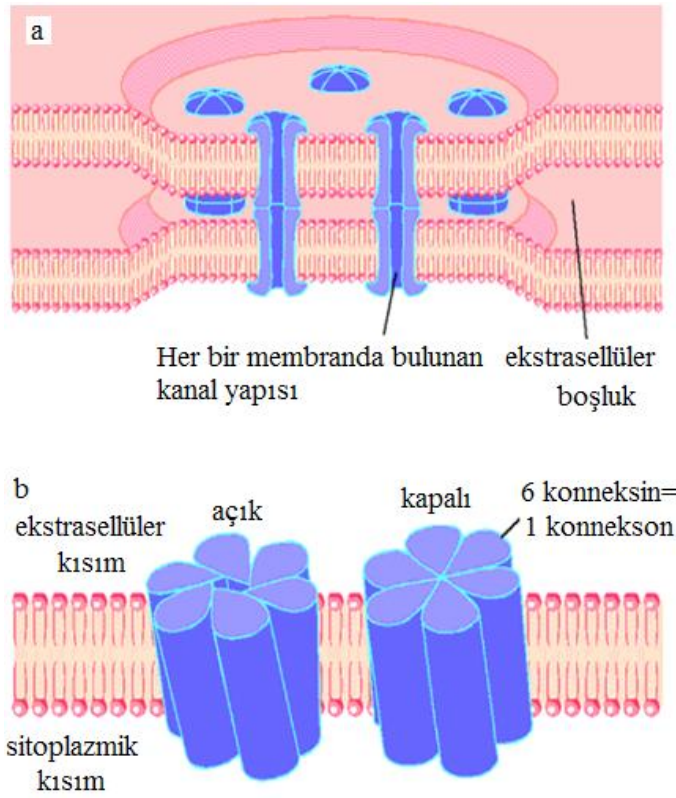
Tablo 1. Otozomal resesif non-sendromik sensörinöral işitme kaybına (NSSNİK) neden olan genler (Petersen MB ve ark.(41)'dan değiştirilerek alınmıştır).

Lokus	Kromozal lokasyon	Gen
DFNB1	13q11-q12	GJB2
DFNB2	11q13.5	GJB6
DFNB3	17p11.2	MYO7A
DFNB4	7q31	MYO15
DFNB5	14q12	SLC26A4
DFNB6	3p21	
DFNB7	9q13-q21	TMEI
DFNB8	21q22.3	TMC1
DFNB9	9q13-q21	TMPRSS3
DFNB10	21q22.3	OTOF
DFNB11	9q13-q21	TMPRSS3
DFNB12	10q21-q22	
DFNB13	7q34-q36	CDH23
DFNB14	9q31	
DFNB15	3q21.3-q25.2/19p13.3-p13.1	
DFNB16	15q15	
DFNB17	7q31	STRC
DFNB18	11p15.1	
DFNB20	11q25-qter	USH1C
DFNB21	11q23-q25	
DFNB22	16p12.2	TECTA
DFNB23	10q21.1	OTOA
DFNB26	4q31	PCDH14
DFNB27	2q23-q31	
DFNB29	21q22.1	
DFNB30	10p11.1	CLDN14
DFNB31	9q32-q34	MYO3A
DFNB32	1p22.1-p13.3	WHRH
DFNB33	9q24.3	
DFNB35	14q24.1-q24.3	
DFNB36	1p36.3	ESPN
DFNB37	6q13	MYO6
DFNB38	6q26-q27	
DFNB39	7q11.22-q21.12	
DFNB40	22q11.21-q12.1	
DFNB42	3q13.31-q22.3	
DFNB44	7p14.1-q11.22	
DFNB46	18p11.31-p11.31	
DFNB48	15q23-q25.1	
DFNB49	5q12.3-q14.1	
DFNB53	6p21.3	COL11A2
DFNB55	4q12-q13.2	

Tablo 2. Non-sendromik sensörinöral işitme kaybına (NSSNİK) neden olan genlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması (Petersen ve ark.(41)'dan değiştirilerek alınmıştır).

Protein	Gen	Non-sendromik İK lokusu
Sitoskeletal protein		
Myozin III	MYO3A	DFNB30
Myozin VI	MYO6	DFNB37
Myozin VIIA	MYO7A	DFNB2-DFNA11
Yapısal proteinler		
Stereosilin	STRC	DFNB16
α -Tektorin	TECTA	DFNB-21DFNA8/12
Otoankorin	OTOA	DFNB22
Kollagen 11 α 2	COL11A2	DFNB53
İyon transport proteinleri		
Konnexin 26	GJB2	DFNB1/DFNA3
Konnexin 30	GJB3	DFNB1/DFNA3
Konnexin 31	GJB6	DFNA2
Pendrin	SLC26A4	DFNB4
KCNQ4	KCNQ4	DFNA2
Transkripsiyon faktör proteinleri		
POU3F4	POUF4	DFN3
POU4F3	POU4F3	DFNA15

Türkiye’de ise otozomal resesif non-sendromik işitme kayıplarının %20.8’inde 35delG mutasyonu görülmektedir (48). Türkiyede farklı şehirlerde 35delG mutant allel görülme oranı %5 ile %53 arasında değişmektedir (49). Ülkemizde yapılan çalışmalarda GJB2 geninde saptanan diğer mutasyonlar W24X (%1.4), delE120 (%1), 233delG (<%1), Q80R (<%1), 310del14 (<%1), 299-300delAT (<%1), c.167delT (<%1), P184R (<%1), 236-239TGCAinsAGATCCG (<%1), L90P (<%1), P173S(<%1), R127H (<%1) ve Q80K (<%1) mutasyonlarıdır (50).



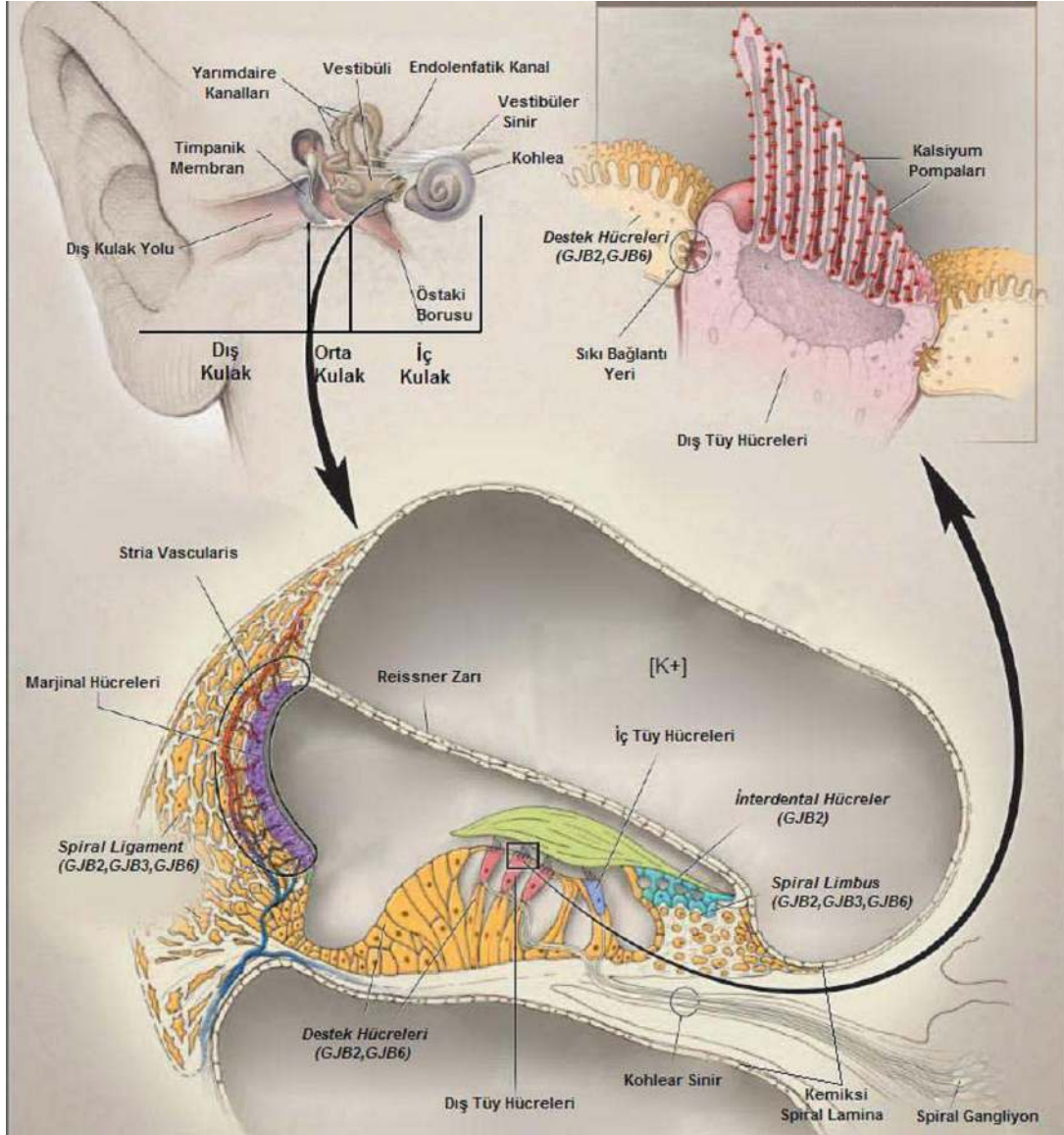
Şekil 4. Konneksinlerin yapısı.

Yapılan çalışmalarda sırasıyla, Ashkenazi Yahudileri'nde 167delT ve uzak doğuda özellikle Japon toplumunda 235delC en sık görülen GJB2 mutasyonlarıdır (51, 52, 53). GJB2 mutasyonları genellikle şiddetli ve derin prelingual sensorinöral işitme kaybına neden olmaktadır (51, 52).

