

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE
BAŞ BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**SENSÖRİNÖRAL İŞİTME KAYIPLARI İLE CONNEXİN 26 35 deİG
MUTASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. HASAN ZAFER HIRÇIN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ASIM ASLAN

Manisa, 2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Prof. Dr. Halis ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. Onur ÇELİK'e, Prof. Dr. Ali Vefa YÜCETÜRK'e ve Prof. Dr. Cemil MUTLU'ya; ufkumun genişlemesinde bana ön ayak olan, insani vasıflarıyla her zaman örnek alınması gereken, tez danışmanım Prof. Dr. Asım ASLAN'a ve tezimle ilgili genetik çalışmaları yürüten Doç. Dr. Ahmet VAR'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca benim ve tüm asistan arkadaşlarımdan kahrını çeken, hem hocalık, hem de ağabeylik yapan, zor durumda olduğumda hep arkamda olduklarını hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Görkem ESKİİZMİR'e teşekkür ederim.

Ailemden daha çok zaman geçirdiğim mesai arkadaşlarımdan, gerçek kahramanlar, Dr. Haşim AYDIN'a, Dr. Murat SONGU'ya, Dr. Belgin KÜÇÜKGÜNAY'a, Dr. Tuğba YENİEL'e, Dr. Özlem ÖZER'e, Dr. Arzubetül DURAN'a, Dr. Uzman UZ'a, Dr. Ali DEĞİRMENCİ'ye, Dr. Esra TAŞKIRAN'a, Dr. Gökçe TANYERİ'ye, Dr. Ayşe KARAOĞULLARINDAN'a, Dr. Erdoğan ÖZGÜR'e, Dr. Serkan BARIŞKAN'a ve Dr. EMRAH EKİM'e teşekkür ederim.

Doktor olmama öncülük eden, asistanlığımın süresince eğitimim için hem maddi hem manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Uzm. Dr. Medet HIRÇIN'a, tıp fakültesini sağ salim bitirmemi sağlayan, her zaman yanımda olan sevgili annem Vatangül HIRÇIN'a, aynı şehirde yaşamasak da hep aynı evdeymiş gibi hissettiğim ablalarımdan Pelin ve Tülin HIRÇIN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin başında hayatımı birleştirdiğim, beni boşamayıp bu dönemde bana katlanan, bana oğlum Harun Ege'yi armağan eden biricik eşim Ela'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖNSÖZ

I.	GİRİŞ	3
II.	GENEL BİLGİLER	5
1.	İşitme Sistemi	5
2.	İşitme Fizyolojisi	6
3.	İşitme Kaybı ve Sınıflandırması	8
A.	Yaşlılık tipi işitme kaybı (presbiakuzi)	9
B.	Presbiakuzi sınıflandırması	10
C.	İşitme Kaybının Genetik Özellikleri	11
4.	Connexin Proteinleri	14
5.	Connexin 26 proteini ve işitme kayıplarındaki rolü	15
6.	Connexin 26 Geni	16
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	18
1.	DNA izolasyonu	20
A.	İzolasyon prosedürü	20
2.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	21
A.	PCR protokolü	21
IV.	BULGULAR	23
V.	TARTIŞMA	24
VI.	SONUÇ ve ÖNERİ	32
VII.	ÖZET	33
VIII.	İNGİLİZCE ÖZET	34
IX.	KAYNAKLAR	35

I. GİRİŞ

İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın duysal bozukluklarından biridir. İşitme kaybı, en sık görülen duyu bozukluklarından biri olup, insidansı yaklaşık 1/1000'dir. Prevelansı yaşa bağlı olarak artmaktadır.¹ Sensorinöral işitme kayıpları genetik ya da çevresel nedenlere bağlı olarak oluşmaktadır.

Genetik nedenlere bağlı olan sensorinöral işitme kayıpları sendromik ve non sendromik olmak üzere ikiye ayrılır.²

İşitme kaybına neden olan birçok gen tanımlanmıştır. Bazı genler ve gen gruplarında meydana gelen mutasyonlar diğerlerine göre çok daha fazla görülmektedir. Non-sendromik sensorinöral işitme kaybına neden olan genler içinde en önemli yeri, otozomal resesif kalıtılan (DFNB) DFNB 1 lokusunda sorumlu gen olan Connexin 26 (GJB2 / Cx26) tutmaktadır. Bu gen, gap junction kanallarının oluşumundan sorumlu olan connexin 26 proteinini kodlar. Gap junction proteini a2 olarak da adlandırılan Cx26 geni non-sendromik sensorinöral işitme kaybına neden olarak tanımlanan ilk genidir.³

Cx26 genindeki 35 delG (30 delG) mutasyonu İtalya, İspanya, Portekiz, Fransa, İngiltere, İsrail, Lübnan, Tunus, Arnavutluk, Yeni Zelanda, Beyaz Amerikan ailelerinde en sık rastlanan mutasyon tipidir. Bu mutasyon arka arkaya gelen 6 guanin bazından birinin delesyonu sonucunda oluşur.⁴ Bu mutasyon sonucunda, 13. pozisyonda "dur" kodonu oluşumu ile 12 aminoasitlik erken sonlanmış bir protein meydana gelir.⁵ 35delG mutasyonun yüksek oranda görülmesi hem etkilenmiş bireylere hem de genetik danışma açısından ebeveynlere (taşıyıcılık açısından) analiz yapılması açısından önemlidir.

Yaşlılık tipi işitme kaybı (YTİK) diğer bir adıyla presbiakuzi ileri yaşlarda en sık izlenen duysal bozukluktur. Klinik olarak belirgin işitme kaybı (25 dB ve üstü) prevelansı 61- 70 yaş arasında %37 iken 71- 80 yaş arasında %60'dır. Erkekler kadınlara göre daha çok etkilenmektedirler. Gelişmiş ülkelerde yaşam süresinin uzaması YTİK'nın yakın gelecekte daha sık izlenmesine neden olacaktır.

YTİK çevresel ve genetik faktörlerin neden olduğu kompleks bir bozukluktur. Bilinen en iyi çevresel faktör yüksek sese maruziyettir. Diğer bilinen çevresel etkenler ise ototoksik ilaç kullanımı, kimyasal maddelere maruziyet,

diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalık ve böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalıklardır.⁵

Gerek erkeklerde gerekse kadınlarda gelişen YTIK'nın bireysel olarak farklı zamanlarda ortaya çıkıyor olması akla YTKI'nın genetik olarak belirlenip belirlenmediği sorusunu getirmektedir. Ancak YTIK ile ilgili genetik bilgi yeterli değildir. YTIK'nın etiyolojisinde bir çok genin rol oynayabileceği düşünölmektedir. Spesifik gen mutasyonları ile ilişkili klinik profile uygun ve daha gelişmiş tıbbi tedavi olanaklarının oluşmasına katkı sağlanabilecektir. Bugüne kadar literatürde YTIK'ında gen ve moleküler bazlı taramaların sınırlı sayıda olduğu izlenmiştir.

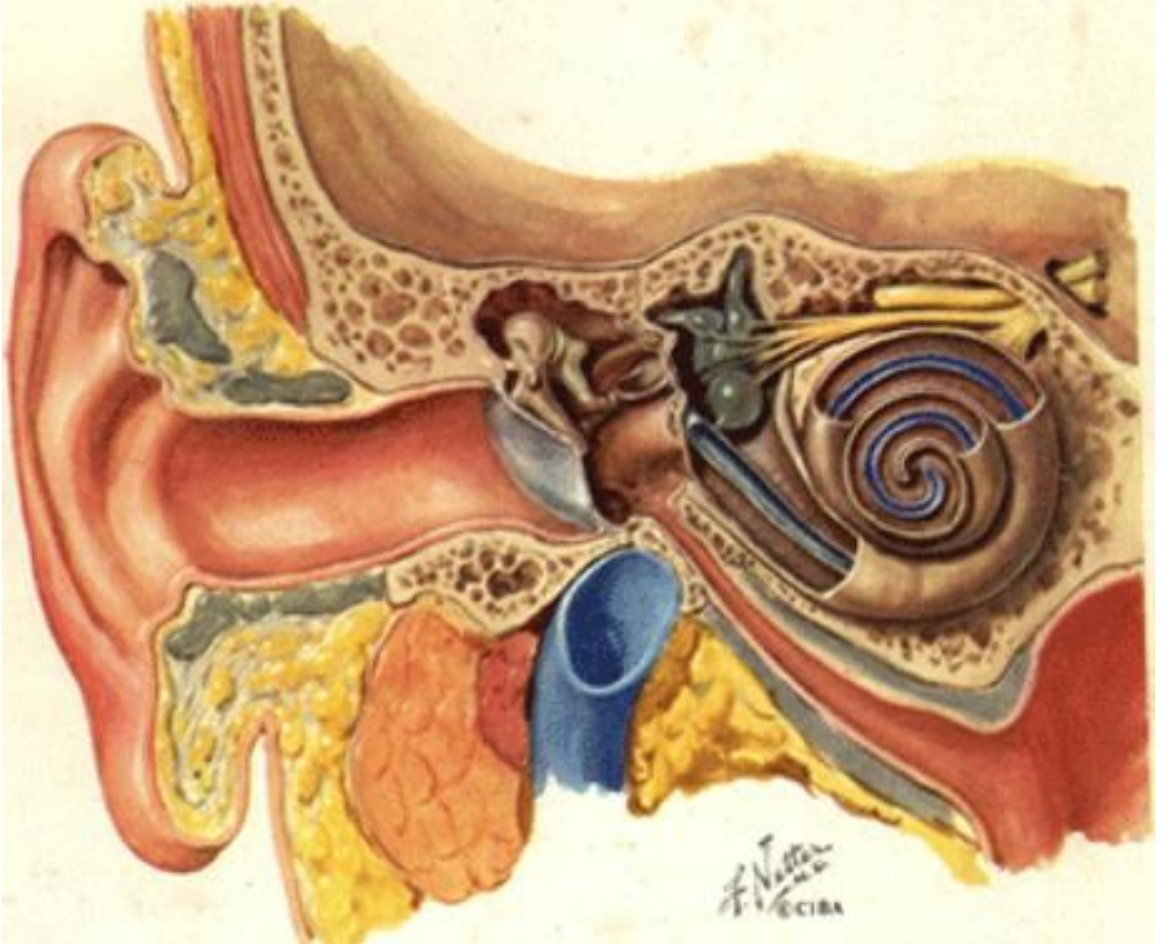
Bu çalışmada sensorinöral işitme kaybı saptanan hastalarla birlikte YTIK olan hastalarda Connexin 26 geni 35 delG mutasyonu varlığının araştırılması planlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin özellikle YTIK'nın genetik etyolojisi açısından literatüre katkı sağlayabileceği düşünölmektedir.

