T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Metin BUDAK

KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLI KOBAYLARIN SERUM RİBEYE VE PRESTİN MİKTARLARININ ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

PERİHAN BÜŞRA KOKTAY

EDİRNE-2025

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Metin BUDAK

KONJENİTAL İŞİTME KAYIPLI KOBAYLARIN SERUM RİBEYE VE PRESTİN MİKTARLARININ ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

PERİHAN BÜŞRA KOKTAY

EDİRNE-2025

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... **İ**
ETİK BEYAN ..... **İİ**
İTHAF ..... **İİİ**
TEŞEKKÜR ..... **İV**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **V**
ÖZET ..... **Vİ**
ABSTRACT ..... **Vİİİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 İşitme Sistemi ve Fizyolojisi **3**
2.1.1. Kulak Yapısı ve İşlevleri **3**
2.1.2. İşitme Mekanizması **3**
2.1.3. İç Kulakta Dış Tüylü Hücrelerin Rolü **3**
2.1.4. Kokleanın Elektromotilitesi **4**
2.2. Konjenital İşitme Kaybı **4**
2.2.1. Tanımı ve Sınıflandırılması **4**
2.2.2. Genetik ve Çevresel Nedenler **5**
2.2.3. Hayvan Modellerinde Konjenital İşitme Kaybı **6**
2.3. Prestin Proteini **6**
2.3.1. Prestin'in Moleküler Yapısı ve Fonksiyonu **6**
2.3.2. Prestin ve İşitme İlişkisi **6**
2.3.3. Serumda Prestin Seviyesi Ölçümünün Biyobelirteç Olarak Kullanımı **7**
2.4. Ribeye Proteini **7**
2.4.1. Ribbon Sinapsların Yapısı ve Ribeye'nin Rolü **7**
2.4.2. Ribeye'nin İşitme Fizyolojisindeki Önemi **7**
2.4.3. Serumda Ribeye Düzeylerinin Ölçümü **8**
2.5. İşitme Değerlendirme Yöntemleri **8**
2.5.1. Auditory Brainstem Response **8**
2.5.2. Otoakustik Emisyonlar **9**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **11**
3.1. Deney Hayvanı ve Gruplandırma **12**
3.2 Elektrofizyolojik Ölçümler **13**
3.2.1 İşitsel Beyinsapı Yanıtlarının Analizi **13**

3.2.2. Otoakustik Emisyonlar 13
3.3. Histopatolojik Değerlendirmeler 13
3.3.1. Işık Mikroskobu İncelemesi 14
3.3.2. TUNEL Metodu 14
3.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme 15
3.3.4. Tarama Elektron Mikroskobisi - Ultrastruktüel Değerlendirme 16
3.3.5. Antioksidan Kapasite Ölçümü 16
3.3.6. Inos, p53 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Değerlendirmeleri 17
3.4. Serum Prestin Ve Ribeye Analiz Yöntemleri 18
3.5. İstatistiksel Analiz 19
4. BULGULAR 20
4.1. Gruplar Arası Karşılaştırmalar 21
5. TARTIŞMA 22
KAYNAKLAR 24
EKLER I
EK 1: Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı……..I
ÖZGEÇMİŞ II
BENZERLİK RAPORU III

ONAY SAYFASI

ETİK BEYAN

“Konjenital işitme kayıplı kobayların serum ribeye ve prestin miktarlarının araştırılması’ adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Perihan Büşra Koktay

İmza

İTHAF

"Yüksek Lisans Tezimi desteğini, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme ve arkadaşlarıma"

ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, her aşamada destek sağlayan değerli tez danışmanım Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Metin BUDAK'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Tammam SİPAHİ, Doç. Dr. Arzu AY ve diğer tüm kıymetli hocalarıma, deney materyallerinin temininde katkı sunan Doç. Dr. Erdoğan BULUT ve Öğr. Gör. Murat ARSLAN'a, ayrıca deneysel süreçlerde desteklerini esirgemeyen Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

SİMGE VE KISALTMALAR

ABR: Auditory Brain Responce

DPOAE: Distortion Product Otoacoustic Emission

ELISA: Enzim Bağlantılı Immünosorbent Testi

GJB2: Gap Junction Beta-2

OAE: Otoakustik Emisyon

OTOF: Otoferlin

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

SEM: Scanning Electron Microscopy

SLC26A4: Solute Carrier Family 26 Member 4

SLC6A5: Solute Carrier Family 6 Member 5

SNR: Sinyal/Gürültü Oranı

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

"Konjenital işitme kayıplı kobaylarda serum ribeye ve prestin proteinlerinin araştırılması", Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Edirne, 2025.

Giriş ve Amaç: İşitme, ses dalgalarının kulak yapıları aracılığıyla iç kulağa iletilmesi ve burada sinirsel uyarılara dönüştürülerek beyin korteksine iletilmesi ile gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. İç kulakta yer alan dış tüylü hücrelerin elektromotilitesi, bu sürecin hassasiyetini belirleyen temel faktörlerden biridir. Prestin proteini, dış tüylü hücrelerin motilitesinden sorumlu olup, koklear amplifikasyonda anahtar rol oynar. Öte yandan ribeye proteini, iç tüylü hücrelerde yer alan ribbon sinapsların temel bileşenlerinden biri olarak, işitsel sinyallerin sinaptik iletiminde önemli görevler üstlenmektedir.