1.1.5.2.2.1.2. Konneksin 31 (GJB3) Geni

GJB3 (gap junction β -3) geni, kromozom 1p35-33 bölgesinde lokalize edilmiş ve 31 kD'lik bir konneksin proteini kodlamaktadır. Hayvan modellerinde yapılan in situ hibridizasyon çalışmaları GJB3'ün kokleada, işitsel sinirlerde ve periferel sinirlerde eksprese edildiğini göstermiştir (54, 55). GJB3 mutasyonları hem dominant hem de resesif sensorinöral işitme kayıplarına neden olabilmektedir. Ayrıca, GJB3 mutasyonlarının sağırılığa neden olmadan otozomal dominant deri bozukluklarına (eritrokeratoderma variabilis) ve sensorinöral işitme kaybı ile birlikte periferel nöropatlere de neden olduğu bilinmektedir (56, 57). GJB3 genine ilişkin otozomal dominant kalıtmıli NSSNİK olgularında R180X ve E183K mutasyonları

tanımlanırken otozomal resesif tip NSSNİK olgularında 141delİle, I141V ve P223T mutasyonları tanımlanmıştır (57, 58, 59). Ülkemizde yapılan bir çalışmada P223T (%1.7) mutasyonu literatürde ilk defa tanımlanmıştır (59).



Şekil 5. İşitme kaybına sebep olan Gap Junction Beta Genleri ve kodladıkları ürünlerin lokalizasyonları (Morton and Nance 2006).

1.1.5.2.2.1.3. Konneksin 30 (GJB6) Geni

GJB6 (gap junction β -6) geni kromozom 13q12 bölgesinde haritalanmış ve 30 kD'lık bir konneksin proteini kodlamaktadır (60). GJB2 ve GJB6 genleri birbirlerine yakın konumlanmıştır (61).

Yapılan alışmalarda, NSSNİK olan bireylerde DFNB1 lokusunda bulunan GJB2 geni mutasyonlar açısından incelendiğinde yüksek sıklıkta tek allelde mutasyonlar saptanmıştır. Farklı çalışmalarda bu oran %10 ile %50 arasında değişmektedir (7). Tek allel mutasyon sıklığının geniş bir yelpaze içerisinde dağılması DFNB1 lokusunda GJB2 geni dışındaki bölge(ler)de de mutasyon olabileceğini düşündürmüştür. DFNB1 lokusunda bulunan gap junction proteinlerin kokleadaki bir diğer komponenti olan GJB6 genini kapsayan 342 kilobaz (kb) uzunluğundaki bir delesyonun [del(GJB6-D13S1830)] saptanması ile bu düşünce doğrulanmıştır (62, 63).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı İlaç Ve Eczacılık Genel Müdürlüğü Elazığ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan onay alınarak, Aralık 2009 ile Aralık 2010 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Kulak Burun Boğaz ve Hastalıkları Kliniğine başvuran ve konjenital, bilateral sensörinöral işitme kaybı tanısı alan 60 hasta üzerinde yapılmıştır. Çalışmaya alınacak tüm hastalara (18 yaşından küçüklerde velisinin onayı alınarak) çalışma hakkında sözlü olarak bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul edenler için bilgilendirilmiş onam formu doldurularak izinleri alınmıştır.

Tüm hastalardan ayrıntılı öykü alındıktan sonra fizik muayeneleri yapılmıştır. Pediatrik yaş gurubundaki hastalar sendromik hastalıklar açısından değerlendirilmek üzere pediatri kliniğine konsülte edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda gerek duyulan hastalara oftalmolojik değerlendirme, tiroid fonksiyon testleri, renal ultrasonografi ve elektrokardiyografiyi (EKG) içeren ayrıntılı inceleme yapılmıştır. Sendromik nedenli işitme azlığı saptananlarla, çevresel faktörlere bağlı işitme azlığı geliştiği şüphesi ya da kanıtı olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. Kontrol gurubu yine kulak burun boğaz kliniğine başvuran ve işitme açısından problemi olmayan 60 hastadan oluşturulmuştur. Bu hastalara da çalışma hakkında bilgi verilmiş ve onamları alınmıştır.

Çalışmaya alınanların işitme düzeylerinin belirlenebilmesi için hastanın uyumuna göre timpanometri, pürtone odyogram, otoakustik emisyon ve uyarılmış işitsel beyinsapı cevabı (*brainstem evoked response audiometry* (BERA)) testlerinden faydalanılmıştır. Goodman sınıflamasına göre (25), orta ve üzeri derecede bilateral sensörinöral işitme kaybı saptanan hastalar çalışmaya alınmıştır.

Çalışmaya alınan hastalardan 3 ml periferik venöz kan örneği pıhtılaşmayı önlemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alınmıştır. Kan örnekleri deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonu yapılmaya kadar +4 °C'de saklanmış, daha sonra örnekler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda mutasyon analizine alınmıştır.

2.2. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Gereçler

- Agaroz jel elektroforez güç kaynağı, agaroz jel tankı ve düzeneği (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belçika)
- Eppendorf mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 23331 Hamburg, Almanya)
- UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, Fransa)
- Otomatik mikropipetler (Eppendorf , Cambridge, ABD)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Ole Dich Intrumentmakers APS, type 157.MP, Almanya)
- Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japonya)
- Etüv (Nüve NP 400, Ankara, Türkiye)
- Manyetik karıştırıcı (Thermo, Cambridge, ABD)
- Ph Metre (Hana Intruments HI8521 pH meter, İtalya)
- Otoklav, (Nüve, Ankara, Türkiye)
- Buzdolabı, (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu –20 °C (Uğur, Türkiye)
- Su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Almanya)
- Vorteks (Labinco L46, Hollanda)

2.3. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Kimyasallar

- Borik asit (Merck, Frankfurt, Almanya)
- EDTA (Sigma, Almanya)
- Tris HCL (Sigma, Almanya)
- Etidium bromide (Sigma, Almanya)
- Fikol (Serva, Almanya)
- Bromofenol mavisi (Sigma, Almanya)
- Xylene cyanol (Sigma, Almanya)
- Mutlak etanol (Kimetsan, Türkiye)

- 100 baz çifti (bç) uzunluğunda DNA boyut Markırı (Fermentas, Litvanya)
- Agaroz (Sigma, Almanya)

2.4. Konneksin 26 Gen Mutasyonlarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

%15 fıkol

%0,05 bromofenol mavi

%0,05 ksilen siyanol

- **Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L)**

108 g Tris HCl

55 g Borik asit

20 ml 0,5 Molar (M) EDTA

1000 ml ddH₂O ile tamamlanır.

- **EDTA çözeltisi (0,5 M, 50 ml)**

18,6 gr EDTA tartılır, pH=8,0'e EDTA çözülünceye kadar NaOH eklenerek ayarlanır.

- **Etidium bromüd (EtBr) çözeltisi (10mg/ml)**

10 mg EtBr tartılır, üzerine 1 ml ddH₂O eklenir. Karanlıkta +4°C'de saklanır.

2.5. DNA İzolasyon İşlemi

2.5.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat-125), 1,5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 mikrolitre'lik (µl) pipet (Eppendorf research series 2100 pipettes, Almanya), pipet uçları (Deltalab 327-17), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol.

2.5.2. İzolasyon Aşamaları

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklenmiştir.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallanmış, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edilmiştir.

3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletilmiş, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edilmiştir. 13 000-16 000 rpm’de de 20 saniye santrifüj edilmiştir.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atılmıştır.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslenmiştir.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklenmiştir. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlenmiş ve sonrasında solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlenmiştir. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37 °C de inkübe edilmiştir. Eğer bir saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilmiş ve inkübasyon tekrarlanmıştır.
7. 1.5 µl RNase solüsyonu eklenmiş ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Karışım 37 °C de 15 dakika inkübe edilmiş ve devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklenmiş ve ardından 10-20 saniye vortekslenmiştir. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görülmüştür.
9. 13.000-16.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiş ve koyu kahverengi protein pelleti görülmüştür.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırılmıştır.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırılmıştır.
12. 13.000-16.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş, DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görülmüştür.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklenmiş ve -20 °C’de saklanmıştır.

2.5.3. DNA Konsantrasyonu Ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin belirlenmesi ultraviyole (UV) spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı (A_{260nm}/ A_{280nm}) 1,8'dir (64). Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1,8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1,8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1,8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (64). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1,8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması

2.6.1. PZR Materyalleri

Taq DNA polimeraz (5U/µl)	Fermentas EP0402
10XPZR buffer (10mM)	Fermentas EP0402
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas EP0402
100 mM dNTP set	Fermentas R0186
Primerler	İontek, İstanbul, Türkiye

2.6.2. Restriksiyon Enzimleri

PstI (10u/µl)	Fermentas ER0611
BseLI (BslI) (10u/µl)	Fermentas ER1201
Apal (10u/µl)	Fermentas ER1411
BseRI (10u/µl)	Biolabs R581L

2.6.3. GJB2 Mutasyonlarının Belirlenmesi

2.6.3.1. 35delG Mutasyonunun Çalışılması (65)

Forward (İleri) primer: 5' GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG 3'

Revers (Geri) primer: 5' CTGGTGGAGTGTTTGTTCAC 3'

Restriksiyon enzimi: BseLI

Restriksiyon enzimi ile kesim sonrası elde edilecek fragment büyüklükleri:

Vahşi tip: 234bç

Heterozigot: 234bç +211bç+23bç

Homozigot mutasyon: 211bç+23bç

2.6.3.2. 167delT Mutasyonunun Çalışılması (66)

Forward (İleri) primer: 5' TCT TTT CCA GAG CAAACC GC 3'

Revers (Geri) primer: 5' GAC ACG AAG ATCAGC TGC AG 3'

Restriksiyon enzimi: PstI

Restriksiyon enzimi ile kesim sonrası elde edilecek fragment büyüklükleri:

Homozigot mutasyon: 285bç

167delT Heterozigot mutasyon: 219bç, 47bç ve 69 bç

Vahşi tip: 219 bç+150bç+ 69bç+47bç

2.6.3.3. delE120 Mutasyonunun Çalışılması (67)

Forward (İleri) primer: 5' CTGCAGCTGATCTTCGTG 3'

Revers (Geri) primer: 5' GTCGTACATGACATAGAAGACGT 3'

Restriksiyon enzimi: BseRI

Restriksiyon enzimi kesim sonrası elde edilecek fragment büyüklükleri:

Vahşi tip: 127bç+116bç

delE120 Heterozigot mutasyon: 243bç+127bç+116bç

delE120 Homozigot mutasyon: 243bç

2.6.3.4. 235delC Mutasyonunun Çalışılması (68)

Forward (İleri) primer: 5' CCAGGCTGCAAGAACGTGTGC 3'

Revers (Geri) primer: 5' GACACGAAGATCAGCTGCAGG 3'

Restriksiyon enzimi: ApaI

Restriksiyon enzimi kesim sonrası elde edilecek fragment büyüklükleri:

Vahşi tip: 83bç

Heterozigot mutasyon: 83bç+61bç+22bç

Homozigot mutasyon: 61bç+22bç

2.6.3.5. GJB6 Mutasyonunun Çalışılması (69)

Delesyon

GJB6-1R: 5' TTTAGGGGCGATGATTGGGGTGATTT 3'

BKR-1: 5' CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT 3'

Vahşi tip

STS-CX636-S: 5' TGCCCACCCCCCAAGTAGAG 3'

STS-CX636-AS: 5' TTTCGGTTTCATTCATTTTCCCTATT 3'

2.6.3.6. GJB2 Geninin DNA Dizilemesi İçin Kullanılan Primerler (67)

5' AGGAAGAGATTTAAGCATGCT 3'

5' TGGAGTTTCACCTGAGGC 3'

5' CTGCAGCTGATCTTCGTG 3'

5' GTCGTACATGACATAGAAGACGT 3'

2.6.4. PZR Kurulması İşlemi

Polimeraz zincir reaksiyonu 0,5 ml'lik tüplerde toplam hacim 30µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir tüpe 6 µl hasta DNA'sı ve üzerine 3 µl MgCl₂, 3 µl 10X buffer, 3 µl dNTP (2,5mM), 1 µl primer 1 (30 pmol), 1 µl primer 2 (30 pmol), 0,1 U Taq DNA polimeraz ve 13 µl ddH₂O konulmuştur. Hazırlanan tüpler vortekslenmiş ve PZR cihazına önceden girilmiş olan programda PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR sonrası ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

2.6.5. PZR Koşulları

Değerlendirilen tüm polimorfizmler için aynı PZR koşulları kullanılmıştır.

94 °C de 5 dakika

55 °C de 1 dakika

1 döngü

72 °C de 1 dakika

94 °C de 1 dakika (denatürasyon)

60 °C de 1 dakika (eşleşme)

35 döngü

72 °C de 1 dakika (sentez)

94 °C de 1 dakika

55 °C de 1 dakika

1 döngü

72 °C de 7 dakika

2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Kesim işlemi 25 µl üzerinden yapılmıştır. 20 µl PZR ürünü, 2,5 µl 10Xbuffer, 0,5 U restriksiyon enzimi ile birlikte toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır. Kesim işlemi PstI, BseLI(BsII), ApaI ve BseRI restriksiyon enzimleri için 37° C'de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm enzimler için aynı kesim protokolü uygulanmıştır. İşlem kısaca, 25µl PZR ürünü, 1 µl restriksiyon enzimi ve 2,5 µl 10X buffer kullanılarak yapılmıştır.

2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Elde edilen ürünlerin büyüklüklerini tanımlayabilmek için %4'lük jel kullanılmıştır. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun hacim; toz halindeki agarozun 0,5XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponunda manyetik karıştırıcı bir mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi ile oluşturulmuştur. Ardından kaynamış çözelti 55-60 °C'ye soğutularak 0,25 µg/ml EtBr ilave edilmiştir. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya dökülmüştür. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0,5XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Bu tampondan jelin üzerini 1-2 mm geçecek kadar eklenmiş, örnekler ve belirteç DNA, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyulara 15'er µl yüklenmiştir. Güç kaynağı açılarak 90 V'a ayarlanmış, yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatılmıştır. Jel görüntüleme sisteminde UV ışını altında incelenmiştir.

2.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiklerin hazırlanmasında SPSS for Windows 15.0 paket istatistik programı (SPSS Inc. Chicago IL USA) kullanılmıştır. Parametreler arası ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Ki-kare analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışma grubunda konjenital non-sendromik sensörinöral işitme kaybı olan 60 hasta, kontrol grubunda ise işitme açısından problemi olmayan 60 hasta yer almıştır (Tablo 3-4).

Tablo 3. Çalışma ve kontrol gruplarının yaş dağılımı

Grup	Olgu sayısı (n)	Yaş Ortalaması	Yaş aralığı
Çalışma	60	12,11±9,03	(2-43 yaş)
Kontrol	60	20,38±9,64	(8-50 yaş)

Tablo 4. Çalışma ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı

Grup	Cinsiyet	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Çalışma	Kadın	25	41,7
	Erkek	35	58,3
	Toplam	60	100,0
Kontrol	Kadın	25	41,7
	Erkek	35	58,3
	Toplam	60	100,0

Çalışma ve kontrol grubundaki tüm hastaların işitme kayıpları, Goodman sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre çalışma grubunda iki hastada (%3,3) orta-ileri derecede işitme kaybı, 24 hastada (%40) ileri derecede işitme kaybı ve 34 hastada (%56,7) ise çok ileri derecede işitme kaybı saptanmıştır. Kontrol grubundaki tüm hastalar ise normal işitme düzeylerine sahipti. Çalışma ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, işitme kaybı açısından, odyoloji bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 5).

Çalışma grubundaki hastaların 11'inin (%18,3) ailesinde SNİK öyküsü varken, kontrol grubundaki hastaların hiçbirinin ailesinde SNİK öyküsü bulunmamıştır. Çalışma ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, ailede SNİK öyküsünün varlığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 5. Çalışma ve kontrol gruplarının odyolojik bulgularının dağılımı

Grup	İşitme kaybının derecesi	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Önemlilik testi
Çalışma				
	– Orta-ileri derecede işitme kaybı (56-70 dB)	2	3,3	$\chi^2=120,000$ p=,000
	– İleri derecede işitme kaybı (71-90 dB)	24	40,0	
	– Çok ileri derecede işitme kaybı (91 dB ve üzeri)	34	56,7	
	Toplam	60	100,0	
Kontrol				
	– Normal işitme (25 dB ve altı)	60	100,0	

Çalışma ve kontrol gruplarındaki tüm hastalar 35delG, 167delT, delE120, 235delC ve GJB6 mutasyonları açısından incelenmiştir. Saptanan mutasyonların varlığını teyit etmek ve yeni mutasyonları araştırmak için çalışma grubundaki tüm hastalara DNA dizileme de yapılmıştır.

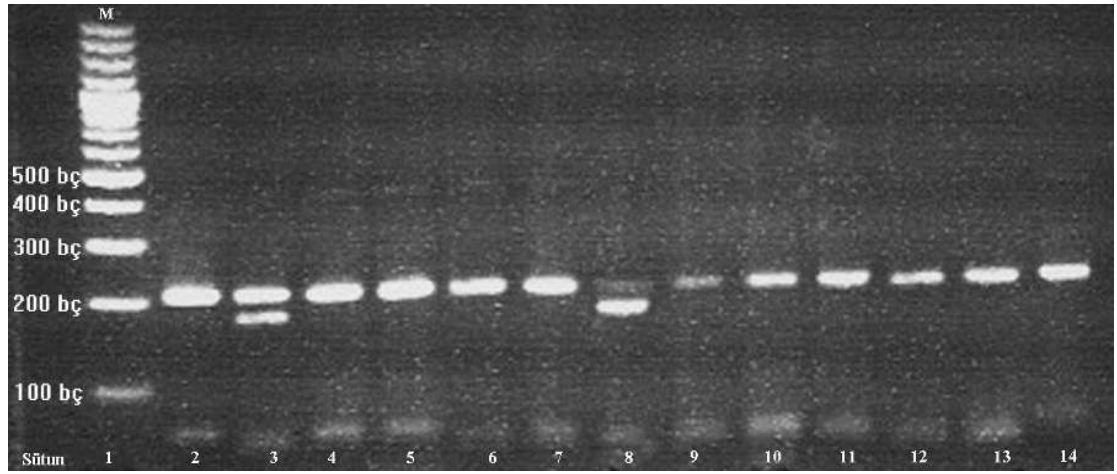
Çalışma grubunda yer alan toplam 60 hastanın altısında (%10) mutasyon tespit edilmiştir. Bu hastaların beşinde 35delG (%8,3) ve birinde de (%1,7) delE120 mutasyonu saptanmıştır. Kontrol grubunda ise hiçbir hastada mutasyon saptanmamıştır. Bu sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Çalışma ve kontrol gruplarındaki tüm hastalar 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir. Çalışma grubunda beş hastada 35delG mutasyonu görülmesine rağmen, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 6). 35delG mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 6’da gösterilmiştir.