II. GENEL BİLGİLER

1. İŞİTME SİSTEMİ

Sesleri algılamamızı sağlayan ve vücudumuzun dengesini koruyan kulak temel olarak 3 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1). Bunlar;

- Dış kulak
- Orta kulak
- İç kulaktır.



Şekil 1. İşitme sistemi⁶

Dış kulak, aurikula ve dış kulak yolu olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Aurikula tarafından toplanan ses dalgaları dış kulak kanalından geçerek timpanik membrana iletilir.

Orta kulak, timpanik membran ve birbiriyle bağlantıda olan 3 tane kemikçiği (malleus, inkus, stapes) içeren havalı bir boşluktur. Bu üç kemikçik timpanik membran ile oval pencere arasında bir zincir oluşturur. Timpanik membran üzerinde oluşan titreşim bu kemikçikler aracılığıyla oval pencereye yani iç kulağa iletilir.

İç kulak, temporal kemiğin içinde yer almaktadır. Temel olarak, kemik labirent ve zar labirentten oluşmaktadır.

İşitme sistemi; iletim mekanizması, sensörinöral mekanizma ve santral mekanizma olarak üç ana bölümde incelenir.

İletim mekanizması, kulak kepçesinden ya da dış kulaktan başlar. Bu mekanizmanın en önemli fonksiyonu dışarıdan gelen titreşimli ses enerjisini, sensörinöral mekanizma tarafından kullanılacak olan kulağın iç kısmına iletmektir.

Sensörinöral mekanizma, kokleadan başlar. Koklea işitmenin sensör organı olup iletim mekanizması tarafından taşınan ses enerjisini, elektrik enerjisine çevirir. İşitsel uyarıyı temsil eden bu uyarı, 8. kranial sinir tarafından taşınır ve daha sonra santral işitme mekanizması tarafından yorumlanır. Bu nedenle koklea ve 8. sinir işitme fonksiyonunun sensörinöral kısmından sorumludur.

Santral mekanizma, işitsel bilginin tanımlanmasından, yorumlanmasından ve entegrasyonundan sorumludur. Beyin sapı ve kortekste bulunan alanlar işitsel sistemi oluştururlar.⁷

2. İŞİTMENİN FİZYOLOJİSİ

İşitme, başın çevresinde oluşan ses dalgalarının dış kulak, orta kulak ve iç kulak aracılığı ile beyin sapından geçip kortekste işitme merkezi tarafından algılanmasıdır. Aurikula ses dalgalarının toplanmasında, dış kulak yolu da bu dalgaların timpanik membrana iletilmesinde rol oynarlar. Dış kulak yolundaki hava boşluğunda bulunan ses dalgaları, orta kulakta yer alan timpanik

membranı, malleus, inkus ve stapes kemikçiklerini titreştirerek, oval pencere aracılığı ile iç kulakta, kokleadaki sıvı ortama ulaşır.

Malleus ve inkus arasındaki kaldıraç şeklindeki eklem özelliği ile malleus kolundaki işitsel enerjinin inkus koluna 1.3 kat daha fazla aktarılmasına olanak tanır. Buna ek olarak kulak zarının yüzey alanı yaklaşık 55 mm² iken stapes tabanının alanı ortalama 3.2 mm²'dir. Bu 17 katlık fark ile kaldıraç sisteminin 1.3 katlık oranının çarpımı koklea sıvısı üzerine uygulanan basıncın kulak zarı üzerine ses dalgasının uyguladığı basınçtan 22 kat daha büyük olmasını sağlamaktadır.

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.

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 (yürüyen) bir dalga başlatır.

İç kulaktaki basılar ve tektoryal membranların hareketleri sillerin yönünü değiştirerek uç bağlantılarının gerilerek iyonik kanalların açılmasına neden olur. Bunun sonucunda, endolenfteki potasyum, hızla silyalı hücrelere boşaltılarak bu hücrelerin depolarize olmasına neden olur. İç silyalı hücrelerde bulunan voltaj sensitif kalsiyum kanalları aktive eder ve kalsiyum işitme sinirleri boyunca beyne iletilen nörotransmitterlerin salınımına neden olur. Sesler beyinde zıt temporal kemiğin serebral korteksinde işlenmektedir. Bu yollardan herhangi birinde doğuştan ya da hayatın ileri evrelerinde yaralanma veya ilaç kullanımına bağlı olarak meydana gelen bir hasar işitme kaybına yol açmaktadır. Olguların büyük çoğunluğunda görülen hasar dış silyalı hücrelerde meydana gelmektedir.

3. İŞİTME KAYBI VE SINIFLANDIRMASI

İşitme, sesin şiddetine verilen değerle ölçülür. Sesin şiddeti bulunduğu ortamda oluşturduğu basınç değişikliğine göre belirlenir. Sesin şiddetini ölçmek için kullanılan birim desibel'dir (dB). Desibel logaritmik bir birimdir ve lineer olarak artmaz. Yani 1 dB ile 3 dB arasındaki fark 5 dB ile 7dB arasındaki fark ile aynı değildir. Normal işiten insanların algılayabildiği en küçük ses 0 dB'dir (0 dB SPL(sound pressure level)= 20µPa(mikroPascal))⁸ ve odyometri testinde bu değer referans olarak kabul edilir. Odyometri testinde her frekansta ölçüme hastayı rahatsız etmeyecek mümkün olan en yüksek seviyeden başlanır. Uyarı şiddeti, 10 dB'lik azaltmalarla hastanın duymadığı seviyeye kadar indirilir. Daha sonra 5 dB'lik arttırmalar yapılır. Hastanın tekrar duymaya başladığı seviyedeki ses şiddeti *işitme eşiği* olarak kaydedilir.

İşitme bozuklukları;⁹

Etiyolojilerine göre;

- genetik
- non-genetik

Başlama yaşına göre;

- prelingual(konjenital),
- perlingual(çocukluk dönemi)
- postlingual(erişkin dönemi)

Fenotipik bulgularına göre;

- sendromik
- non-sendromik

İşitme yolu üzerindeki yerine göre;

- iletim tipi,
- sensörinöral tip
- karışık tip

İşitme kaybı derecesine göre;

- Normal İşitme (0-20dB)
- Hafif işitme kaybı (21-40dB),
- Orta derecede işitme kaybı (41-60dB)
- Orta-şiddetli işitme kaybı (61-80dB),
- Şiddetli işitme kaybı (81-100dB),
- Derin işitme kaybı > 100dB

Frekansına göre;

- Düşük < 500Hz,
- Orta 501-2000Hz,
- Yüksek > 2000Hz olarak sınıflandırılmaktadır

Progresyonuna göre ise;

- ilerleyici,
- ilerleyici olmayan,
- düzensiz değişim gösteren tiplere ayrılır.

A. Yaşlılık tipi işitme kaybı (presbiakuzi)

Zwaardemaker, 1899'da YTIK'nı ilk tanımlayan kişidir. Zwaardemaker gözlemlerini presbiakuzi (presbi, Yunanca yaşlı; akuzi ise işitme anlamındadır) olarak adlandırmıştır.¹⁰

YTIK insanın yaşlanmasıyla birlikte ortaya çıkan iki taraflı sensörinöral işitme kaybıdır. İşitme kaybı her frekansı tutmasına karşın genellikle 2000 Hz üzerindeki frekanslarda ortaya çıkar. Başlangıçta konuşma etkilenmez. Ancak üst konuşma frekansları etkilenmeye başladıkça sesleri ayırt etmenin zorlaştığı görülür. Hasta konuşmayı ayırt etmekte zorlandığını söyler. Daha sonra tüm konuşma frekansları bozular. Hasta çevresiyle diyalog kurmakta zorlanır ve giderek toplumdan soyutlanır.¹¹

Yaşlanan kokleada kan akımının azaldığı gösterilmiştir.¹² YTIK'ında ortaya çıkan işitme kaybının ne kadarının genetik olarak önceden belirlendiği, ne kadarının yaşam süresince çevresel faktörlerin koklea ve nöral yollara etkisiyle ortaya çıktığı bilinmemektedir. YTIK yaşam boyu oluşan akustik

travmaların birikimi olarak ortaya çıkabilir. Bunun dışında fiziksel aktiviteler, diyet ve eş zamanlı hastalıklar etkili olabilir.