Konjenital işitme kaybı, doğumda mevcut olan ya da yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkan kalıcı bir işitme kaybı türüdür ve bireyin dil, bilişsel ve sosyal gelişimini ciddi düzeyde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, erken tanı ve müdahale oldukça kritik olup, güvenilir biyobelirteçlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, konjenital işitme kaybı oluşturulan kobaylarda serum prestin ve ribeye düzeylerinin ölçülerek bu proteinlerin işitme kaybıyla ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda;10 deney, 10 kontrol grubu olmak üzere toplam 20 adet Hartley cinsi, 0–6 aylık ve 250–650 gram ağırlığında genç-erişkin kobay kullanılmıştır. Deney grubu konjenital işitme kayıplı kobaylardan, kontrol grubu ise normal işitme fonksiyonuna sahip kobaylardan oluşturulmuştur. Kobaylar, %50 nem ve 21 ± 3°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde barındırılmıştır. Deneysel işlemler genel anestezi altında gerçekleştirilmiş; sedasyon için ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (10 mg/kg) intramüsküler uygulanmıştır. İşitme fonksiyonları ABR ve DPOAE testleri ile değerlendirilmiş, konjenital işitme kayıplı kobaylar Çalışmaya dahil edilmiştir. Kan örnekleri, anestezi altında intrakardiyak ponksiyonla alınmış ve serum Prestin ile Ribeye düzeyleri ticari ELISA kitleri ile ölçülmüştür.

Bulgular: Serum Prestin düzeyleri deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark göstermemiş, konjenital işitme kayıplı kobaylarda değerler kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, Ribeye düzeyleri kontrol grubunda daha yüksek olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır**.**

Sonuç: Bulgular, konjenital işitme kayıplı kobaylarda serum Prestin ve Ribeye düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermediğini ortaya koymuştur. Bu durum, her iki proteinin konjenital işitme kayıplarında biyobelirteç olarak kullanımının sınırlı olabileceğini, ancak edinsel ve konjenital işitme kayıplarının patofizyolojik farklarının anlaşılmasına katkı

sağladığını göstermektedir. Daha geniş kapsamlı ve çoklu biyobelirteç içeren çalışmalar bu proteinlerin rollerini netleştirebilir.

Anahtar kelimeler: Konjenital işitme kaybı, elisa testi, kobay, prestin, ribeye

Destekleyen kurum:

ABSTRACT

"Investigation of serum ribeye and prestin proteins in guinea pigs with congenital hearing loss", Trakya University, Institute of Health Sciences, Department of Biophysics, Master's Thesis, Edirne, 2025.

Background and Aim: Hearing is a complex process that occurs through the transmission of sound waves to the inner ear via the ear structures, where they are converted into neural impulses and conveyed to the cerebral cortex. The electromotility of outer hair cells in the inner ear is a key factor determining the sensitivity of this process. Prestin protein is responsible for the motility of outer hair cells and plays a crucial role in cochlear amplification. On the other hand, ribeye protein, as a major component of ribbon synapses located in inner hair cells, plays an important role in the synaptic transmission of auditory signals. Congenital hearing loss is a type of permanent hearing impairment that is present at birth or manifests within the early years of life, significantly affecting language, cognitive, and social development. Therefore, early diagnosis and intervention are crucial, and there is a need for the development of reliable biomarkers. This study aimed to evaluate the relationship of these proteins with hearing loss by measuring serum prestin and ribeye levels in guinea pigs with experimentally induced congenital hearing loss.

Material and Methods: In this study, a total of 20 young-adult Hartley guinea pigs (0–6 months old, weighing 250–650 g) were used, comprising 10 animals in the experimental group and 10 in the control group. The experimental group consisted of guinea pigs with congenital hearing loss, whereas the control group included animals with normal hearing function. The guinea pigs were housed under controlled conditions at 50% humidity and $21 \pm 3°C$, with a 12-hour light/12-hour dark cycle. All experimental procedures were performed under general anesthesia; sedation was achieved by intramuscular administration of ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg). Hearing functions were evaluated using Auditory Brainstem Response (ABR) and Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) tests, and guinea pigs diagnosed with congenital hearing loss were included in the study. Blood samples were collected via intracardiac puncture under anesthesia, and serum Prestin and Ribeye levels were measured using commercial ELISA kits.

Results: Serum Prestin levels did not show a significant difference between the experimental and control groups; however, the values were lower in guinea pigs with congenital hearing loss compared to the control group. Similarly, although Ribeye levels were higher in the control group, no statistically significant difference was observed between the groups.

Conclusion: The findings revealed that serum Prestin and Ribeye levels in guinea pigs with congenital hearing loss did not show significant changes compared to the control group. This suggests that the use of both proteins as biomarkers in congenital hearing loss may be limited;

however, it provides valuable insight into understanding the pathophysiological differences between acquired and congenital hearing loss. Larger-scale studies incorporating multiple biomarkers may help to clarify the roles of these proteins.