Çalışma ve kontrol gruplarındaki tüm hastalar 167delT mutasyonu açısından incelenmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların hiçbirinde 167delT mutasyonu tespit edilmemiştir. 167delT mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 7’de gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışma ve kontrol gruplarında 35delG mutasyonunun dağılımı

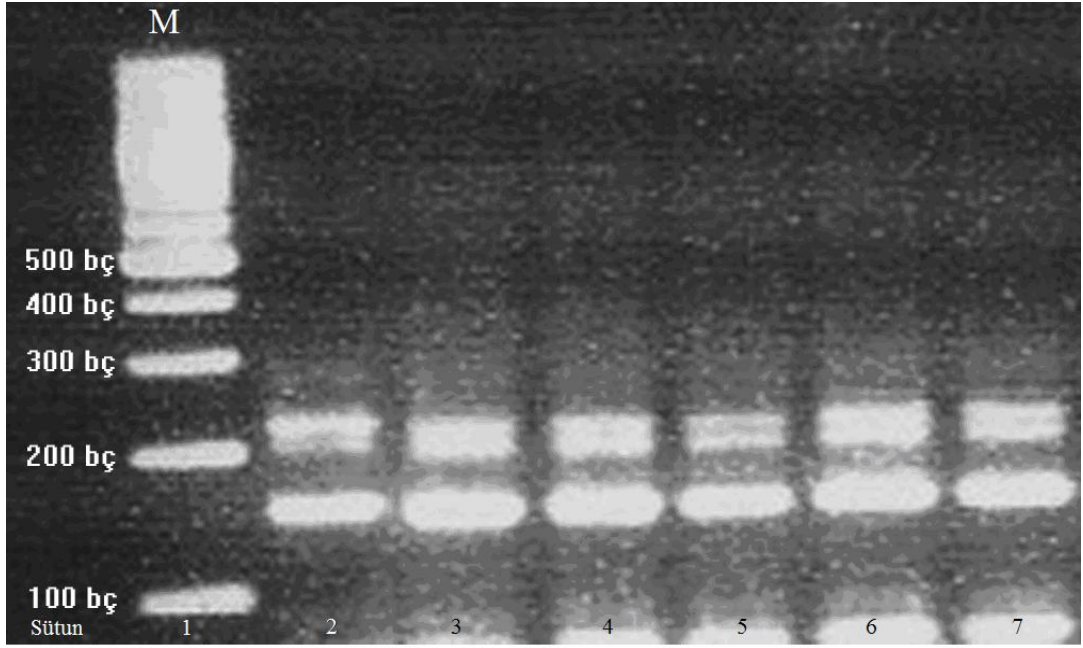
Grup	Mutasyon	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Önemlilik testi
Çalışma	Yok	55	91,7	p=,057
	Var	5	8,3	
	Toplam	60	100,0	
Kontrol	Yok	60	100,0	



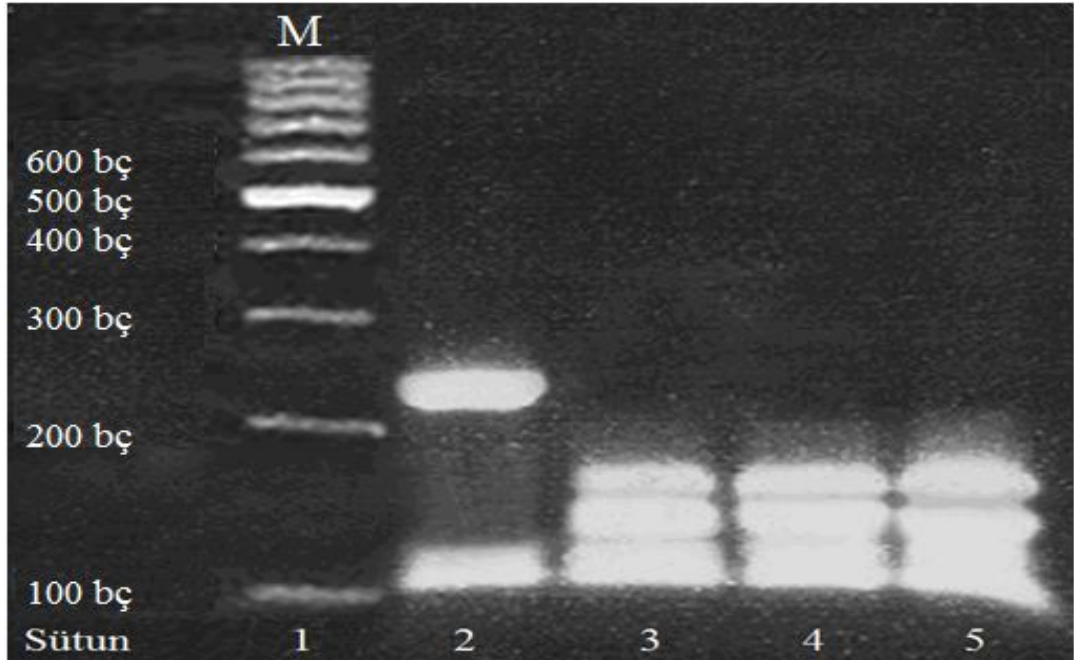
Şekil 6. 35delG mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sütun 1'de 100bp'lik DNA boyut markırı, sütun 2'de vahşi tip allel (234 bp), sütun 3'de heterozigot mutasyon (234bp+211bp+23bp) ve sütun 8'de homozigot mutasyon (211bp+23bp) görülmektedir).

Çalışma grubundaki hastaların birinde (%1,7) delE120 mutasyonu gözlenirken, kontrol grubundaki hastaların hiçbirinde delE120 mutasyonu tespit edilmemiştir. Çalışma grubunda, delE120 mutasyonu tespit edilen hastada bu mutasyonun homozigot olduğu saptanmıştır. Gruplar arasında delE120 mutasyonunun görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$).

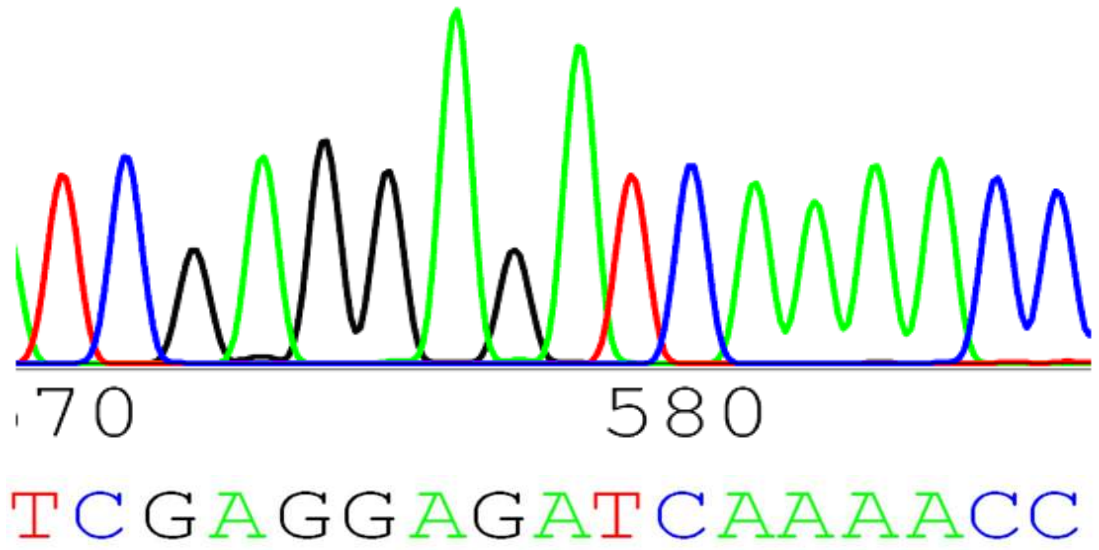
GJB2 genindeki delE120 mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 8'de gösterilmiştir. GJB2 genindeki delE120 mutasyonu için yapılan DNA dizilemede, mutasyonun olmadığı bir hasta (Şekil 9) ile delE120 homozigot mutasyonu görülen hastanın DNA dizilemesi ve mutasyonun yeri Şekil 10'da gösterilmiştir.



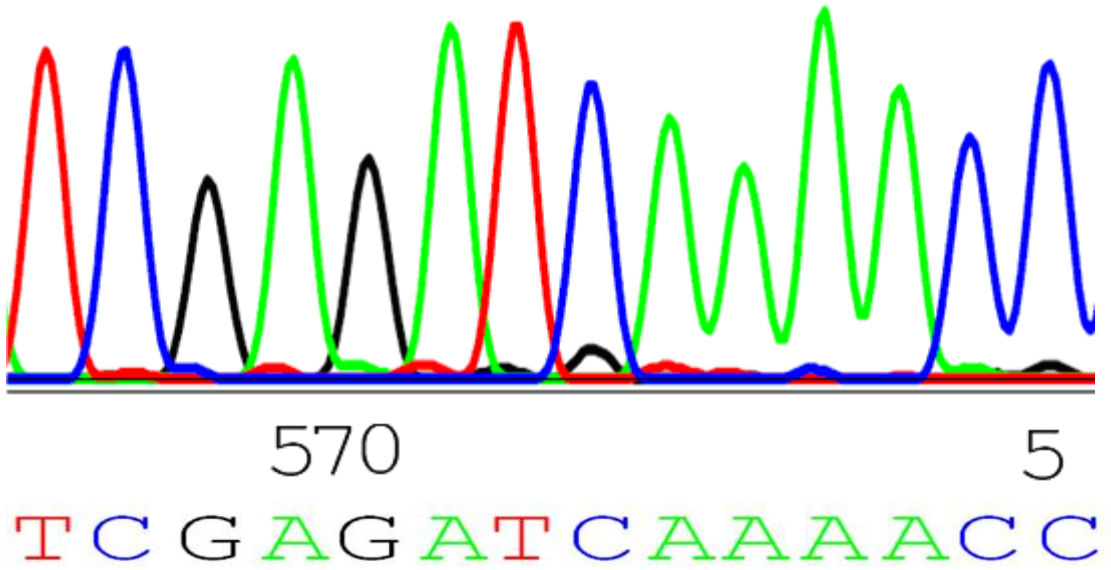
Şekil 7. 167delT mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sütun 1’de 100bç’lik DNA boyut markırı, diğer sütunlarda ise (2-7) vahşi tip allel (219 bç+150bç+69bç+47bç) görülmektedir).