Periferik işitme sisteminde ve santral sinir sisteminde yaşlanmayla ortaya çıkan değişikliklere ek olarak, vasküler sistemdeki değişiklikler de işitme fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Histolojik olarak labirent, koklea ve vestibüler arterin tunika adventisyasında dejenerasyon ve kalınlaşmaya yol açtığı ve bu değişikliklerin kanlanmayı bozarak nöral dejenerasyona neden olduğu saptanmıştır. YTIK'nın şiddetli formlarında spiral ligaman atrofisi, perivasküler boşluklar ve intravasküler yolların tanınmasında zorluklarla karşılaşmıştır. Yaşlanmayla birlikte kemikçik zincirde katılık oluşup hava ve kemik iletimi etkilenirse de, YTIK'nın büyük oranda iç kulak değişikliklerine bağlı olduğu kabul edilir. Yüksek frekanslı sensörinöral işitme kaybı ile bazal kıvrımdaki Corti organının atrofisi arasında bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca, YTIK olgularında spiral ganglion değişiklikleri ve jeneralize arteriyosklerotik değişiklikler ve koklear duktusta atrofi bulunmuştur. Yine yapılan çalışmalarda, Corti organındaki baziller tüylü hücrelerdeki azalma ile yüksek frekanslı işitme kaybı arasında uygunluk gösterilmiştir. İlk afferent koklear nöronların gittikçe ilerleyen kayıplarında saf ses işitme eşiklerinin normal olmasına karşın konuşmayı ayırt etme skorlarının düşük olduğu görülmüştür.¹³

B. Presbiakuzi sınıflandırması

Odyometrik bulgular ile koklear histopatoloji arasındaki korelasyonu değerlendirerek YTIK'nı sınıflandırmak yararlı olur.¹⁴

1) *Sensitif presbiakuzi*; genellikle yaşlılarda ortaya çıkan iki taraflı, simetrik ve yüksek frekansları tutan işitme kaybıdır. Eğer travma, toksin gibi başka herhangi bir neden olmaksızın genç yaşlarda ortaya çıkarsa, bu tip işitme kaybına *idiyopatik işitme kaybı* denir. Başlangıçta 2000 Hz frekansı daha çok etkilediği için hastada konuşma bozukluğu olmaz. Konuşmayı ayırt etme skoru iyidir; ancak ilerledikçe konuşma bozular. Rekrutman pozitifdir. Hastalar tiz sesli uğultudan yakınır.

2) *Nöral presbiakuzi*; kısmen hızlı ilerleyen ve konuşmayı anlama zorluğu olan kişilerdeki işitme kaybı tipidir. Odyometrisinde, tüm frekansları tutan orta

derecede işitme kaybı ve konuşmayı ayırt etme skorunda düşüş vardır. Buna *foneik regresyon* denir. Histolojik olarak Corti organının kısmi yetersizliğiyle birlikte spiral ganglion hücrelerinin kaybı söz konusudur. Bu değişiklikler koklea bazal kıvrımında daha fazladır. Bu hastalarda genel olarak yaygın nöral bozuklukla beraber koordinasyon bozukluğu, hafıza sorunları ve motor sistem bozukluğu gibi diğer nörolojik kayıplar da bulunur.

3) *Striyal (metabolik) presbiakuzi*; tüm frekanslarda işitme kaybının olduğu yatay bir odyogramla kendini gösterir. Hastalık yavaş ilerler ve genelde ailevidir. Konuşmayı ayırt etme skoru çok iyidir. İşitme cihazlarından iyi yararlanırlar. Histolojik olarak stria vasküleriste bir miktar atrofi gösterilmiştir.

4) *Koklear presbiakuzi*; baziler membranın kalınlaşması ve katılığı ile karakterizedir. İşitme kaybı düz bir şekilde yükselen eğrisi iyi bir konuşmayı ayırt etme skoru ile birlikte dir. Baziler membranda hyalinizasyon ve kalsifikasyon vardır. Ayrıca striyal elemanlarda kistik dejenerasyon ve spiral ligamanda atrofi gösterilmiştir.

C. İşitme Kaybının Genetik Özellikleri

Sensorinöral işitme kaybı klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık olup bu hastalığa neden olan etkenler arasında çevresel faktörler (ses veya ototoksik ilaçlara maruz kalma), genetik faktörler (çekirdek veya mitokondriyal genlerdeki mutasyonlar) ve gen-çevre etkileşimi yer almaktadır.¹⁵

Çoğu işitme kaybı; iletim mekanizmasında veya sensörinöral mekanizmada meydana gelen hatalar sonucunda, dış ve/veya orta kulağın veya kokleanın, ya da üçünün birden etkilenmesiyle meydana gelir.

Doğumdan ileri yaşlara kadar, işitme kaybının prevalansı yaşa bağlı olarak artmaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde işitme kayıplarının yaklaşık olarak %60'ı genetik bir nedene, geriye kalan %40'lık bir kısmı ise çevresel bir etmene (erken doğum, farmakolojik toksisite, doğum öncesi geçirilmiş kızamıkçık, sitomegalovirüs enfeksiyonu vb.) bağlı olarak meydana gelmektedir.¹⁶⁻¹⁷

İşitme kaybına, başka hiçbir patolojik organ veya laboratuvar bulgusunun eşlik etmediği durumlarda non-sendromik işitme kaybı söz konusudur. Genetik işitme kayıplarının yaklaşık %70'i bu gruba girmektedir.

Prelingual non-sendromik işitme kayıpları; özellikle gelişmekte olan ülkelerde sık karşılaşılan kalıtsal sensör hatalardır. %70- 80'i otozomal resesif

kalıtım (DFNB) gösterirken, otozomal dominant formları (DFNA) %23- 30, X'e bağlı kalıtım gösteren formları %2-3 oranında görülür.¹⁸

DFNB1 lokusunda sorumlu gen olan Connexin 26(Cx26/GJB2) genetik işitme kayıplarına en sık neden olan gendir. Bu gen Connexin 26 proteinini kodlamaktadır.³

En az 400 sendromda, işitme kaybı sendromun bir parçası olarak tariflenmiştir. Sendromik işitme kayıplarının en sık görülen dördü brankio-oto-renal sendrom, Pendred sendromu, Usher sendromu ve Waardenburg sendromudur.¹⁹

Non-sendromik işitme kaybı dominant, resesif, X'e bağlı ya da mitokondrial olarak kategorize edilebilir. Genel olarak, otozomal dominant olanların çoğu postlingual, otozomal resesiflerin çoğu prelingualdır.¹⁹

Bu tip işitme kaybına başka hiç bir klinik ya da laboratuvar bulgusu eşlik etmemektedir.

Bugüne kadar non-sendromik işitme kayıpları için 120'nin üzerinde lokus tespit edilmiş olup 40'dan fazla gen tespit edilmiştir.²⁰ (Tablo 1)

Tablo1. Nonsendromik işitme kaybı otozomal resesif genler ve lokuslar²⁰

Lokus	Gen	Kaynak
DFNB1A	GJB2	Kelsell et al., 1997
DFNB1B	GJB6	Del Castillo et al., 2002
DFNB2	MYO7A	Liu et al., 1997, Weil et al., 1997
DFNB3	MYO15A	Wang et al., 1998
DFNB4	SLC26A4	Lie et al., 1998
DFNB6	TMIE	Naz et al., 2002
DFNB7/11	TMC1	Kurima et al., 2002
DFNB8/DFNB10	TMPRSS3	Scott et al., 2001
DFNB9	OTOF	Yasunaga et al., 1999
DFNB12	CDH23	Bork et al., 2001
DFNB16	STRC	Verpy et al., 2001
DFNB18	USH1C	Ouyang et al., 2002; Ahmed et al., 2002
DFNB21	TECTA	Mustapha et al., 1999
DFNB22	OTOA	Zwaenepoel et al., 2002
DFNB23	PCDH15	Ahmed et al., 2003
DFNB24	RDX	Khan et al., 2007
DFNB25	GRXCR1	Schraders et al., 2010
DFNB28	TRIOBP	Shahin et al., 2006, Riazuddin et al., 2006
DFNB29	CLDN14	Wilcox et al., 2001
DFNB30	MYO3A	Walsh et al., 2001
DFNB31	WHRN	Mburu et al., 2003
DFNB35	ESRRB	Collin et al., 2008
DFNB36	ESPN	Naz et al., 2004
DFNB37	MYO6	Ahmed et al., 2003
DFNB39	HGF	Schultz et al., 2009
DFNB49	MARVELD2	Riazuddin et al., 2006
DFNB53	COL11A2	Chen et al., 2005
DFNB59	PJVK	Delmaghani et al., 2006
DFNB61	SLC26A5	Liu et al., 2003
DFNB63	LRTOMT/COMT2	Ahmed et al., 2008; Du et al., 2008
DFNB66/67	LHFPL5	Tlili et al., 2005; Shabbir et al., 2006; Kalay et al., 2006
DFNB77	LOXHD1	Grillet et al., 2009
DFNB79	TPRN	Rehman et al., 2010; Li et al., 2010
DFNB82	GPSM2	Walsh et al., 2010
DFNB84	PTPRQ	Schraders et al., 2010
	GJB3	Liu et al., 2000