Keywords: Congenital hearing loss, elisa test, guinea pig, prestin, ribeye

Financial Support:

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İşitme, dış ortamdan gelen ses dalgalarının kulak yapıları vasıtasıyla iç kulağa iletilmesi sonucunda oluşan elektromekanik sinyallerin merkezi sinir sistemine aktarılmasıyla gerçekleşen duyusal süreci kapsamaktadır. İşitme fonksiyonu, özellikle kokleadaki dış tüylü hücrelerin elektromotilitesi sayesinde hassas bir biçimde düzenlenmektedir (8). Dış tüylü hücrelerde bulunan prestin proteini, hücre zarında bulunan bir motor proteindir ve ses uyarılarına karşı hücre zarının hareket etmesini sağlayarak amplifikasyonu gerçekleştirir (14).

İç kulakta bulunan ve sinaptik aktarımda görev alan ribeye proteini ise, ribbon sinapsların yapısal ve işlevsel bütünlüğünde önemli yer tutmaktadır. Ribeye proteini, özellikle duyusal sistemlerdeki sinaptik vezikül transferi ve nörotransmitter salınımının devamlılığı açısından kritik bir rol oynar (11).

Doğumdan itibaren var olan, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişen işitme kaybı türü konjenital işitme kaybı olarak adlandırılır. Dünya genelindeki her 1000 doğumdan yaklaşık 1–3' ündeki bebeklerde konjenital işitme kaybı görülmektedir (12). Bu durum bireyde dil gelişimi, akademik başarı ve sosyal gelişim açısından kalıcı izler bırakabilir. Erken tanı ve tedavi açısından güvenilirlik gösteren biyobelirteçlerin varlığı, bu kapsamda yürütülecek çalışmaların önemini arttırmaktadır.

Konjenital işitme kaybı tanısı çoğunlukla davranışsal testler ve elektrofizyolojik ölçümlere dayanmaktadır fakat bu yöntemler erken dönemde her zaman yeterli duyarlılık gösterememektedir. Özellikle noninvaziv, erken tanıya olanak tanıyacak ve güvenilir olan biyobelirteçlerin eksikliği bu alandaki önemli bir sorun teşkil etmektedir. Son yıllarda ribeye ve prestin proteinlerinin serum düzeylerinin işitme fonksiyonundaki eksiklikleri tespit etmekte önemli bir rolünün olabileceği öne sürülmektedir (9, 10). Bu proteinlerin serum düzeylerinin tespit edilebilir olup olmadıkları ve işitme kaybıyle anlamlı bir ilişki gösterip göstermediği şuan da devam eden bir araştırma konusudur.

Deneysel hayvan modelleri, özellikle kobaylar (Cavia porcellus), insanların işitme sistemine benzer özellikler gösterdiğinden ötürü bu tür biyobelirteçlerin araştırılmasında yaygın olarak tercih edilmektedir (13). Bu bağlamda, konjenital işitme kaybı tanısı olan kobay modellerinde ribeye ve prestin düzeylerinin ölçülmesi, bu proteinlerin tanısal ve prognostik açıdan etkin bir değer taşıyıp taşımadığını belirlemek oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın temel amacı, konjenital işitme kaybı oluşturulan kobaylarda serum ribeye ve prestin protein seviyelerini ölçerek, bu iki proteinin işitme kaybıyla ilişkili olup olmadığını değerlendirmektir. Araştırma hipotezleri şu şekilde belirlenmiştir:

- H_0 (Null hipotez): Konjenital işitme kayıplı kobayların serum prestin ve ribeye protein düzeyleri ile işitme kaybı arasında anlamlı bir ilişki yoktur.
- H_1 (Alternatif hipotez): Konjenital işitme kayıplı kobayların serum prestin ve ribeye protein düzeyleri, işitme kaybı ile anlamlı şekilde ilişkilidir.

Bu çalışma, prestin ve ribeye proteinlerinin biyobelirteç potansiyelini değerlendirmeyi hedef alarak, konjenital işitme kaybının erken dönemde noninvaziv yollarla tespit edilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir. Ribeye ve prestin proteinlerin serum düzeylerinde anlamlı değişiklikler tespit edildiği taktirde, bu bulgular insanlarda yapılacak olan ileriki çalışmalar için temel oluşturabilir. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin tanısal süreçlerde kullanılması durumunda, erken müdahale ve işitsel rehabilitasyon planlamaları açısından klinik değeri oldukça yüksek olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Sistemi ve Fizyolojisi

2.1.1. Kulak Yapısı ve İşlevleri

İşitme sistemi dış kulak, orta kulak ve iç kulak olmak üzere üç temel anatomik yapıdan oluşur. Dış kulak, ses dalgalarını toplayarak tympanic membrane (kulak zarı)' e iletir. Orta kulak, üç kemikçik (malleus, incus ve stapes) aracılığıyla ses titreşimlerini amplifiye eder. İç kulak ise koklea ve vestibüler yapılardan oluşur. Burada ses titreşimleri mekanoelektriksel sinyallere dönüştürülür (15).

Koklea, sıvı dolu (perilenf ve endolenf) spiral yapıdaki bir organ olup baziler membran, tectorial membran ve Corti organı gibi yapıları içermektedir. Bu yapıların birbirleriyle uyumlu bir şekilde çalışması işitme duyusunun temelini oluşturmaktadır. Özellikle Corti organı üzerindeki dış tüylü hücreler akustik bilginin algılanması ve işlemlenmesinde kritik rol oynar (16).