Şekil 8. delE120 mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sütun 1’de 100bç’lik DNA boyut markırı, sütun 2’de 120delE homozigot mutasyonu (243bç) ve diğer sütunlarda (3-6) vahşi tip allel (127bç+116bç) görülmektedir).

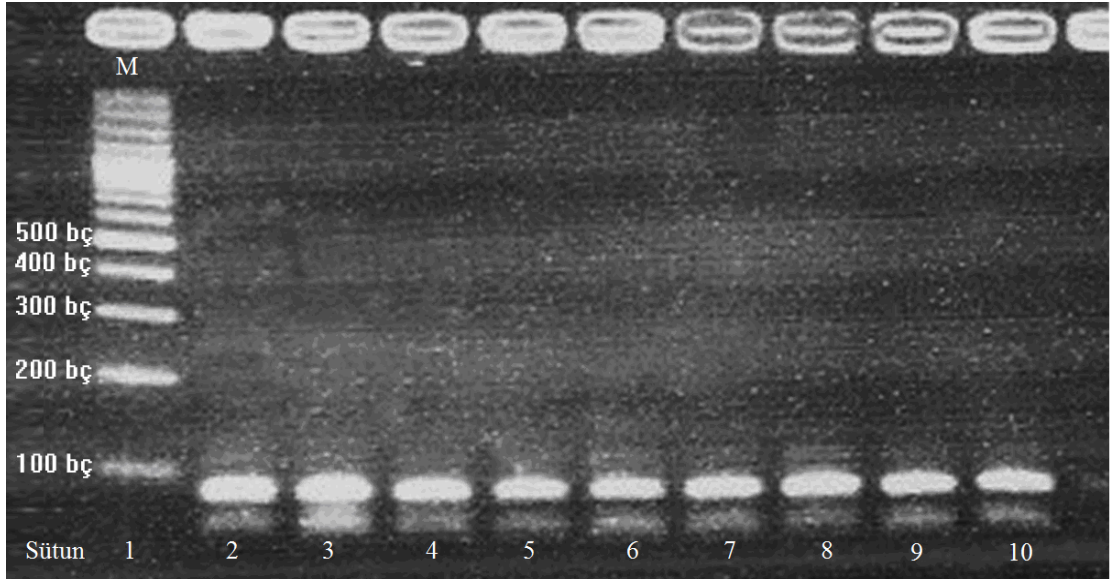


Şekil 9. 120delE için vahşi tip bir örneğe ait DNA dizileme sonucu.



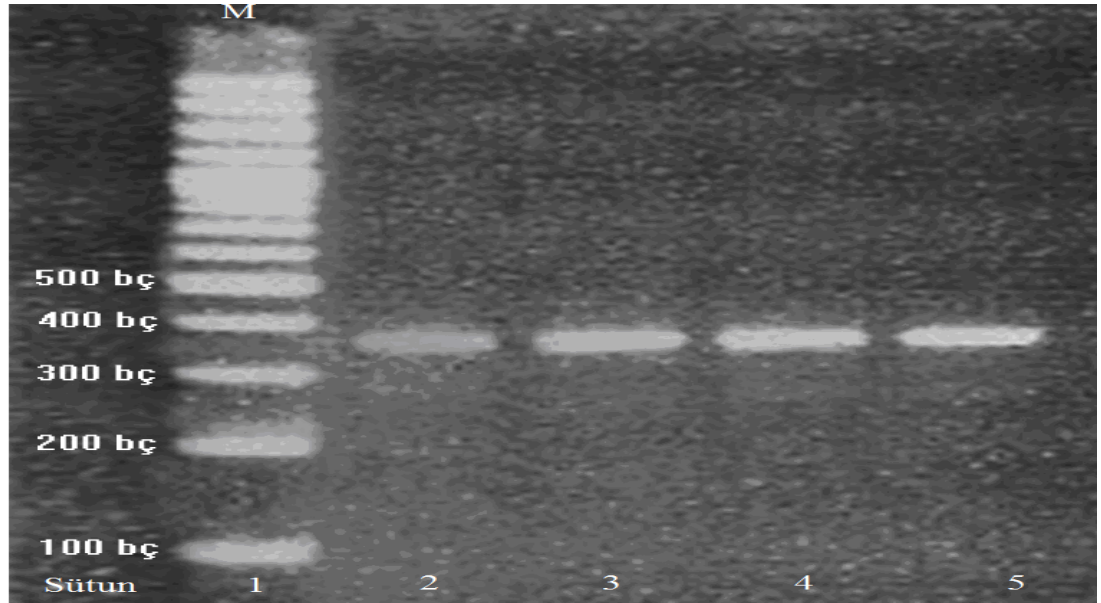
Şekil 10. 120delE mutasyonuna sahip hasta bireye ait DNA dizileme sonucu (120delE mutasyonu normal diziden 6, 7 ve 8. pozisyonundaki GAG nükleotidlerinin delesyonu ile gerçekleşmiştir. Normal dizi olan GAGGAGATC, GAG delesyonu ile GAG↓ATC şeklinde değişmiştir).

Çalışma ve kontrol gruplarındaki tüm hastalar 235delC mutasyonu açısından incelenmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların hiçbirinde 235delC mutasyonu tespit edilmemiştir. 235delC mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. 235delC mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sütun 1’de 100bç’lik DNA boyut markırı, diğer sütunlarda ise (2-10) vahşi tip allel (83bç) görülmektedir).

Çalışma ve kontrol gruplarındaki tüm hastalar GJB6 mutasyonu açısından incelenmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların hiçbirinde GJB6 mutasyonu tespit edilmemiştir. GJB6 mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. GJB6 mutasyonu için yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sütun 1’de 100bç’lik DNA boyut markırı, diğer sütunlarda ise (2-5) vahşi tip allel (357bç) görülmektedir).

Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile 35delG mutasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; ailelerinde SNİK öyküsü olanların %27,3'ünde 35delG mutasyonu tespit edilirken, ailelerinde SNİK öyküsü olmayanlarda bu oran %4,1'dir (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile 35delG mutasyonu arasındaki ilişki

35delG	Ailede SNİK				Toplam	
	Yok		Var			
	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Yok	47	95,9	8	72,7	55	91,7
Var	2	4,1	3	27,3	5	8,3
Toplam	49	100,0	11	100,0	60	100,0

Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile delE120 mutasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; ailelerinde SNİK öyküsü olanların %9,1'inde delE120 mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışma grubunda, ailede SNİK öyküsü ile delE120 mutasyonu arasındaki ilişki

delE120	Ailede SNİK				Toplam	
	Yok		Var			
	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Yok	49	100,0	10	90,9	59	98,3
Var	0	,0	1	9,1	1	1,7
Toplam	49	100,0	11	100,0	60	100,0

Çalışma grubundaki hastalarda, 35delG ve delE120 mutasyonları varlığı ile odyoloji skorları ve cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Çalışma grubundaki hastaların ailelerinde SNİK öyküsünün varlığı ile 35delG mutasyonu varlığı arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki ($r=0,325$;

p=0,011) tespit edilmiştir. Benzer şekilde ailede SNİK öyküsünün varlığı ile delE120 mutasyonu varlığı arasında da pozitif yönde zayıf bir ilişki ($r=0,275$; $p=0,034$) tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışma grubunda 35delG, delE120 mutasyonları ile odyoloji, ailede SNİK öyküsü ve cinsiyet arasındaki ilişki

	Önemlilik testi	35delG	delE120
Odyoloji	r	,144	-,138
	p	,271	,291
	n	60	60
Ailede SNİK	r	,325	,275
	p	,011	,034
	n	60	60
Cinsiyet	r	-,112	,110
	p	,394	,403
	n	60	60

4. TARTIŞMA

Doğumsal işitme kaybı ortalama olarak her 1000 canlı doğumda bir görülmektedir. Bu rakamın yaklaşık yarısı genetik nedenlere ve diğer yarısı çevresel nedenlere bağlıdır (3). Genetik etiyojisi belirlenmiş olgular sendromik ve non-sendromik olarak ikiye ayrılmaktadır. İşitme kaybına başka hiçbir patolojik organ veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği duruma non-sendromik işitme kaybı denilmektedir. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir. Kalan %30'luk grupta ise sendromik nedenli işitme kayıpları gözlenmektedir (26). Non-Sendromik işitme kayıplarında kalıtım, %18 otozomal dominant, %80 otozomal resesif, %2 X'e bağlı veya mitokondriyal kalıtım şeklindedir (4).

Non-sendromik otozomal resesif sensörinöral işitme kayıplarının klinik seyirleri genellikle pre-lingual başlangıçlı, progresif olmayan ve ağır işitme kayıpları olarak görülür. Otozomal dominant sensörinöral işitme kayıpları ise genellikle post-lingual başlangıçlı, progresif, orta-ağır işitme kaybı olarak görülmektedir (41).

Non-sendromik otozomal resesif işitme kayıplarının yaklaşık %50'sini GJB2 mutasyonları oluşturmaktadır. Yapılan birçok klinik çalışmada konneksin 26 proteininin ekspresyonunu kodlayan GJB2 geninde oluşan mutasyonların, K⁺ iyonlarının endolenfe geri dönüşümünü bozduğu ve korti organında ilerleyici hasara yol açtığı görülmüştür (70).