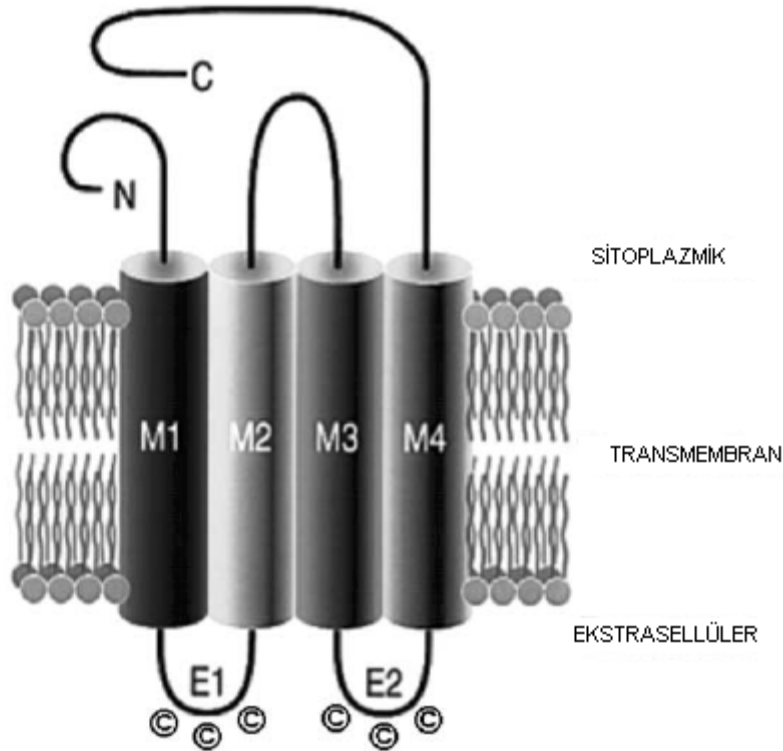
Bu genler hücre iskeleti, ekstrasellüler matriks proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve iyon kanalları gibi farklı işlevlerdeki proteinleri kodlamaktadır .

Non-sendromik işitme kayıplarının yaklaşık %80'i otozomal resesif (DFNB), %18'i otozomal dominant (DFNA) ve %2'si X'e bağlı (DFN) kalıtılmaktadır.

4. CONNEXİN PROTEİNLERİ

Gap junction kanallarının yapısını oluşturan connexin proteinlerinden günümüze kadar farklı tipleri tanımlanmıştır. Farklı tiplerdeki connexin proteinleri farklı hücre tipi ve organlardaki gap junction kanallarının yapısına katılır. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilir ve α , β , γ olmak üzere üç ana gruba ayrılır. (Tablo 2)

Herbir connexin proteini; dört transmembran domain (M1,M2, M3, M4), iki ekstrasellüler (E1,E2) ve bir sitoplazmik ilmek yapılarının yanında amino (NT domain) ve karboksil (CT domain) uçlar içerir. Ekstrasellüler ilmek yapısı bu proteinler arasında yapısal oranda büyük oranda korunmuş olup, her ilmek yapısında bulunan üç sistein aminoasitinin yeri 12 connexin proteininde aynı pozisyondadır. Bu aminoasitler her bir connexonun diğerine bağlanıp gap junction kanal yapısı oluşturması için gerekli olan üç boyutlu yapıyı sağlamaya yardımcı olurlar. (Şekil 2)



Şekil 2 . Connexinin topolojik modeli (Söhl 2004)

Tablo 2. Connexin proteinlerinin sınıflandırılması²¹

1. GRUP (β CONNEXİNLER)	
Cx26	13q11-12
Cx30	-
Cx30.3	-
Cx31	1p35.1
Cx31.1	-
Cx32	Xq13.1
2. GRUP (α CONNEXİNLER)	
Cx33	-
Cx37	1p35.1
Cx40	1q21.1
Cx43	6q21-23.2
Cx45	-
Cx46	13q11-12
Cx50	1q21.1
Cx57	-
3. GRUP (γ CONNEXİNLER)	
Cx36	15q14

5. CONNEXİN 26 PROTEİNİ VE İŞİTME KAYBINDAKİ ROLÜ

Connexin 26 proteini Connexin 26 geni tarafından kodlanmaktadır. Cx 26 küçük moleküllerin ve iyonların bir hücreden diğerine geçmesini sağlayarak komşu hücrelerin iletişimde görev alır. İç kulakta yer alan kokleadaki potasyum homeostazında görev alan başlıca proteinlerden biri olması nedeniyle kokleanın sensörinöral fonksiyonları için gerekli bir proteindir.

Connexin 26 proteini kokleada; stria vaskularisdeki bazal hücreler arasında, spiral ligament de tip I ve tip II fibrositlerin bulunduğu bölgelerde,

suprastrial alanda ve Corti organındaki destekleyici hücreler arasında bol miktarda bulunmaktadır.²²

Kokleanın normal fonksiyonunu sürdürebilmesi için Cx26 proteinine ihtiyacı vardır. Cx26 genindeki görülen mutasyonlar, bunun sonucunda Cx26 proteininde oluşan bozukluklar işitme kayıplarına neden olmaktadır.

Kokleada bulunan endolenfte tüy hücrelerinin apikal yüzeyinde yüksek K konsantrasyonu mevcuttur. Tüy hücreleri iletim mekanizması tarafından iç kulağa ulaşan ses ile uyarıldıkları zaman, reseptör hücrelerde elektriksel bir değişim olur. K döngüsü gerçekleşir. Voltaj değişikliğine duyarlı Ca yollarının açılmasıyla, hücreye Ca iyonları girer. Hücre membranının iç kısmında Ca miktarının artmasıyla, Ca'a duyarlı olan K geçiş yolları açılır. K, tüy hücrelerinin artı yöne hareketiyle içeriye alınır, buradan destek hücrelerine geçer ve stria vascularisdeki bazal hücreler yardımıyla endolenfe geri dönmesi sonucunda hücre istirahat potansiyeline dönüşür. Lateral duvardaki stria vascularis K'un pompalanmasında çok kritik rol oynar. Destek hücreleri ve fibrositler arasındaki gap junction kanalları da K döngüsünde rotayı tespit eder.

Cx26 proteinini kodlayan gende herhangi bir mutasyon mevcut ise gap junction kanal yapısı etkilenir, kokleadaki K iyon akışında bozukluk oluşur ve K döngüsü durur. Endolenfe, Corti organında ve tüy hücrelerinde yüksek derecede K birikerek lokal toksik etki yapar ve kokleadaki potansiyelin düşmesi nedeniyle bireylerde işitme kaybı meydana gelir.

6. CONNEXİN 26 (GJB2) GENİ

GJB2 (gap junction -2) geni connexin 26 olarak adlandırılan 26 kD'lik bir connexin protein kodlamaktadır. GJB2 'nin stria vasculariste, bazal membranda, limbus ve spiral çıkıntıda eksprese olduğu gösterilmiştir.²³

GJB2 geni kromozom 13q11-q12 bölgesinde haritalanmıştır.²⁴

GJB2 geni 2 ekzondan oluşmakta ve birinci ekzon translasyona uğramamaktadır.²⁵

Connexin 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.³

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 görölen patolojik GJB2 mutasyonlarının yaklaşık %70'ini 35delG oluşturmaktadır.²⁶⁻²⁷

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında, yaşlılık tipi işitme kaybı tespit ettiğimiz 34 hasta, bilateral sensörinöral işitme kaybı tesbit edilmiş 45 yaş altında olan 35 hasta, tek taraflı sensörinöral işitme kaybı tesbit edilmiş 17 hasta ve 34 sağlıklı olgu olmak üzere, toplam 120 olgu, Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir (Tablo 3).

Tüm hastaların ve sağlıklı bireylerin; klinik, odyolojik ve impedansmetrik incelemeleri Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Tüm hastaların ve sağlıklı bireylerin mutasyon analizleri Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.03.2009 tarihindeki toplantısında araştırmanın Kulak Burun Boğaz Anabilim dalınca yürütülmesine uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Connexin 26 35delG mutasyonu tespiti için kullanılacak olan kimyasal malzemeler, primer dizilimler ve kitlelere ait masrafların bilimsel araştırma projeleri bütçesinden karşılanmıştır.

Çalışmamızda presbikauzi tanısı alma kriterleri;

1. İntakt timpanik membran
2. 45 yaşın üstünde olma
3. 30 dB'in üzerinde işitme kaybı olması(0,5 kHz, 1kHz, 2kHz ortalaması)

Önceden herhangi bir kulak cerrahisi uygulanmış olan hastalar, herhangi bir kronik hastalığı olan hastalar (Diabetes mellitus, hipertansiyon, nörolojik hastalıklar, kronik obstruktif akciğer hastalığı, kronik alkol kullanımı) çalışma dışı bırakılmıştır.

Tablo 3. Çalışmaya alınan hastalar ve kontrol grubu sayıları

Grup	N
YTİK(presbiakuzi)	34
<45 yaş bilateral SNİK	35
Tek taraflı SNİK	17
Kontrol	34
Toplam	120

Tek kulakta ya da her iki kulakta işitme kaybı, konuşmada bozulma ya da konuşmada gecikme şikayetiyle polikliniğimize başvuran hastaların öncelikle otoskopik muayenesi yapılarak iletim tipi işitme kaybı yapabilecek muhtemel sebepler dışlanmıştır. Otoskopik muayenesi normal olarak değerlendirilen hastalardan işitme düzeylerinin saptanması için odyometri ve timpanometri testleri istenmiştir. Odyometriye uyum sağlayamayacak yaş grubunda olan 7 hastanın ise işitmenin durumu otoakustik emisyon (OAE) ya da beyin sapı uyarılmış cevap odyometrisi (BERA) testleri ile değerlendirilmiştir.