2.1.2. İşitme Mekanizması

İşitme, ses dalgalarının dış kulak yolu vasıtasıyla kulak zarına ulaşması sonucu iç kulak yapılarında işlemlenerek elektriksel sinyallere dönüştürülmesi sonucu oluşmaktadır. Stapes (musculus) kasının oval pencereye uyguladığı basınç, koklear sıvılarda dalgalanmalara yol açar. Oluşan dalgalanmalar sonucunda baziler membranda frekansa duyarlı titreşimler oluşur. Bu titreşimler, tüylü hücrelerin stereosilyalarının bükülmesiyle iyon kanallarını açarak reseptör (glutamat) potansiyeli oluşmasını sağlar (17).

2.1.3. İç Kulakta Dış Tüylü Hücrelerin Rolü

Dış tüylü hücreler, işitsel uyaranların frekans ayrımını ve hassasiyetini sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler, baziler membranın titreşimlerine aktif olarak yanıt verir ve bu mekanizma "koklear amplifikasyon" olarak adlandırılır (8). Dış tüylü hücrelerin motor fonksiyonu, prestin proteini aracılığıyla sağlanır. OHC'ler yalnızca mekanik tepki üretmekle kalmaz, aynı zamanda gelen ses sinyallerinin daha belirgin hale getirilmesine yardımcı olur (18).

2.1.4. Kokleanın Elektromotilitesi

Elektromotilite, dış tüylü hücrelerin elektriksel potansiyellere karşı boyutlarını hızlı bir şekilde değiştirme yeteneğidir. Prestin proteini, bu elektromotilitenin temel moleküler düzenleyicisidir. Prestin proteini, voltaj bağımlı bir anyon taşıyıcısı gibi davranarak hücre zarının mekanik özelliklerini değiştirir (19). Böylece düşük şiddetteki ses sinyallerinin bile daha etkili algılanmasını sağlar ve kokleanın frekans çözünürlüğünü arttırır.

2.2. Konjenital İşitme Kaybı

Konjenital işitme kaybı, doğum sırasında mevcut olan veya yaşamın ilk birkaç yılı içinde fark edilen kalıcı işitme kaybı türüdür. İletim tipi, sensörinöral ve miks tip olmak üzere üç başlık şeklinde sınıflandırılır. En yaygın olanı sensörinöral işitme kaybıdır ve genellikle iç kulak (inner ear) ya da işitme sinirinin (vestibulocochlear nerve) hasarına bağlıdır (20). Hafif, orta, ileri ve çok ileri derecede kayıplar şeklinde derecelendirilir.

Konjenital işitme kaybının yaklaşık olarak %50'si genetik nedenlere dayanmaktadır. Bunların içinde SLC26A4, GJB2 (connexin 26) ve OTOF gibi genlerdeki mutasyonlar öne çıkmaktadır (21). %50 ise çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Doğum öncesi (prenatal) enfeksiyonlar (sitomegalovirüs, rubella, herpes simpleks), ototoksisite, düşük doğum ağırlığı ve hiperbilirubinemi en sık rastlanan nedenler arasında yer alır (22).

2.2.1. Tanımı ve Sınıflandırılması

Konjenital işitme kaybı, doğumdan itibaren mevcut olan ve genellikle kalıcı nitelik taşıyan işitme kaybı olarak tanımlanmaktadır (37). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, konjenital işitme kaybının görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde 1–3/1000 canlı doğum, gelişmekte olan ülkelerde ise daha yüksek oranlarda bildirilmiştir (24). Konjenital işitme kayıpları, etiyolojik faktörlerine, işitme kaybının düzeyine ve etkilenen kulak yapılarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır.

Patolojik sınıflandırmaya göre, konjenital işitme kayıpları üç ana gruba ayrılır:

İletim tipinde konjenital işitme kaybı:

Dış ve orta kulakta doğuştan malformasyonlar veya atreziler nedeniyle oluşur ve genellikle cerrahi veya işitme cihazı ile düzeltilebilir (41).

Sensörinöral tipte konjenital işitme kaybı:

İç kulaktaki koklear yapıların (özellikle dış tüylü hücreler ve spiral ganglion nöronları) ya da işitsel sinir liflerinin doğuştan etkilenmesi sonucu ortaya çıkar ve en sık görülen tiptir (12).

Miks tipinde konjenital işitme kaybı:

Hem iletim hem de sensörinöral komponentleri içerir; konjenital anomalilerde nadir de olsa görülebilir.Derecelendirme açısından, işitme kayıpları hafif (26–40 dB), orta (41–55 dB), orta-ileri (56–70 dB), ileri (71–90 dB) ve çok ileri derecede (>90 dB) olarak sınıflandırılır (44). Konjenital işitme kayıplarında en sık karşılaşılan tablo, bilateral ve ileri-çok ileri derecede sensörinöral kayıptır.

2.2.2. Genetik ve Çevresel Nedenler

Konjenital işitme kayıplarının yaklaşık %50'si genetik, %25'i çevresel, geri kalan kısmı ise multifaktöriyel nedenlere bağlıdır (21, 44).