GJB2 geninde şu ana kadar 90'nın üzerinde mutasyon tanımlanmıştır (10). GJB2 mutasyonları toplumun etnik kökenine bağlı olarak, belirgin bir şekilde değişmektedir. Bu gendeki en sık görülen mutasyon 35delG'dir. Avrupa, Kuzey Amerika ve Akdeniz toplumlarında görülen patolojik GJB2 mutasyonlarının yaklaşık %70'ini 35delG oluşturmaktadır (47). Türkiyede farklı şehirlerde 35delG mutant allel görülme oranı %5 ile %53 arasında değişmektedir (49). Yapılan çalışmalarda 35delG dışında başka etnik gruplarda yüksek frekanslı GJB2 mutasyonları da bulunmuştur. Bunlar, Aşkenazi Yahudilerinde 167delT, uzak doğuda özellikle Japon toplumunda 235delC ve Afrikalılarda R143W mutasyonları olarak sayılabilir (51-53).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, GJB2 geninde en sık 35delG mutasyonu izlenmekle birlikte, W24X (%1,4), delE120 (%1), 233delG (<%1), Q80R (<%1), 310del14 (<%1), 299-300delAT (<%1), c.167delT (<%1), P184R (<%1), 236-239TGCAinsAGATCCG (<%1), L90P (<%1), P173S(<%1), R127H (<%1) ve Q80K (<%1) mutasyonları da görülmüştür (50). Biz de çalışmamızda, GJB2 genindeki 35delG, 167delT, delE120, 235delC mutasyonları ile GJB6 genindeki mutasyonları araştırdık.

GJB2 genindeki 35 delG mutasyonu, her iki ucunda timin bulunan ardışık altı guaninden birinin delesyonu sonucu çerçeve kayması mutasyonu ile erken stop kodonu oluşturmaktadır. Delesyon sonucunda oluşan erken stop kodonu, fonksiyonel bölgesinden yoksun eksik bir protein oluşumuna yol açmaktadır. Bu eksik proteinin, GJB2 gen ürününün majör fonksiyonunda önemli bir kayba neden olarak fenotip üzerinde ciddi etkilere sahip olabileceği öngörülmektedir (3).

İşitme kaybına neden olan 35delG mutasyonunun görülme sıklığı ırklara ve popülasyonlara göre büyük farklılıklar göstermektedir. Dünyada farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda 35delG homozigot mutasyonu farklı oranlarda saptanmıştır. Amerika’da yapılan üç farklı çalışmada, 35delG homozigot mutasyonunu Kenna ve ark. (43) %2, Prasad ve ark. (71) %14,8 ve Kelley ve ark. (60) %24,1 oranında saptamışlardır. Lui ve ark. (55) tarafından Çin’de yapılan bir çalışmada 118 olgunun hiç birinde homozigot 35delG mutasyonu saptanmamıştır. Yine non-sendromik SNİK’li hastalarda Japonya, Gana, Hindistan, Kore, Pakistan, Tayvan ve Tayland’da yapılan çalışmalarda homozigot 35delG mutasyonu rapor edilmemiştir (41).

Çok merkezli olarak yapılan bir çalışmada, homozigot 35delG mutasyon oranının popülasyonlarda %1,8-%40 arasında değiştiği bulunmuştur (58). Aynı ülkede farklı popülasyonlar arasında yapılan çalışmalarda çok büyük farklar ortaya çıkabilmektedir. Minarik ve ark.’ı tarafından 2005 yılında Slovakya’da yapılan bir çalışmada %40 oranında homozigot 35delG mutasyonu saptanırken aynı çalışma grubu tarafından 2003 yılında Doğu Slovakya’da Roman popülasyonunda yapılan bir çalışmada homozigot 35delG mutasyonu, non-sendromik SNİK’li hastalarda %1,9 oranında saptanmıştır (58).

Tekin ve ark.'nın (72) yapmış olduğu bir çalışmada; Ankara, Afyon, Amasya ve Denizli illerinde işitme engelliler okullarında eğitim gören prelingual başlangıçlı non-sendromik SNİK'li toplam 371 hasta GJB2 geninde bulunan mutasyonlar açısından araştırılmıştır. Toplam 371 hastanın 56'sında (%15) homozigot 35delG mutasyonu, 29'unda (%7,81) ise heterozigot 35delG mutasyonu saptanmıştır. Tekin ve ark. (49) Türkiye'de farklı illerde 35delG mutasyonunu %5 ile %53 arasında değişen oranlarda saptamışlardır. Kalay ve ark. (50) yaptıkları bir çalışmada, 93 prelingual işitme kayıplı hastanın 20'sinde (%21,5) homozigot, dördünde heterozigot (%4,3) 35delG mutasyonu saptamıştır. Barış ve ark.'nın (73) yapmış oldukları bir çalışmada ise non-sendromik SNİK'li 235 hasta 35delG mutasyonu açısından araştırılmış ve homozigot 35delG mutasyonu 48 (%20,4) hastada saptanırken, 5 (%2,1) hastada heterozigot mutasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise beş hastada (%8,3) 35delG mutasyonu tespit edilmiştir. 35delG mutasyonu tespit edilen bu hastaların üçünde (%4,98) homozigot mutasyon saptanırken, ikisinde (%3,32) heterozigot mutasyon saptanmıştır.

35 delG mutasyonları açısından, Tekin ve ark.'nın (72) ve Kalay ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmalarda saptamış oldukları mutasyon oranları ile kıyaslandığında, bizim çalışmamızda daha düşük mutasyon oranları saptanmıştır. Benzer şekilde Barış ve ark.'nın (73) yaptıkları çalışma ile kıyaslandığında da daha düşük mutasyon oranları saptanmıştır. Literatürde de görüldüğü gibi bölgeler ve toplumlar arasında 35delG mutasyonu görülme sıklığı farklılıklar göstermektedir.

GJB2 geninde 35delG mutasyonu her iki allelede mutant olduğu durumda SNİK'e neden olmaktadır. Araştırmamızdaki çalışma gurubundaki hastalar aile öyküsü varlığı açısından incelendiğinde, 60 hastanın 11'inin (%18,3) ailesinde en az bir bireyde daha konjenital NSSNİK öyküsü mevcudiyeti saptanmıştır. Ailede SNİK öyküsü ile 35delG mutasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; ailelerinde SNİK öyküsü olanların %27,3'ünde 35delG mutasyonu tespit edilirken, ailelerinde SNİK öyküsü olmayanlarda bu oran %4,1 olarak bulunmuştur. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Uyguner ve ark.'nın (59) yaptıkları bir çalışmada, ailesel otozomal resesif kalıtım kalıbına uyan NSSNİK'li 60 hasta 35delG mutasyonu açısından

incelenmiştir. 35delG homozigot mutasyonu 13 hastada (%21,7), heterozigot mutasyonu ise 2 (%3,3) hastada saptanmıştır. Tekin ve ark.'nın (72) yapmış olduğu çalışmada ailesel otozomal resesif NSSNİK olan 154 hasta incelenmiş, 27 hastada (%17,5) 35delG homozigot mutasyonu ve üç hastada (%1,9) heterozigot 35delG mutasyonu tespit edilmiştir.

Bayazit ve ark.'nın (74) yaptıkları çalışmada, ailesel otozomal resesif kalıtım kalıbına uyan 14 NSSNİK'li hasta 35delG mutasyonu için incelenmiş ve bir (%7,1) hastada homozigot mutasyon, bir hastada da (%7,1) heterozigot mutasyon tespit edilmiştir. Kalay ve ark.'ı (48) 93 ailesel otozomal resesif NSSNİK'li hastayı 35delG mutasyonu açısından incelemişlerdir. Yirmi hastada (%21,5) homozigot, dört hastada (%4,3) ise heterozigot 35delG mutasyonu saptamışlardır.

Çalışmamızdaki hastaların 11'inin (%18,3) ailesinde SNİK öyküsü saptanmıştı. Bu 11 hastanın üçünde (%27,3) 35delG mutasyonu da saptanmıştır. Bunlardan ikisinde (%18,1) homozigot mutasyon, birinde (%9,2) ise heterozigot mutasyon bulunmuştur. Kalan 8 hastada ise 35delG mutasyonu saptanmamıştır. 35delG homozigot mutasyonu ailesel otozomal resesif NSSNİK'li hastalarda %18,1 oranında saptanmıştır ve bu oran çalışma grubunun genel mutasyon oranına (%8,3) göre daha yüksek bir değerdir. Bu sonuç, literatürle uyumlu olarak NSSNİK'li hastalarda aile öyküsünün önemli olduğunu göstermektedir.

35delG mutasyonunun taşıyıcılık oranlarının, Yunanistan'da %3.0, İspanya'da %2.3, İtalya'da %3.1, Almanya'da %2, Estonya'da %4.0, Tunus'ta %1.2, Afrika'da %0, beyaz ırkta ise %0-2.5 aralığında olduğu bildirilmiştir (11). Yine aynı çalışmada Güney Avrupa'da %2.8, Kuzey Avrupa'da ise %1.3'lük taşıyıcı sıklığı gözlenmiştir. Türkiyede yapılan bazı çalışmalarda, 35delG mutasyonu taşıyıcı oranları sırasıyla %0.8, %2.7, %1.8 olarak bulunmuştur (59, 40, 11). Bizim çalışmamızda yer alan kontrol grubundaki 60 hastanın hiçbirinde mutant allel izlenmemiştir. Bu sonuç bölgeler arası farklılığa yada kontrol grubumuzda incelenen hasta sayısının daha az olmasına bağlı olabilir.

35delG mutasyonu beyaz ırkta en yaygın görülen mutasyondur (11). 2001 yılında Belçika, İngiltere ve Amerika'daki beyaz ırkta, 35delG mutasyonunu içeren, dar bir bölgede aynı haplotipin gözlenmesi, bu mutasyonun çok eski dönemlerde

ortaya çıkan ve ortak bir atadan türeyen atasal (founder) mutasyon olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Yapılan araştırmalarla, 35delG'nin yaklaşık olarak 500 kuşak önce oluşmuş ve 10.000 yaşında olan çok eski bir mutasyon olduğu saptanmıştır. Mutasyonun Orta Doğu'dan köken aldığı ve popülasyonların göçleriyle Akdeniz ve Karadeniz kıyılarını takiben iki ayrı rota izleyerek Avrupa'ya yayıldığı düşünülmüştür (75). Ülkemiz coğrafik yerleşimi nedeniyle mutasyonun yayıldığı göç yolları üzerinde yer almaktadır. Bu nedenle ülkemizde de bu mutasyonlara sık olarak rastlanılması beklenmektedir.