Tek taraflı sensörinöral işitme kaybı tespit edilmiş olan 17 hastanın 2'sinde diğer kulakta total işitme kaybı tespit edilmiştir. Total işitme kaybına, 1 hastada akustik nörinom, 1 hastada ise geçirilmiş ani işitme kaybının neden olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızın temelini oluşturan YTİK (presbiakuzi) gözlenen hastaları YTİK'nın tipine göre sınıflandırdığımızda 34 hastanın 28'inde sensitif tip presbiakuzi, 4'ünde nöral tip presbiakuzi, 2'sinde striyal tipte presbiakuzi tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Presbiakuzili hastalıkların presbiakuzi tipine göre sınıflandırılması.

Presbiakuzi Tipi	Hasta sayısı
Sensitif	28
Nöral	4
Striyal	2
Kohlear	0

1. DNA İZOLASYONU

Hastalardan alınan tam kan örneklerinden HighPure PCR Template Preparation Kit (Cat. No: 11796828001, Roche Diagnostic, Germany) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Kitin kullanım kılavuzunda belirtilen basamaklara uyularak işlem gerçekleştirildi.

A. İzolasyon Prosedürü

Çalışma boyunca kullanılan izolasyon prosedürü aşağıdaki gibidir;

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alınır.
2. Üzerlerine 200 µl bağlayıcı tampon ve 40 µl Proteinaz K⁺ eklenerek iyice karıştırılır.
3. 10 dk 72 °C'de inkübasyona bırakılır.
4. Daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklenir ve karıştırılır. (DNA'ların çökmesini sağlar).
5. Hasta sayısı kadar toplam tüp çıkartılır ve her birine filtre edici tüp yerleştirilir.
6. Hazırlanan bu karışım toplama tüplere aktarılır. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
7. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör ayırıcı tampon eklenir. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
9. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
10. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu eklenir. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
11. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
12. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenir. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
13. Toplamalardaki sıvı dökülür ve tekrar 13000x g de 10 saniye döndürülür.
14. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler 1,5ml lik ependorflara alınır.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 °C'de bekleyen elusyon tamponundan 200 µl eklenir.
16. 8000x g de 1 dk santrifüj yapılır.
17. Filtreli tüpler atılır ve DNA 'lar ependorfdadır.

2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin, o bölgeye spesifik oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır.

Connexin 26 heterozigot kontrol DNA, Coriell DNA bankasından temin edildi (NA06985). Bu örneklerimiz ve kontrollerimiz ile heterozigot kontrolümüzün verdiği mutant ve normal melting piklerini karşılaştırma fırsatını sağladı.

Realtime PCR primerleri; PCR-primer forward:
AGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCT ve PCR-primer reversed:
CTTTCCAATGCTGGTGGAGTG ve Florasan Labeled probe:
TTCACACCCCCAG, Anchor Probe:
TCGTCTGCAGCGTGCCCCAAATCCATCTTCT olarak TIB MOLBIOL GmbH (Eresburgstraße 22-23 D-12103 Berlin) firmasına yaptırıldı.

PCR master miksi, primerlerin her biri kapiler başına 0,5 µM olacak şekilde, probe konsantrasyonları 0,2 µM olacak şekilde, Mg⁺² konsantrasyonu 3mM olacak şekilde, LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Katolog No: 03003248001 Roche Diagnostics, Mannheim Germany) enzim miksi 1x konsantrasyonda ve son reaksiyon hacmimiz 5 µL DNA eklenerek toplam 20 u µL olacak şekilde ayarlandı.

A. PCR protokolü

1. **Denaturasyon:** Hotstart bir enzim kullanıldığı için 95⁰C de 10 dakika
2. **Siklus:** 45 siklus olacak şekilde 95⁰C de 5 saniye, 58⁰ C de 5 saniye ve 72⁰C 10 saniye amplifikasyon programı uygulandı. 58⁰ C de florometrik bir tek (single) okuma yaptırıldı.
3. **Erime:** 1 siklus 95⁰C de 30 saniye, 37⁰C de 60 saniye ve 85⁰C de 0 saniye olarak programlandı. Bu aşamada 0,1⁰C/saniye sıcaklık artışıyla sürekli floresan okuma (continous) yaptırıldı.
4. **Soğutma:** 40⁰C de 30 saniye.

Analiz erime değerleri karşılaştırılarak yapıldı. Hibridizasyon probu yöntemi mutasyon analizi yapıldı. Kontrol DNA ile örneklerin erime sonuçları karşılaştırılarak wildtype (doğal tip) (G nukleotidi içeren sekans) ve mutant (G

nukleotidi içermeyen sekans) olduğuna karar verildi. Probumuz wildtype spesifik olduğu için yüksek derecede pik verenler bizim G nukleotidine sahip bireylerimiz, düşük pike sahip örnekler ise G nukleotidine sahip olmayan bireyler olarak isimlendirilmiştir.

IV. BULGULAR

Presbiakuzi grubunda ve bilateral SNİK <45 yaş gruplarında Connexin 26 35 delG mutasyonu olan 1'er olgu var iken, unilateral SNİK ve kontrol gruplarında Connexin 26 35 delG mutasyonu olan hiçbir olguya rastlanmamış olup, bu dağılım istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde hasta grupları ve kontrol grubundaki Connexin 26 35 delG mutasyonu dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta grupları ve Kontrol grubunda Connexin 26 35 delG mutasyonu karşılaştırması

	<u>Mutasyon</u>		
	Yok	var	p
Grup			0,676
Presbiakuzi (n=34)	33 (97,1)	1 (2,9)	
Bilateral SNİK<45 yaş (n=35)	34 (97,2)	1 (2,8)	
Unilateral SNİK (n=17)	17 (100,0)	-	
Kontrol (n=35)	35 (100,0)	-	

Çalışma grubumuzun yaş ortalaması (yıl) $39,27\pm 21,18$ (1- 77 yaş) , YTİK'lı grubun yaş ortalaması (yıl) $60,44\pm 9,65$ (45- 77 yaş), bilateral SNİK'li grubun yaş ortalaması $18,89\pm 11,18$ (1- 43 yaş), unilateral SNİK'li grubun yaş ortalaması $37,35\pm 23,23$ (8- 69 yaş), kontrol grubunun ise $40,66\pm 14,71$ (14- 63 yaş) idi.

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 17.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri tablo ile özetlendi. Niteliksel olan Connexin 26 35 delG mutasyonu dağılımının karşılaştırmasında Chi-Square testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı, $p>0,05$ istatistiksel anlamsız olarak değerlendirildi.

V. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, yaşlılık tipi işitme kaybı tespit ettiğimiz 34 hasta, bilateral sensörinöral işitme kaybı tespit edilmiş 45 yaş altında olan 35 hasta, tek taraflı sensörinöral işitme kaybı tespit edilmiş 17 hasta ve 34 sağlıklı olgu olmak üzere, toplam 120 olgu, Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir.

Presbiakuzi grubunda ve bilateral SNİK< 45 yaş gruplarında Cx26 35delG mutasyonu olan 1'er olgu var iken, unilateral SNİK ve kontrol gruplarında Cx26 35delG mutasyonu olan hiçbir olguya rastlanmamış olup, bu dağılım istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde hasta grupları ve kontrol gruplarındaki Cx26 35delG mutasyonları dağılımları arasında anlamlı bir fark saptayamadık.

İşitme kaybı kişinin konuşma, ifade etme, kavrama ve psikososyal gelişiminde değişikliklere neden olan en yaygın duysal bozukluklarından biridir. İşitme kaybı, en sık görülen duyu bozukluklarından biri olup insidansı yaklaşık 1/1000'dir. Prevelansı yaşa bağlı olarak artmaktadır.¹ Gelişmiş ülkelerde işitme kayıplarının yaklaşık %60'ı genetik nedenlerle meydana gelmektedir.²

Connexinler ve gap junctionlar normal işitme fonksiyonu için gereklidirler ve kokleanın epitelyumu ve destek doku hücreleri içerisinde bol miktarda bulunurlar. Gap junctionlar bitişik koklear hücreler arasında köprüler kurulmasını sağlar ve hücrel iyon değişimini kontrol ederek potasyum iyonlarının iç kulak sıvıları arasında resirkülasyonunu sağlar. Skala vestibüli, skala timpani, skala medianın işitme fonksiyonu için iyondan zengin sıvılar içermesi gerekmektedir. Normal koşullarda skala mediadaki endolenfdeki potasyum konsantrasyonu yüksektir, aynı zamanda kalsiyum ve sodyum konsantrasyonları düşüktür. Skala vestibüli ve timpanideki perilenfte bu durum tam tersidir. Elektrolitler gap junctionlar aracılığı ile endolenf ve stria vaskülaris ve spiral ligament arasında dolaşır. Ek olarak epitelyal hücrelerin yüzeyinde hücreler ve koklea arasında direkt potasyum dönüşümünü sağlayan connexonlar bulunmaktadır, bu iyon döngüsünü tamamlamaktadır. Bu olaylar kokleadaki normal işitme fonksiyonu için elektrolitlerin dengesini ve dağılımını sağlamaktadır.