Genetik nedenler:

Genetik kökenli işitme kayıplarının %70'i nonsendromik, %30'u ise sendromik tiptedir (45). Nonsendromik işitme kayıpları, en sık otozomal resesif geçişlidir (DFNB tipi) ve bunların %50'sinden fazlası GJB2 (Connexin 26) gen mutasyonuna bağlıdır (46). Sendromik işitme kayıpları, Usher, Pendred ve Jervell-Lange-Nielsen gibi sendromlarla ilişkilidir. Bu sendromlarda işitme kaybına retina dejenerasyonu, tiroid anomalileri veya kardiyak iletim bozuklukları gibi ek sistemik bulgular eşlik eder (21). Prestin (SLC26A5) ve Otoferlin (OTOF) gibi işitme fizyolojisinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, dış tüylü hücrelerin işlevini bozarak doğuştan sensörinöral kayıplara neden olabilir (19, 47).

Çevresel nedenler:

Çevresel faktörler arasında intrauterin enfeksiyonlar, ototoksik ilaçlar, perinatal hipoksi ve hiperbilirubinemi ön plandadır. İntrauterin enfeksiyonlar (TORCH grubu); Sitomegalovirüs (CMV) konjenital işitme kayıplarının en sık çevresel nedenidir ve bilateral, progresif sensörinöral kayıplara yol açar (48). Rubella, Toxoplasma gondii ve Herpes simpleks de diğer önemli intrauterin patojenlerdir. Ototoksik ilaçlar ve bazı kemoterapötikler intrauterin veya neonatal dönemde koklear toksisiteye neden olabilir (49). Düşük doğum ağırlığı, hipoksi,

mekanik ventilasyon ve hiperbilirubinemi de sensörinöral işitme kaybı riskini artırır (50). Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi de önemlidir; örneğin, GJB2 mutasyonu taşıyan bebeklerde aminoglikozid maruziyeti işitme kaybı riskini arttırabilir (31).

2.2.3. Hayvan Modellerinde Konjenital İşitme Kaybı

İşitme kaybının patofizyolojisinin incelemesi için bazı hayvan modellerinden yaralanılmaktadır. İnsan kokleasına benzer anatomik yapıları ve işitme aralıkları nedeniyle kobaylar (Cavia porcellus), deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (21). Genetik çalışmaları veya ototoksik ilaçlarla oluşturulan işitme kaybı modelleri, biyobelirteç çalışmaları için uygun platformlar sunar.

2.3. Prestin Proteini

2.3.1. Prestin Moleküler Yapısı ve Fonksiyonu

Prestin proteini, SLC26A5 geni tarafından kodlanan ve yalnızca dış tüylü hücrelerin (OTH) lateral membranında bulunan bir motor proteindir. Yapısal olarak birden fazla transmembranlı bir anion-exchanger ailesine aittir (25). Klasik iyon taşıma fonksiyonlarından farklı olarak prestin hücre zarının gerginliğinin artmasına doğrudan katkıda bulunur ve bu da elektromotiliteyi sağlar.

2.3.2. Prestin ve İşitme İlişkisi

Prestin proteini, koklear amplifikasyonun en temel moleküler bileşenidir. Prestin proteini eksikliği durumunda, dış tüylü hücrelerin elektromotilitesi fonksiyonunu yitirir ve buna bağlı olarak işitme eşiği ciddi oranda yükselir (26). Prestin ekspresyonu; yüksek şiddette sese maruziyet ve yaşlanma gibi dış faktörlerden etkilenebilir ve bu değişiklikler işitme kaybı ile ilişkilendirilir.

2.3.3. Serumda Prestin Seviyesi Ölçümünün Biyobelirteç Olarak Kullanımı

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, prestin proteininin kokleadaki dış tüylü hücre hasarına yanıt olarak dolaşıma karışabileceğini göstermektedir. Bu da serum prestin düzeylerini, işitme kaybının biyobelirteci olarak potansiyel bir aday haline getirmiştir (27). Ölçümlerde genellikle ELISA teknikleri kullanılır fakat bu konuda standartlaşma henüz tamamlanmamıştır.

2.4. Ribeye Proteini

2.4.1 Ribbon Sinapsların Yapısı ve Ribeye'nin Rolü

Ribbon sinapslar, hızlı ve sürekli bir şekilde nörotransmitter salınımı gerektiren duyu sistemlerine özgü sinaptik yapılardır. Görme, işitme ve denge gibi hızlı sinyal iletimini gerektiren duyusal nöronlarda bulunurlar. Ribbon sinapslar; diğer sinapslardan farklı olarak presinaptik bölgede elektronca yoğun, şerit şeklindeki yapıları içerirler (11, 47).

Ribbon sinapslar, yüzlerce sinaptik keseyi aynı anda aktifleştirme kapasitesine sahiptir. Bu hızlı mobilizasyon ve salınım yeteneği, işitsel sistemde özellikle iç tüylü hücreler ile spiral ganglion nöronları arasında bulunan sinaptik iletişimde oldukça hayati önem taşır (38).