167delT mutasyonu ilk kez Zelante ve ark.'nın (76) yaptığı bir çalışmada tanımlanmıştır. Delesyon 56. kodonda çerçeve kaymasına yol açar ve ilk 55 aminoasidi sağlam olan fakat karboksi ucunda 25 yeni aminoasit içeren bir polipeptid oluşumuna neden olur (77). Bu mutasyon en sık Aşkenazi Yahudilerinde görülmektedir. Aşkenazi Yahudilerinde, konjenital NSSİK'li hastalarda GJB2 mutasyonlarından olan 167delT mutasyonunun %84 oranında görüldüğü açıklanmıştır (51).

Aşkenazi Yahudi toplumunda 35delG mutasyonunun taşıyıcı sıklığı %0,73 iken bir başka GJB2 mutasyonu olan 167delT'nin taşıyıcı sıklığının %4,03 olduğu görülmüştür (51). 167delT mutasyonu için korunmuş bir haplotipin olması, bu mutasyonu taşıyan allelin tek bir kökenden ortaya çıktığını düşündürmektedir (51).

Tekin ve ark.'nın (78) 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada 167delT mutasyonu, Türk toplumundan alınan geniş bir örnek grubunda hiç bulunmazken, 2003 yılında yine ülkemizde yaptıkları diğer bir çalışmada bir allelede (%0,3) bu mutasyon görülmüştür (49). Aşkenazi Yahudi toplumu dışında nadir görülen bu mutasyona bizim çalışmamızda da rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer mutasyon olan delE120 mutasyonu konneksin 26 geninde 120. pozisyonundaki glutamin amino asidinin delesyonu sonucu oluşmaktadır. Tekin ve ark. (72) konjenital NSSNİK'li 371 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, dört hastada (%1,07) homozigot ve bir hastada (%0,26) heterozigot delE120 mutasyonu tespit etmişlerdir. Uyguner ve ark. (59) konjenital NSSNİK'li 60 hasta ile yaptıkları çalışmada bir hastada (%1,66) homozigot delE120 mutasyonu saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise Kalay ve ark. (50) konjenital NSSNİK'li 93

hastanın birinde (%1,07) homozigot delE120 mutasyonu bulmuşlardır. Bizim araştırmamızda, çalışma gurubunda yer alan 60 hastanın birinde (%1,66) homozigot delE120 mutasyonu tespit edilmiştir. Kontrol gurubunda ise delE120 mutasyonu görülmemiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda bulunan delE120 mutasyonu oranlarına bakıldığında yaklaşık olarak %1 olduğu görülmektedir, bizim sonuçlarımız da literatürle uyumlu bulunmuştur.

Çalışma gurubunda delE120 mutasyonu tespit edilen hastada aile öyküsünün de mevcut olduğu görülmüştür. Çalışma grubunda, ailede NSSNİK öyküsü ile delE120 mutasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; ailelerinde konjenital NSSNİK öyküsü olan 11 hastanın birinde (%9,1) delE120 mutasyonu tespit edilirken, ailelerinde NSSNİK öyküsü olmayanların hiçbirinde delE120 mutasyonu tespit edilmemiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

235delC mutasyonu ilk kez Kudo ve ark. tarafından tanımlanmıştır (52). Özellikle Japonya ve Kore gibi uzak doğu ülkelerinde görülmektedir. Mutasyon 235. pozisyondaki sitozin amino asidinin delesyonuna bağlı çerçeve kayması şeklinde oluşmaktadır (52). Japonya’da konjenital NSSNİK’li hastalarda yapılan mutasyon taramalarında 35delG ve 167delT görülmezken, 235delC mutasyonuna yüksek oranlarda rastlanmaktadır. Hayashi ve ark. (79) yaptıkları çalışmada 126 konjenital NSSNİK’li hastayı incelemiş ve 235delC mutasyonunu %44,8 gibi yüksek bir oranda bulmuşlardır. Kudo ve ark.’nın yapmış oldukları çalışmada sağlıklı Japon toplumunda taşıyıcılık oranı yaklaşık %1 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda 235delC mutasyonu tespit edilmemiştir (49, 50, 59, 74). Ülkemizdeki araştırmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol gruplarında 235delC mutasyonu görülmemiştir.

GJB2 ve GJB6 genleri birbirlerine yakın konumlanmıştır (61). Yapılan çalışmalarda, NSSNİK olan bireylerde DFNB1 lokusunda bulunan GJB2 geni mutasyonlar açısından incelendiğinde yüksek sıklıkta tek allelde mutasyonlar saptanmıştır. Farklı çalışmalarda bu oran %10 ile %50 arasında değişmektedir (7). Tek allel mutasyon sıklığının geniş bir yelpaze içerisinde dağılması DFNB1 lokusunda GJB2 geni dışındaki bölge(ler)de de mutasyon olabileceğini düşündürmüştür. DFNB1 lokusunda bulunan gap junction proteinlerin kokleadaki bir

diğer komponenti olan GJB6 genini kapsayan 342 kilobaz (kb) uzunluğundaki bir delesyonun (del(GJB6-D13S1830)) saptanması ile bu düşünce doğrulanmıştır (62, 63).

GJB6 genindeki del(GJB6-D13S1830) mutasyonu, 42 kb'lık büyük bir delesyon ile oluşan mutasyondur (62). İspanya'da yapılan bir çalışmada 33 konjenital NSSNİK'li hastanın 22'sinde GJB2 geni mutasyonlarıyla birlikte del(GJB6-D13S1830) mutasyonu heterozigot olarak görülürken, sadece 1 hastada homozigot del(GJB6-D13S1830) mutasyonuna rastlanmıştır (80). Fransa ve İsrail'de del(GJB6-D13S1830) mutasyonunun GJB2 mutasyonları ile birlikte heterozigot olarak %16 ile %20,9 oranında görüldüğü ve sendromik olmayan işitme kaybına neden olduğu tespit edilmiştir (80).

Türkiye'de Kalay ve ark.'nın (50), Uyguner ve ark.'nın (59), Tekin ve ark.'nın (49) yaptıkları çalışmalarda, konjenital NSSNİK'li hastalarda, del(GJB6-D13S1830) mutasyonları saptanmamıştır. Ülkemizdeki çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da GJB6 mutasyonu saptanmamıştır.

Çalışma grubundaki tüm hastaların işitme kayıpları, Goodman sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre çalışma grubunda iki hastada (%3,3) orta-ileri derecede işitme kaybı, 24 hastada (%40) ileri derecede işitme kaybı ve 34 hastada (%56,7) ise çok ileri derecede işitme kaybı saptanmıştır. Mutasyon tespit edilen altı hastanın ikisinde (%33,3) ileri derecede, dördünde (%66,7) ise çok ileri derecede işitme kaybı mevcuttu. Çalışma grubundaki hastalarda, 35delG ve delE120 mutasyonları varlığı ile odyoloji skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda mutasyon tespit edilen hastalarda işitme kaybı ileri ve çok ileri derecede saptanmıştır. Bu sonuçlar, Wilcox ve ark.'nın (81) çalışmalarıyla uyumlu olarak GJB2 mutasyonlarının neden olduğu işitme kayıplarında, işitme seviyelerinin ayırıcı tanı kriteri olamayacağını göstermektedir. Bu durum moleküler tanı testlerinin önemini bir kez daha göstermektedir.

Sonuçta, bu çalışmada literatürle uyumlu olarak en sık görülen mutasyon 35delG (%8,3) bulunmuştur. Ayrıca bir hastada (%1,66) delE120 mutasyonu tespit

edilmiştir. 167delT, 235delC mutasyonları ile GJB6 geni mutasyonları görülmemiştir. Yapılan DNA dizilemede yeni bir mutasyona da rastlanmamıştır.

Bu çalışma GJB2 geni mutasyonlarının araştırıldığı yöremizdeki ilk çalışmadır. Mutasyon oranları Türkiye ortalamasının altında bulunmasına rağmen, ülkemizde de mutasyon oranları bölgelere göre oldukça farklılıklar göstermektedir. Daha fazla hasta ile yapılacak çalışmaların mutasyonun gerçek sıklığını belirlemeye katkısı olacaktır.

Genetik hastalıklar hakkında toplumsal bilincin artması, işitme kayıplı hasta ve ailelerinin hastalığın genetik sebepleri için yapılan testlere katılımını da arttıracaktır. Hasta tabanlı genetik danışmanlık işitme kaybının etiyojisinin belirlenmesinde ve genetik testlerle heterozigot ve homozigot bireylerin tanımlanmasında son derece önemlidir.

GJB2 geni mutasyonu taşıyıcısı sağlıklı kişilere muhtemel gebeliklerdeki riskler, gebelik öncesi ve sonrasında yapılması gerekenler, hastalığın seyri, tedavi yöntemleri ve bunların sonuçları konusunda genetik danışmanlık hizmeti verilmelidir. GJB2 geni mutasyonları için taşıyıcı olduğu bilinen ebeveynlerin tüm gebeliklerinde prenatal ya da erken postnatal incelemeler yapılmalıdır. Böylelikle etkilenmiş bireylerin erken tespiti ve gerekli tedaviye erken başlanması sağlanacaktır.