Connexin 26, kokleada en çok üretilen connexindir. Corti organının destekleyici hücrelerini içeren dış tüylü hücrelerin etrafında, iç ve dış sulkus

hücreleri ve spiral limbusun interdental hücrelerinde tanımlanmaktadır. Connexin 26 aynı zamanda iç kulağın destek dokusu içinde; skala vestibülde uzanan mezenkimal hücrelerde, spiral limbs ve ligamandaki fibrositlerde de tanımlanmıştır. Cx26 üretimindeki gen mutasyonları potasyum iyonlarının endolenfe dönmesini durdurur ve Corti organının progresif olarak intoksikasyonuna neden olur. Bu da hücresel disfonksiyona ve sonrasında hücre ölümüne neden olur.

Anormal Cx26 üretiminin %85'i 35delG mutasyonuna bağlı olabilir. Bu mutasyon altı ardı ardına gelen guanin serisinde meydana gelmektedir. Bu mutasyona sahip homozigot bireylerde orta derecede işitme kaybından ileri derecede işitme kaybına kadar çeşitli fenotipler görülebilmektedir. Bu da genetik faktörlerin ve çevresel faktörlerin bir arada rol oynadığını destekleyen bir görüştür.

İşitme kaybı ile ilişkili Cx26 gen mutasyonunun prevalansının hesaplanması tüm dünyada çalışılmaktadır. Cohn ve ark. 1000 çocuktan 1'inde non-sendromik işitme kaybı olduğunu, bunun da en sık sebebin GJB2 gen mutasyonu olduğunu düşünmektedirler. Bu bulguları Denoyelle ve arkadaşlarının 1999'da yaptığı SNİK'li 140 çocuğu içeren çalışma ve Frei ve arkadaşlarının yaptığı çalışma desteklemektedir.

Fransa, İngiltere ve Yeni Zelanda' daki ileri derecede işitme kaybı olan çocukları içeren çok kıtalı analizde çalışma grubundaki ailelerin %50 sinde Cx26 gen mutasyonu saptanmıştır. GJB2 mutasyonlarının %70'ine 35delG mutasyonu belirlenmiştir. Bu da 35delG mutasyonunun insanlarda şimdiye kadar gösterilmiş en yüksek prevalansa sahip kistik fibrozise neden olan AF508 geninin mutasyonu ile eşit prevalansta olduğunu göstermektedir. Orzan ve ark. GJB2 mutasyonlarının en sık gözlenen herediter defektlerden biri olduğunu bildirmişlerdir.

Dahl ve ark. tarafından Avusturalya'da yapılmış bir çalışmada 243 işitme kaybı olan hastada GJB2 mutasyonu prevalansı ve subtip sınıflandırılması yapılmıştır. Vakaların DNA analizlerinde 54'de 1 GJB2 mutasyonu ve 100'de 1 de 35delG mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonların Avusturalya'daki işitme kayıplarının en sık sebebi olduğunu göstermişlerdir.

Bitner-Glindzicz ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada Kafkaslardaki non-sendromik işitme kaybının %50'sinin Cx26 genindeki mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kenna ve ark. SNİK ve miksed tip işitme kaybı olan çocuklarda Cx26 mutasyon spektrumunu ve fenotiplerini tanımlamak için yaşları 1 haftalık ile 16 yaş arasında 107 vakalık bir çalışma yapmışlardır. Bunların 30'unda Cx26 mutasyonu saptanmıştır. 12'si önceden bilinen 15 farklı tipte mutasyon tespit edilmiştir (35delG, 167delT, E47X, L90P, M34T, G12V, V37I, R143W, V84L, V153I, V27I, 30del14). En sık bulunanlar 35delG (%40), 167delT (%19), M34T (%8)'dir. İşitme kaybı unilateral yüksek frekanslıdan, bilateral şiddetli SNİK'e kadar değişmekteydi. Çocuklardaki SNİK varlığında saptanan Cx26 mutasyonunun insidansının yüksek olması nedeniyle erken dönemlerde tarama testi olarak kullanılabilir.²³

Erbe ve ark. yaşları 2 aylık ile 18 yaş arasında 68 vakalık çalışmasında non-sendromik işitme kaybı olan çocuklarda connexin 26 ve connexin 30 mutasyonu varlığını araştırmışlardır. Yenidoğan yoğun bakım alımı alan, yenidoğan intravenöz tedavi almış olan, kraniyofasiyel anomalisi olan, baş travması almış olanlar, sendromik işitme kaybı olanlar çalışma dışı bırakılmıştır. 27 vakada (%39,7) GJB2 geninde mutasyon saptanmıştır. Bunların %56,2'ından sorumlu olan allel ise 35delG olarak tespit edilmiştir.²⁸

Bizim çalışmamızda ise 45 yaşın altında bilateral sensorinöral işitme kaybı olan 35 vakanın 1'inde 35delG mutasyonu saptandı.

Yaşlılık tipi işitme kaybı (presbiakuzi) insanın yaşlanmasıyla birlikte ortaya çıkan iki taraflı sensorinöral işitme kaybıdır. İşitme kaybı her frekansı tutmasına karşın genellikle 2000 Hz üzerindeki frekanslarda ortaya çıkar. Yetişkin yaşta en sık görülen duysal bozukluktur. YTİK etiolojisinde çevresel ve genetik faktörlerin bulunduğu kompleks bir bozukluktur. Çalışabilmiş en iyi çevresel etken sese maruziyettir (Flock ve ark., Mulroy ve ark., Yamasoba ve ark.) YTİK ile bağlantılı genetik çalışmaların sayısı sınırlıdır. Non-sendromik SNİK'e en sık neden olan connexin 26 geni ve bu gende en sık mutant olarak saptanmış olan 35delG YTİK'nin genetik etiolojisinde de en şüpheli durumudur. Biz de çalışmamızda bu ilişkiyi araştırdık. YTİK ile 35 delG mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptayamadık. Literatürde de günümüze kadar YTİK ile anlamlı ilişkili olan sadece 2 genom gösterilebilmiştir.

Angeli ve ark. yaptıkları çalışmada, YTIK saptanan 60 hastada klinik, odyolojik, immünolojik, DNA analizi ve görüntüleme yöntemleri kullanılarak işitme kaybının etyolojisi araştırılmıştır. 60 hastanın 6'sında işitme kaybının etiyolojisi saptanmıştır. Otozomal resesif işitme kayıpları daha şiddetli ve prelingual, otozomal dominant işitme kayıpları ise genellikle postlingual ve ilerleyicidir. Otozomal dominant işitme kayıplı olan hastalarda aile hikayesi olması beklenir. Mitokondrial işitme azlığı saptanmış olan hastalarda maternal bir geçiş olması beklenir. Angeli ve ark. çalışmalarında non-sendromik işitme kayıplarının en sık nedeni olan GJB2 genindeki mutasyonu ve sporadik, ailesel nonsendromik ilerleyici işitme kaybından sorumlu olduğu düşünülen mitokondrial DNA (mtDNA) mutasyonları çalışılmıştır. 4 vakanın mitokondrial DNA'larında homoplazmik mutasyonlar saptanmışlardır. GJB2 geni 35delG için allel spesifik olarak yapılan PCR analizi sonucunda hiçbir vakada mutasyon saptanmamıştır. 2 vakada ise bilgisayarlı tomografide koklear otoskleroz tanısı koyduran bulgular saptanmıştır. Bu veriler ışığında yetişkin yaş işitme kayıplarında mtDNA mutasyonlarının daha sık izlendiği tespit edilmiştir. SNİK'nin hem sendromik hem de non-sendromik formlarının mtDNA mutasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi klinisyen açısından çok önemlidir çünkü mitokondrial işitme kayıpları medikal olarak tedavi edilebilir. Mitokondrial bozuklukların erken teşhisi risk faktörlerinden korunmak, ilişkili diğer mitokondrial bozuklukların erken teşhisi, genetik danışmanlık, tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Angeli ve ark. çalışmasında hiçbir otoimmün iç kulak hastalığı saptanmamıştır.²⁹

Propst ve ark. GJB2' deki mutasyona bağlı oluşan SNİK'lerde bilgisayarlı tomografi ile temporal kemik anomalisi varlığını göstermeyi amaçlamışlardır. Önceden yapılmış az sayıda çalışmada GJB2 mutasyonu ile temporal kemik anomalileri arasında güvenilir bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmada belirgin SNİK nedeni ile koklear implant kullanan pediatrik hastaların temporal kemikleri bilgisayarlı tomografi ile incelenmiştir. 53 vakada 106 kulak incelenmiş. Bu çalışmada 264 koklear implant kullanan hastanın 56'sında (%21) Cx26 mutasyonu olduğu tespit edilmiş. Yine bu çalışmada da en sık mutasyon nedeni olarak da 35delG mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyonu olan vakaların temporal BT'lerinde en sık tespit edilen anomaliler;1) dilate endolenfatik fossa; 2) hipoplastik modiulus; 3) GVA (geniş vestibüler aquadukt); 4) hipoplastik

semisirküler kanal; 5) hipoplastik koklea. GJB2 mutasyonuna bağlı SNİK aynı zamanda hipoplastik bir koklear kanal ve dar bir internal auditor kanal ile ilişkilidir. Bu sonuçlara dayanarak, GJB2'ye bağlı SNİK olan hastalarda temporal kemik görüntülemesinin klinisyene katkısının olacağını söyleyebiliriz.³⁰