Ribbon sinapsların en önemli yapısal bileşeni ribeye olarak bilinen proteindir. Ribeye; ribonükleik asit bağlayıcı CtBP2 (C-terminal binding protein 2) geninin transkripsiyon ürünü olup, ribbon yapının iskeletini oluşturmaktadır (28). Ribeye proteini Ribeye A-domain (yalnızca ribbon sinapslara özgü) ve Ribeye B-domain (CtBP2 ile homolog) olmak üzere iki yapıdan oluşur. Bu protein, keseciklerin ribbon (şerit)'a bağlanmasında, sinaptik kese rezervuarının organize edilmesinde ve eksositozun devam etmesinde temel bir rol üstlenir.

2.4.2. Ribeye'nin İşitme Fizyolojisindeki Önemi

Ribeye proteini işitme sisteminde, özellikle kokleanın afferent sinir sisteminde görev alan iç tüylü hücrelerde yoğun olarak bulunur. İşitsel bilgi, bu hücreler aracılığıyla sinaptik veziküllerin glutamat salınımı yoluyla spiral ganglionlara iletilir. Ribbon sinapslar, bu iletişimin milisaniyeler içerisinde gerçekleşmesini sağlayarak işitme sinyallerinin kodlanmasında yüksek zamansal çözünürlük sağlar (39).

Ribeye proteininindeki herhangi bir eksiklik ya da yapısal bozukluk, sinaptik iletimin gecikmesine, nörotransmitter salınımındaki düzensizliklere ve sinyal bütünlüğünde dejenerasyona neden olmaktadır. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar, ribeye proteini eksikliği durumunda akustik bilginin işlemlenmesinde bozulmalara ve ABR (Auditory Brainstem Response) cevaplarının geciktiğini ortaya koymuştur (29). Ayrıca ribbon sinaps yapısının ribeye proteini aracılığıyla düzenlenmesi, iç tüylü hücrelerin yaşlanma ve ototoksisite gibi etkenlere karşı direnç göstermesinde de rol oynamaktadır (40).

2.4.3. Serumda Ribeye Düzeylerinin Ölçümü

Ribeye proteini normalde kokleadaki presinaptik bölgelerde lokalize olduğundan sistemik dolaşımda yer alması beklenmez. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar, sinaptik yapılar hasara uğradığında bazı presinaptik proteinlerin kan dolaşımına karışabileceğini göstermiştir. Nitekim merkezi sinir sisteminde sinaptik proteinlerin, örneğin synaptophysin ve neurogranin' in serumda tespit edildiği ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabildiği gösterilmiştir (42).

Bu bilgiler doğrultusuna, ribeye proteininin de işitsel sinaptik hasar veya ITH ve OTH hücre harabiyeti durumlarında serumda saptanabilir seviyelere ulaşabileceği öngörülmektedir. Ancak ribeye'nin periferal kanda ölçülebilir olmasına dair veriler halen sınırlıdır. Deneysel hayvan modellerinde koklear travma sonrası serumda ribeye'ye özgü antijenik yapıların ELISA benzeri tekniklerle belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmakta olup, bu protein gelecekte işitme kaybı tanısında önemli bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir (30, 43).

Özellikle koklear dejenerasyon, ototoksisite ve yaşlılığa bağlı işitme kaybı gibi klinik durumlarda ribeye düzeylerinin belirlenmesi, tanı ve izlem süreçlerine katkı sağlayabilir. Ancak bu alanda daha fazla deneysel ve klinik çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

2.5. İşitme Değerlendirme Yöntemleri

2.5.1. Auditory Brainstem Response

İşitsel uyaranlara karşı beyin sapından gelen elektriksel cevapların elektrotlar aracılığı ile kaydedildiği objektif değerlendirme yöntemi Auditory Brainstem Response (ABR) olarak adlandırılmaktadır. İşitme eşikleri, doğuştan var olan işitme kayıplarını tespit etmekte ABR değerlendirmesi ile güvenilir bir şekilde belirlenebilir (2). Yenidoğan işitme taramalarında ve hayvan modellerinde, objektif ve noninvaziv olması nedeniyle tercih edilmektedir (2).

Bu değerlendirme yöntemi; işitme siniri, beyin sapı işitsel yolaklarda meydana çıkan elektriksel potansiyelin zamana bağlı kaydını sağlayan bir elektrofizyolojik yöntemdir (1). İşitsel uyaranın kokleada oluşturduğu aksiyon potansiyellerinin işitme siniri, koklear çekirdekler (CN)), superior olivary kompleks (SOC) ve inferior kollikulus (IC) gibi santral işitme sistemini oluşturan yapılar boyunca iletimini yansıtan I-III-V. dalgalardan oluşur (4).

Test sırasında klik veya tone-burst uyaranlar kullanılır; elde edilen dalga latansları (I-III-V. dalgalar) ve amplitüd değerleri analiz edilir ve işitme eşikleri belirlenir. Hayvan modellerinde

yapılan çalışmalar, ABR değerlendirmesinin işitme kaybının derecesini ve tipinin belirlenmesinde yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir (3). Ayrıca ABR, işitme sinir liflerindeki gelişimsel anomalileri veya nöral senkronizasyon bozukluklarını ortaya koyması bakımından konjenital işitme kayıplarının patofizyolojisinin belirlenmesine katkı sağlar (32).