5. KAYNAKLAR

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46: 486–491.
2. Genc GA, Basar F, Kayikci ME, Turkyilmaz D, Fırat Z, Duran O, et al. Newborn hearing screening outcomes in Hacettepe University. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005; 48: 119–124.
3. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A huge review. *Genet Med* 2002; 4: 258-274.
4. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 758-764.
5. Van Camp G, Smith RJ. Hereditary Hearing Loss Homepage, 16.02.2006. (<http://www.via.ac.be/dnalab/hhh/>)
6. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9: 109-119.
7. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-83.
8. Safran M, Strichman AL, Dalah I. Weizmann Institute of Science: Gene cards, 18.10.2005. (<http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin>)
9. Sundstrom RA, Van Laer L, Van Camp G, Smith RJ. Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 1999; 89: 123-129.
10. Van Camp G, Smith RJ. Cx26 Homepage, 16.02.2006. (<http://webhost.au.ac.be/hh>)

11. Gasparani P, Rabionet R, Barbuşani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum NK, et al. High carrier frequency of the 35 delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 19-23.
12. Belgin E. İşitme fizyolojisi. Koç C (editor). *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 63-71.
13. Gulya AJ. Anatomy of the temporal bone. Shambaugh GE Jr, Glasscock ME III (editors). *Surgery of the Ear*. Ed 5, Philadelphia. WB Saunders, 2003: 35-49.
14. Duckart LG. Anatomy of the skull base, temporal bone, external ear and middle ear. Cummings CW, Fredrickson JM, Krause CJ, Richardson MA, Harker LA, Schüller DE (editors). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. Ed 4, St. Louis. Mosby Publication, 1998: 2533-2546.
15. Abbas PJ. Physiology of the auditory system. Cummings CW, Fredrickson JM, Krause CJ, Richardson MA, Harker LA, Schüller DE (editors). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. Ed 4, St. Louis. Mosby Publication, 1993: 2566-2603.
16. Akyıldız AN. İşitme ve denge organlarının morfolojisi. *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi I*. 1. Baskı, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002: 22-73.
17. Akyıldız AN. İşitme ve denge fizyolojisi. *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi I*. 1. Baskı, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 77-128.
18. Austin D. Anatomy of the ear. Ballenger JJ (editor). *Disease of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck*. Ed 14, Philadelphia. Lea-Febiger, 1991: 922-947.
19. Donaldson JA, Duckert LG. Anatomy of the ear. Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WZ (editors). *Otolaryngology*. Ed 3, Philadelphia. Saunders, 1991: 23-58.
20. Moller AR. Auditory neurophysiology. *J Clin Neurophysiol* 1994; 11: 284-305.
21. Gelfand SA. An introduction to psychological and physiological acoustics. *Hearing* New York: Marcel Dekker, 1981: 1-38.

22. Lawrence M. Inner ear physiology. Paparella MM, Shumrick DA (editors). Otolaryngology. Ed 2, Philadelphia. Saunders, 1980: 216-240.
23. Santi PA, Mancini P. Cochlear anatomy and central auditory pathways. Cummings SW, Frederickson JM, Harker LA, Krause CJ, Schuller DE (editors). Otolaryngology Head Neck Surgery. Ed 4, St. Louis. Mosby Publication, 1993: 2885-2900.
24. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi.1. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2004: 63-71.
25. Çelik O. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi 1. Baskı, İstanbul: Turgut Yayıncılık, 2002: 57-70.
26. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. Hum Mol Genet 1998; 7: 1589-1597.
27. Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications. Am J Hum Genet 2000; 66: 1715-1720.
28. Kang BS, Cooper DR, Devedjiev Y, Derewenda U, Derewenda ZS. The structure of the FERM domain of Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2002; 58: 381-391.
29. Admiral RJ, Szymko YM, Griffith AJ, Brunner HG, Huygen PL. Hearing impairment in Stickler syndrome. Adv Otorhinolaryngol 2002; 61: 216-223.
30. Richards AJ, Baguley DM, Yates JR, Lane C, Nicol M, Harper PS, et al. Variation in the vitreous phenotype of Stickler syndrome can be caused by different amino acid substitutions in the X position of the type II collagen Gly-X-Y triple helix. Am J Hum Genet 2000; 67: 1083-1094.

31. Reardon W, Coffey R, Chowdhury T, Grossman A, Jan H, Britton K, et al. Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J Med Genet* 1999; 36: 595-598.
32. Kopp P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2000; 1: 109-121.
33. Ocal B, Imamoglu A, Atalay S, Tutar HE. Prevalance of idiopathic long QT syndrome in children with congenital deafness. *Pediatr Cardiol* 1997; 18: 401-405.
34. Petit C. Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 271-297.
35. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome and Type IV Collagen. *N Eng J Med* 2003; 348: 2543-2556.
36. Kashtan C. Familial hematuric syndromes Alport syndrome, thin glomerular basement membrane disease and Fechtner/Epstein syndromes. *Contrib Nephrol* 2001; 136: 79-99.
37. Harvey SJ, Mount R, Sado Y, Naito I, Ninomiya Y, Harrison R, et al. The inner ear of dogs with X-linked nephritis provides clues to the pathogenesis of hearing loss in X-linked Alport syndrome. *Am J Pathol* 2001; 159: 1097-1104.
38. Plant KE, Green PM, Vetrie D, Flintner FA. Detection of mutations in COL4A5 in patients with Alport syndrome. *Hum Mutat* 1999; 13: 124-132.
39. Ensink RJ, Camp GV, Cremers CW. Mitochondrial inherited hearing loss. *Clin Otolaryngol* 1998; 23: 3-8.
40. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358: 1082-1090.

41. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. Clin Genet 2006; 69: 371-392.
42. Çapaloglu NS. Sendromik olmayan işitme kaybının genetiği. S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2006; 13: 37-46.
43. Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 127: 1037–1042.
44. Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, Gros D, Yamasaki H, Mesnil M. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 1996; 72: 185-186.
45. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. Gene 1997; 199: 165-171.
46. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. Nature 1997; 387: 80-83.
47. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mutat 1998; 11: 387-394.
48. Kalay E, Caylan R, Karagüzel A. Non-Sendromik işitme kayıpları genetiğindeki gelişmeler. Otoloscope 2004; 4: 130-138.
49. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, Akar N. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. Hum Mutat 2003; 21: 552-553.

50. Kalay E, Caylan R, Kremer H, Brouwer APM, Karagüzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res* 2005; 203: 88-93.
51. Morell RJ, Kim HJ, Hood JL, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Eng J Med* 1998; 339: 1500-1505.
52. Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000; 90: 141-145.
53. Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, Matsubara Y. GJB2 (Connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. *Otol Neurotol* 2001; 22: 855-861.
54. Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 1999; 61: 243-258.
55. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, Brown SD. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997; 16: 188-190.
56. Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH Jr, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet* 1998; 20: 366-369.
57. Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R, Ben-David O, Martinez-Matos JA, Bravo O, et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 947-952.

- 58.** Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, Blanton SH, et al. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2000; 1: 63-67.
- 59.** Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003; 64: 65-69.
- 60.** Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, Usami S, Kimberling WJ. Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 1999; 62: 172-176.
- 61.** Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23: 16-18.
- 62.** Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346: 243–249.
- 63.** Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 72–76.
- 64.** Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (editors). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Ed 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 65.** Storm K, Willcox S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (Connexin 26), 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat* 1999; 14: 263–266.

66. Simsek M, Al-Wardy N, Al-Khabory M. Seminested PCR test for simultaneous detection of two common mutations (35delG and 167delT) in the connexin-26 gene. *Mol Diagn* 2001; 6: 63-67.
67. Tang HY, Xia A, Oghalai JS, Pereira FA, Alford RL. High frequency of the IVS2-2A>G DNA sequence variation in SLC26A5, encoding the cochlear motor protein prestin, precludes its involvement in hereditary hearing loss. *BMC Med Genet* 2005; 6: 30-36.
68. Cordeiro-Silva MF, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Dettogni RS, Tovar TT, et al. Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. *Mol Biol Rep* 2010; 8: 1309-1313.
69. Gazzaz B, Weil D, Rais L, Akhyat O, Azeddoug H, Nadifi S. Autosomal recessive and sporadic deafness in Morocco: high frequency of the 35delG GJB2 mutation and absence of the 342-kb GJB6 variant. *Hear Res* 2005; 210: 80-84.
70. Lefebvre PP, Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Rev* 2000; 32: 159-162.
71. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJ. Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mutat* 2000; 16: 502-508.
72. Tekin M, Bogoclu G, Arican ST, Orman MN, Tastan H, Elsayed S, Akar N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the GJB2 gene in Anatolia. *Clin Genet* 2005; 67: 273-277.
73. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing impaired patients. *Clin Genet* 2001; 60: 452-455.
74. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJ, et al. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67: 1331-1335.

75. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001; 38: 515-518.
76. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, Agruma L, Govea N, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1605-1609.
77. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 792-799.
78. Tekin M, Cin Ş. İşitme kaybının genetik özellikleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002; 55: 211-216.
79. Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M, et al. Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75: 211-214.
80. Frei K, Ramsebner R, Lucas T, Baumgartner WD, Schoefer C, Wachtler JF, Kirchhofer K. Screening for monogenetic del(GJB6-D13S1830) and digenic del (GJB6-D13S1830)/GJB2 patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. *Hear Res* 2004; 196: 115-118.
81. Wilcox SA, Saunders K, Osborn, AM, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 2000; 106: 399-405.

6. ÖZGEÇMİŞ

Siverek'te 1981 yılında doğdum. İlköğrenimimi Adana Merkez Necmiye Coşkun Tuncel İ.Ö.O'da, orta öğrenimimi Adana Merkez Cumhuriyet Ortaokulu'nda tamamladım. Liseye Kahramanmaraş Süleyman Demirel Fen Lisesi'nde başlayıp, Adana Merkez Atatürk Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başlayıp 2004 yılında mezun oldum. Ardından yaklaşık 1,5 yıl süresince Adıyaman'da pratisyen hekim olarak görev yaptım. Daha sonra 2006 Nisan döneminde girdiğim Tıpta Uzmanlık Sınavında (TUS) Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nı kazandım ve ihtisasa başladım. Halen bu klinikte araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.