Ünal ve ark., N-asetiltransferaz 2 genindeki polimorfizmle YTİK arasında bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. YTİK oluşumuna neden olabilecek birçok faktör olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında değişen vasküler özellikler, oksijendeki düşme, serbest radikaller olarak da bilinen reaktif oksijen ürünlerindeki (ROÜ) belirgin artma sayılabilir.³¹ ROÜ aracılığıyla oluşan hücrel hasarlar aracılığıyla, ilaçların, yaşlanmanın ve gürültünün iç kulakta hasara yol açabileceğini gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. İç kulakta, birçok detoksifiye edici ve antioksidan enzim gösterilmiştir. Bunlar arasında; katalaz, superoxid dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz (GST) vardır. İki tip NAT isoenzimi vardır. NAT1 ve NAT2 belirlenmiş olan bu iki izoenzimdir. Presbiakuzinin genetik nedenleri, sese maruziyet, hastalıklar ve ototoksik ilaç tedavileri nedeniyle tam olarak bilinmemektedir. YTİK'in farklı yaş gruplarında farklı seviyelerde izlenmesi bireylerin genetik faktörlerinin de bu süreci etkilediğini düşündürmektedir. Ünal ve ark. tüm vakaları ve kontrol grubunu Türkiye'nin aynı kısmından ve aynı etnik kökenden seçmişlerdir. 68 YTİK'li hasta ve 98 sağlıklı kontrol bireyinde NAT2 polimorfizmini araştırmışlardır. NAT2 6A mutant genotipe izlenen hastalarla presbiakuzi gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır. Bu İngiliz literatüründeki presbiakuziyle genetik ilişkiyi gösteren ilk çalışmadır. Presbiakuzinin etiyopatogenezinde NAT ve diğer antioksidan enzimlerdeki polimorfizmin varlığı mutlaka akılda tutulması koruyucu ve tedavi edici hekimlik hizmetleri açısından önem taşımaktadır.³²

Ateş ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada Glutatyon S transferaz(GST) gen polimorfizmi ile presbiakuzi arasındaki ilişkiyi incelemişler. GST gen polimorfizmi ile presbiakuzi arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır.³³

YTİK oluşumu ile ilgili genetik çalışmalar ve bilgi sınırlıdır. Sesin algılanmasıyla ilgili bir çok kompleks moleküler yollar vardır. Bu moleküler yollardan herhangi birindeki bozukluk işitme kaybı ile sonuçlanabilir. YTİK'nın etyolojisinde birçok gen sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Günümüze kadar

YTİK'e neden olabilecek nedenler hakkında çok analiz yapılmamıştır. Bu durumdan korunma ya da bu hastalıktan kurtulma şansımızı düşürmektedir.

GJB2, YTİK ve gürültüye bağlı işitme kaybı (GBİK) oluşumuna neden olabilecek en şüpheli gendir. 35delG mutasyonu beyaz ırkta en sık görülen mutasyondur. Bu mutasyonla YTİK ve GBİK arasındaki ilişki Van Eyken ve ark. tarafından araştırılmıştır. Van Eyken ve ark. dokuz Avrupa ülkesinden yaşları 53 ile 67 arasında değişen 2311 gönüllü bireyde yaşlılık tipi işitme kaybı ile Cx26 geni 35delG mutasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Ayrıca aynı çalışmada yaklaşık 702 Polonyalı işçide yine aynı mutasyonla gürültüye bağlı işitme kaybı (GBİK) arasındaki ilişki de araştırılmıştır. 35delG genotipi ile YTİK arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. GBİK ile de anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır.³⁴ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde YTİK ile Cx26 35delG mutasyonu arasında bir ilişki saptanamamıştır. Bu konuda başka gen mutasyonlarının da rolü olabileceği akılda tutulmalıdır. Bunun ortaya çıkarılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Van Eyke ve ark. yaptıkları bir başka genetik çalışmada YTİK ile KCNQ4 geni arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. KCNQ4 potasyum kanalını kodlayan bir gendir. Kokleadaki tüylü hücrelerde, vestibüler aparatusta ve beyin sapındaki işitsel nükleusta üretilmektedir. Tüylü hücrelerin bazal membranından salınıyor olması tüylü hücrelerdeki potasyum döngüsünden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Farelerde yapılmış bir çalışmada KCNQ4 kanallarındaki değişiklikler dış tüylü hücrelerde dejenerasyona ve buna bağlı olarak ilerleyici işitme kaybına neden olmuştur (Kharkovets ve ark. 2006). KCNQ4 mutasyonu otozomal dominant non-sendromik işitme kaybına neden olur, DFNA2. Bu çalışmaya kadar YTİK ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan tek genom NAT genomuydu. KCNQ4 mutasyonu YTİK ile ilişkili olduğu gösterilmiş ikinci gen mutasyonudur. Biribirinden bağımsız iki topluluğun ikisinde de KCNQ4 mutasyonu ile YTİK arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir.⁵

Genetik bozukluklarının artması ile birlikte sosyal beklentilerin artması ile aileler işitme kaybının nedenini öğrenmek için isteklidirler. Kesin ve efektif tanının konması, doğru klinik yaklaşımın sağlanması, hastaya göre genetik danışmanlık için işitme kaybının nedeninin genetik testler aracılığı ile tanımlanması gerekmektedir.³⁵

Yetişkin yaşta başlamış işitme kayıplarına neden olan genetik bozuklukların prevalansını ortaya koyacak epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır; aynı zamanda DNA testi yapılacak hastaların seçiminde, fenotip- genotip birlikteliğinin gözönüne alarak bize yola gösterecek çalışmalara da ihtiyaç vardır.

İstatistiksel, odyolojik, patolojik ve deneysel çalışmalar göstermiştir ki presbiakuzinin etiyolojisi karışıktır. İç faktörler (genetik), aynı zamanda dış faktörler yaşa bağlı hasarlanma sürecinde birlikte rol alırlar. Gürültü, travma, enfeksiyonlar, ototoksik ilaçlar işitmeyi kötüleştirdiği bilinen dış faktörlerdendir. Sistemik vasküler bozukluklar (arterioskleroz) ile işitme kayıpları arasındaki güçlü birlikteliği gösteren çalışmalar vardır. İç kulaktaki lokal vasküler yetmezlik presbiakuzideki belki de en önemli faktördür.³⁶

Bai ve ark. 34 adet temporal kemikten koklear kesitler olarak mitokondrial DNA incelemişlerdir. Temporal kemiklerden 17'si normal işiten kulaktan, 17'si presbiakuzili kulaktandı. Tüm kemiklerde mtDNA'daki sitokrom b geni ve 4977 baz çifti delesyonları gösterilmiş. Sonuç olarak 4977 baz çiftindeki delesyonunun, yaşlanma ve ve presbiakuzinin bazı tipleri ile anlamlı olarak ilişkide olduğunu göstermişlerdir. mtDNA delesyonları yaşla beraber artmaktadır. Diğer koklear patolojilerin değerlendirilebilmesi için daha fazla temporal kemik analizlerinin yapılması gerekmektedir.³⁷

Hochman ve ark. erken idiyopatik ya da herediter ilerleyici SNİK olan koklear implant adayı yetişin hastalarda connexin 26 mutasyonu ve SLC26A4 mutasyonu prevalansını çalışmışlar. 57 vaka GJB2 mutasyonu açısından incelenmiş. 8'inde GJB2 mutasyonuna bağlı işitme kaybı saptanmıştır. Bu 57 hastanın 30'u aynı zamanda SLC26A4 mutasyonu açısından incelenmiş. 30 hastanın 3'ünde SLC26A4 mutasyonu saptanmıştır. Yetişkin yaş grubundaki SNİK'lerde GJB2 ve SLC26A4 prevalansı anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.³⁸

Liu ve ark. GJB2 nedeniyle işitme kaybı olan hastalardaki odyolojik özelliklerin neler olduğunu göstermek için yaptıkları çalışmada en sık olarak rezidüel/düşen tipte odyogramla karşılaşmışlardır. GJB2 mutasyonu olan hastaların hiç birinin odyogramı yükselen tarzda değildi. Bizim çalışmamızda GJB2 35 delG mutasyonu saptadığımız hastanın odyogramı da sensitif tip presbiakuziye uyan şekilde yüksek frekanslarda düşen tarzdaydı.³⁹

YTİK oluşumu ile ilgili genetik çalışmalar ve bilgi sınırlıdır. GJB2, YTİK oluşumuna neden olabilecek en şüpheli gendir. 35delG mutasyonu beyaz ırkta

en sık görülen mutasyondur. Çalışmamızda Cx26 geni 35delG mutasyonu ile YTIK arasında ilişki saptayamadık. YTIK'e neden olan genetik bozuklukların prevalansını ortaya koyacak epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu konuda başka gen mutasyonlarının da rolü olabileceği akılda tutulmalıdır. Bunun ortaya çıkarılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇ ve ÖNERİ

YTİK insanın yaşlanmasıyla birlikte ortaya çıkan iki taraflı sensörinöral işitme kaybıdır ve ileri yaşta en sık görülen duysal bozukluktur. Gelişmiş ülkelerde yaşam süresinin uzaması YTİK zamanla daha sık rastlanılan bir durum olacağını düşündürmektedir. YTİK etiolojisinde çevresel ve genetik etkenlerin bulunduğu kompleks bir hastalıktır. YTİK'e ile ilgili genetik çalışmalar olmasına rağmen sayısı sınırlıdır.