Konjenital işitme kayıplı kobaylarda ABR dalga latanslarının uzadığı ve işitme eşiklerinin belirgin derecede yükseldiği bildirilmiştir. Bu durum, özellikle dış tüylü hücrelerin ve işitsel sinir-lif bağlantılarının gelişimsel anomalilerden etkilendiğini göstermektedir (13).

2.5.2. Otoakustik Emisyonlar

Otoakustik Emisyonlar, dış tüylü hücrelerin işitsel uyarana verdiği yanıtların dış kulak kanalından mikrofon aracılığı ile kaydedilmesi temeline dayanır. Bu test, koklear fonksiyonun doğrudan göstergesi olup özellikle dış tüylü hücreler hakkında bilgi verir (31).

Otoakustik Emisyonlar, kokleanın özellikle dış tüylü hücrelerinden kaynaklanan ve işitsel uyarana yanıt olarak üretilen düşük şiddetteki ses enerjisinin dış kulak yolundan ölçülmesi esasına dayanır (5). Dış tüylü hücrelerin elektromotilite özelliklerinin yansıması olan otoakustik emisyon (OAE) yanıtları, kokleanın aktif mekanizmasının değerlendirilmesinde objektif bir test yöntemi olarak kullanılmaktadır (8).

Konjenital işitme kayıplarının büyük bir bölümünde, dış tüylü hücre hasarı ya da yapısal anomaliler bulunduğundan, OAE testleri koklear düzeydeki işitme bozukluklarının erken tespitinde kritik bir öneme sahiptir (6). Dış tüylü hücre fonksiyonlarının intakt olduğu durumlarda emisyon yanıtları alınırken, hücre kaybı ya da işlevsel bozuklukların varlığında emisyon yanıtları kaybolur veya belirgin bir şekilde azalır (7).

Hayvan modellerinde, özellikle Distortion Product Otoacoustic Emission (DPOAE) yanıtları, dış tüylü hücre fonksiyonlarını frekansa spesifik olarak değerlendirilmesinde tercih edilmektedir. DPOAE ölçümleri, farklı frekans bantlarında koklear amplifikasyon mekanizması hakkında bilgi verir. Konjenital işitme kayıplarında DPOAE yanıtlarının alınaması, dış tüylü hücre hasarını destekler niteliktedir (40).

Otoakustik emisyonlar ABR ile birlikte değerlendirildiğinde, işitme kaybının koklear ya da retro-koklear kökenli olup olmadığının tespitinde yüksek olasılıkla doğruluk sağlar. Koklear hasara bağlı işitme kayıplarında OAE yanıtlarının alınamaması, ancak ABR yanıtlarının kısmen alınması sık görülen bir bulgudur (10).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

"Konjenital İşitme Kayıplı Kobayların Serum Ribeye ve Prestin Proteinlerinin Araştırılması" adlı tezimiz için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuru yapıldı.

Bu çalışmada, her biri 10 kobaydan oluşan deney ve kontrol grupları olmak üzere toplamda 20 adet kobay kullanıldı. Örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde, benzer diğer çalışmalarda kullanılan deney hayvanı sayıları, deneysel tasarımın yapısı, biyolojik değişkenliğin sınırlı olması ve etik bir şekilde hayvan kullanımı ilkeleri göz önünde bulundurudu. Tez çalışmamız, deney hayvanı çalışmalarında yaygın olarak kabul görmüş "en az hayvanla, en yüksek bilimsel geçerliliğe ulaşma" ilkesine uygun olarak tasarlandı. Örneklem sayısı; gruplar arası karşılaştırmalarda beklenen etki büyüklüğü, varyans tahmini, anlamlılık düzeyi ($\alpha = 0.05$) ve %80 istatistiksel güç (power) esas alınarak belirlenmiştir. Ancak çalışmanın temel amacı, işitme kaybının tespitinde biyobelirteçlerin kullanılabilirliğini değerlendirmek olduğundan, örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde pilot çalışma protokolleri ile benzer içerikteki hayvan model araştırmaları da dikkate alındı. Hayvan refahı ve etik kurallar çerçevesinde hareket edilerek, 3R ilkelerinden biri olan Reduction (azaltma) ilkesine bağlı kalınarak, mümkün olan en az sayıda hayvan kullanılarak en yüksek düzeyde bilimsel veri elde edilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda, konjenital işitme kaybı oluşturulan 10 kobay ve normal işitme fonksiyonuna sahip 10 kobay olmak üzere toplam 20 kobayla yürütülen çalışma, hem istatistiksel anlamlılık kriterlerini karşılayacak hem de elde edilen biyolojik verilerin yorumlanabilirliğini sağlayacak şekilde tasarlandı.

Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 02.09.2024 tarihli toplantısı sonucu alınan, 2024/08 sayılı ve TÜHADYEK 2023/19 kodlu karar sonucunda "Konjenital İşitme Kayıplı Kobaylarda Serum Ribeye ve Prestin Miktarlarının Araştırılması" isimli tezimiz için çalışmamıza onay verildi (EK 1).

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nde üretilen, 0–6 aylık yaş aralığında ve 250–650 gram ağırlığında değişen, toplam 20 adet (40 kulak) Hartley cinsi pigmente genç-erişkin kobay (Guinea pig) kullanıldı. Kobaylar, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsüne sahip bir çevrede, %50 bağıl nem oranı ve 21±3°C sıcaklıkta standart

laboratuvar koşullarında barındırıldı. Hayvanlar pelet yem ve C vitamini takviyesi ile beslendi.