İleri yaştaki insanların toplumdan soyutlanmalarına neden olan YTİK'in etiolojisine yönelik ileri genetik araştırmaların yapılması gerekmektedir. Spesifik gen mutasyonlarının tespiti ve daha gelişmiş tıbbi tedavi olanaklarının oluşmasına katkı sağlanabilecektir.

VII. ÖZET

İşitme kaybı, en sık görülen duyu bozukluklarından biri olup, insidansı yaklaşık 1/1000'dir. Prevelansı yaşa bağlı olarak artmaktadır ve yaşlılıkta en sık görülen duyu bozukluğudur. Non sendromik işitme kaybına neden olan genler içinde en önemli yeri, otozomal resesif kalıtılan (DFNB) DFNB 1 lokusunda sorumlu gen olan Connexin 26 (GJB2 / Cx26) tutmaktadır. Beyaz ırkta Cx26 geninde en sık görülen mutasyon 35delG'dir. Yaşlılık tipi işitme kaybı, diğer adıyla presbiakuzi, en sık simetrik, bilateral ve yüksek frekanslarda daha belirgin olarak seyreder. Prevelansı 61- 70 yaş arasında %37 iken 71- 80 yaş arasında %60'dır. YTİK'in etiolojisinde genetik ve çevresel faktörler yer almaktadır. Biz çalışmamızda sensörinöral işitme kaybı, özellikle da YTİK ile Connexin 26 35delG mutasyonu arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Bu çalışma kapsamında, yaşlılık tipi işitme kaybı tespit ettiğimiz 34 hasta, bilateral sensörinöral işitme kaybı tesbit edilmiş 45 yaş altında olan 35 hasta, tek taraflı sensörinöral işitme kaybı tesbit edilmiş 17 hasta ve 34 sağlıklı birey, Cx26 geninde görülen 35delG mutasyonu açısından incelenmiştir. Hastalardan alınan tam kan örneklerinden HighPure PCR Template Preparation Kit (Cat. No: 11796828001, Roche Diagnostic, Germany) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Realtime polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) primerleri; PCR-primer forward: AGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCT ve PCR-primer reversed: CTTTCCAATGCTGGTGGAGTG ve Florasan Labeled probe: TTCACACCCCCAG, Anchor Probe: TCGTCTGCAGCGTGCCCCAAATCCATCTTCT olarak TIB MOLBIOL GmbH (Eresburgstraße 22-23 D-12103 Berlin) firmasına yaptırıldı.

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 17.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri tablo ile özetlendi. Niteliksel olan Connexin 26 35 delG mutasyonu dağılımının karşılaştırmasında Chi-Square testi kullanıldı.

Hasta grubunda Connexin 26 35 delG mutasyonu olan 1 (%2,9) olgu var iken , kontrol grubunda Connexin 26 35 delG mutasyonu olan hiçbir olguya rastlanmamış olup, bu dağılım istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde hasta ve kontrol grubundaki Connexin 26 35 delG mutasyonu dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptayamadık.

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

Hearing impairment is one of the most common sensory impairment and incidence of hearing loss is 1/1000. Prevalence of hearing loss increases due to age and it is the most common sensorial disorder among the elderly. The most important role causing non-syndromic hearing loss is Connexin 26(GJB2/Cx26) gene which is encoded autosomal recessive (DFNB1). The most frequent mutation in the Caucasians. In its most typical presentation of age related hearing impairment (ARHI) alias presbycusis, symmetrical, sensorineural and more pronounced in the high frequencies. The prevalence of hearing loss is 37% for people aged 61 to 70, and it is 60% for people aged 71 to 80 years. Environmental and genetic factors contribute to the etiology of the ARHI. We study the relation between sensorineural hearing impairment especially ARHI and Connexin 26 35delG mutation.

In this study, 34 patients with ARHI, 35 patients under 45 years old with bilateral sensorineural hearing loss, 17 patients with unilateral hearing loss and 34 healthy volunteers analyzed for Cx26 35delG mutation. The blood samples analysed with HighPure PCR Template Preparation Kit (Cat. No: 11796828001, Roche Diagnostic, Germany), DNA isolation was performed. Realtime polymerase chain reaction(PCR) primers; PCR-primer forward: AGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCT and PCR-primer reversed: CTTTCCAATGCTGGTGGAGTG ve Florasan Labeled probe: TTCACACCCCCAG, Anchor Probe: TCGTCTGCAGCGTGCCCCAAATCCATCTTCT analyzed by TIB MOLBIOL GmbH (Eresburgstraße 22-23 D-12103 Berlin) company.

SPSS(Statistical Package for Social Sciences) for windows 17.0 program was used for the statistical analyses. The data were summarized with a table. To compare the distribution of Connexin 26 35delG mutation Chi- Square test was used.

In the ARHI study group we could identify Cx26 35delG mutation in only 1(2,9%) case. In control group there is no mutant gene. When we analysed this data statistically, we could not identify any relation between patient and control groups.

IX. KAYNAKLAR

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1991; 630, 16- 31.
2. Petit C. Genes Responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. Nat. Genet. 1996; 14, 385- 391.
3. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. Nature 1997; 387:80-83.
4. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin26 hearing impairment. J. Med Genet. 2001; 38:515-518.
5. Van Eyken E, Van Laer L, et al. KCNQ4: A gene for age related hearing impairment?. Human Mut. 2006; 27(10), 1007-1016.
6. İşitme sistemi şekli: www.thehearingdoctorstl.com adresinden değiştirilerek alınmıştır.
7. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. Hum. Mol. Genet. 1998; 7(10), 1589-1597.
8. Stach BA. Clinical Audiology:An Introduction, 1998;s:46-47.
9. Parving A, Vewton V. Guidelines for description of inherited hearing loss. Audiol. Med 1995; 4: 2-5.
10. Pearlman RC. Presbycusis: The need for a clinical definition. The American Journal of Otology 1982;3(3):183-185.
11. Gates GA, Caspary DM, Clark W, et al. Presbycusis. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1989;100:266-271.
12. Seidman MD, Khan MJ, Dolan DF, Quirk WS. Age related differences in cochlear microcirculation and auditory brain stem response. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:1221-1226.
13. Gilad O, Glorig A. Presbycusis: the aging ear. Part II. J Am Aud Soc 1979;4:207-17.
14. Çelik O. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi,2007; s:78-80.
15. Xiaoyan CL, Rick AF, Nonsyndromic hereditary hearing loss. Otolaryngol. Clin. N. Am. 2002; 35, 275-285.

16. Cohen MM Jr, Gorlin RJ, Epidemiology, aetiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM: Jr(eds), Hereditary Hearing Loss and its syndromes. Oxford University Press, Oxford, 1995; 9-21.
17. Willems PJ, Genetic causes of hearing loss. N. Engl. J. Med. 2000; 342, 1101-1009.
18. H.A. Chapman Institute of Medical Genetics, Hereditary Nonsyndromic Hearing Loss, Connexin 26 gen analysis.
19. Hone SW, Smith RJH, Genetic screening for hearing loss, Clin.Otolaryngol. 2003; 28, 285-290.
20. Van Camp G, Smith RJH, Hereditary Hearing Loss Homepage. 2010; www.hereditaryhearingloss.org.
21. Rozental R, Giaunne C, Spray DC. Gap Junctions in the nervous system. Brain Res. Rev. 2000; 32, 11-15.
22. Kijuchi T, Imura RS, Paul DL et al. Gap junctions in rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. Anat. Embryol. 1995; 191, 101-118.
23. Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 127:1037–1042.
24. 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.
25. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. Gene 1997; 199: 165-171.
26. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of the childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect:implications for genetic counselling. Lancet; 1999; 353:1298-303.
27. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mutat 1998; 11(5):387-94.
28. Erbe CB, Harris KC et al. Connexin26 and Connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. Laryngoscope. 2004; 114:607-611.

29. Angeli SI, Yan D, Telischi F, et al. Etiologic diagnosis of sensorineural hearing loss in adults. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 2005;132:890-895.
30. Propst EJ, Blaser S, Stockley TL. Temporal bone imaging in GJB2 deafness. *Laryngoscope*, 2006; 116:2178-2186.
31. Seidman MD, Khan MJ et al. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age related hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127:138-144.
32. Ünal M, Tamer L, Doğruer ZN et al. N-Acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *Laryngoscope*.2005; 115:2238-224.
33. Ateş NA, Ünal M et al. Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms in presbycusis. *Otology&Neurotology*, 2005;26:392-397.
34. Van Eyken E, Van Laer L, Fransen E, Topsakal V, et al. The contribution of GJB2(Connexin 26) 35delG to age related hearing impairment and noise induced hearing loss. *Otol. Neurotol.* 2007; 28:970-975.
35. Apps S, Rankin W, Kurmis A. Connexin 26 mutations in autosomal recessive deafness disorders:A review. *International Journal of Audiology* 2007; 46: 75-81.
36. Gilad O, Glorig A. Presbycusis:the aging ear part II. *Journal of the American Auditory Society*, 1979;4(6):207- 217.
37. Bai U, Seidman MD, et al. Mitochondrial DNA deletions with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *The American Journal of Otology*, 1997; 18:449-453.
38. Hochman JB, Stockley TL, et al.Prevalence of connexin 26(GJB2) and Pendred(SCL26A4) Mutations in a population of adult Cochlear implant candidates. *Otology&Neurotology*, 2010;31:919-922.
39. Liu XZ, Pandya A, Angeli S, et al. Audiological Features of GJB2 (connexin26) deafness. *Ear&Hearing*, 2005;26:361-369.