Deneysel işlemler, genel anestezi altında gerçekleştirildi. Anestezi ve sedasyon protokolü kapsamında, kobaylara 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar ampul, Pfizer, İstanbul) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rhompun flakon, Bayer, İstanbul) intramüsküler (IM) yolla uygulandı. Gerekli görülen durumlarda, anestezinin tekrarı için ilk dozun üçte biri kadar ketamin hidroklorür, intraperitoneal (IP) yolla yeniden verildi.

Kullanılan hayvan sayısı, "en az sayıda hayvanla geçerli bilimsel veri elde etme" ilkesi doğrultusunda, çalışmanın yürütülmesi ve tamamlanması için yeterli olacak şekilde power analizi ile belirlendi. Elektrofizyolojik test sonuçlarına göre konjenital işitme kaybı saptanan kobaylar, deney grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Toplam 20 kobay üzerinde; dış kulak yolu anatomisi, orta kulak fonksiyonları, dış tüylü hücre aktivitesi ve merkezi işitme yolları objektif test yöntemleri ile değerlendirildi ve işitme kaybı varlığı araştırıldı. Çalışma elektrofizyolojik ölçümler, histopatolojik değerlendirmeler, moleküler analizler olmak üzere üç ana aşamadan oluştu.

Elektrofizyolojik testler sonucunda işitme fonksiyonu normal olarak değerlendirilen 10 kobay (20 kulak), rastgele yöntemle her biri 5 hayvandan oluşan iki alt gruba ayrıldı:

- Grup 1 (10 kulak): Deney grubu
- Grup 2 (10 kulak): Kontrol grubu

Her iki gruptaki kobaylardan, yüksek doz ketamin ve ksilazin anestezisi altında intrakardiyak ponksiyon yöntemi ile kan örnekleri alındı. Elde edilen serum örneklerinde prestin ve ribeye protein düzeyleri ELISA yöntemi ile kantitatif olarak analiz edildi. Tüm araştırma protokolü, planlanan üç aşamalı yapı kapsamında sistematik olarak yürütüldü.

3.2.Elektrofizyolojik Ölçümler

3.2.1. İşitsel Beyinsapı Yanıtlarının Analizi

İşitsel beyinsapı cevaplarının değerlendirilmesinde, IHS SmartEP System (Intelligent Hearing Systems, Miami, FL) cihazı kullanıldı. Kobayların dış kulak kanallarına, alçak frekans ölçümleri için EAR Tone 3A ve yüksek frekans ölçümleri için insert kulaklık tüpleri yerleştirildi. Elektrot yerleşimi, test edilen kulağın mastoid bölgesine negatif, alın bölgesine

pozitif ve kontralateral arka ayak bölgesine toprak elektrot olacak şekilde uygulandı. Uyarılar saniyede 11 tekrar hızında olacak şekilde klik ve tone burst formatında verildi ve her biri 300 cevabın ortalaması alınarak analiz yapıldı. İşitme eşiği belirlenirken, 80 dB SPL'den başlanarak descending-ascending metodu ile ölçüm yapıldı.

3.2.2 Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Ölçümü

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon ölçümleri, IHS SmartDPOAE (Miami, FL) sistemi ve uyumlu transdüserler kullanılarak gerçekleştirildi. Kobayların dış kulak yoluna ER10B+ prob mikrofon ve uygun prob uçları yerleştirildi. Düşük ve yüksek frekans aralıklarındaki otoakustik emisyon yanıtları bu düzenekle kaydedildi. Ses basınç seviyesi (SPL), ER10B+ mikrofon ve Smart DPOAE System version 4.53 (IHS) ile ölçüldü. Uyaran frekansları f1 ve f2 olmak üzere dengeli şekilde ayarlandı. Ölçümlerde 2f1–f2 formatındaki kübik distorsiyon ürünleri dikkate alındı ve 6 dB SPL ve üzerindeki sinyal-gürültü oranı (SNR) değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Tüm testler, çevresel gürültünün 50 dBA'yı aşmadığı, kontrollü sessiz bir laboratuvar ortamında gerçekleştirildi.

3.3 Histopatolojik Değerlendirmeler

Moleküler analizler öncesinde, her kobay için elektrofizyolojik testler tamamlandıktan sonra kafa kemiklerinin disseksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Kafa kemiklerinin disseksiyonunda, koklear yapıların açığa çıkarılması amacıyla arka kafa bölgesinden yanal doğrultuda bir kesi yapıldı ve yanal skuamöz parça uzaklaştırıldı. Dış kulak yolunun timpanik halkadan ayrılması için ek bir kesi uygulandı. Kemik zarının altında yer alan yanal kemiğin mastoid ve bulla kısımları açığa çıkarıldı. Mastoid bölge oksipital kemikten, skuamöz bölüm parietal, frontal, palatin ve etmoid kemiklerden, bulla bölgesi oksipital ve sfenoid kemiklerden, petröz yapı ise sfenoid kemikten dikkatlice disseke edildi.

VII. ve VIII. kranial sinirlerin dış yanal kısımları ayrıldıktan sonra yanal kemik çevresindeki kas dokuları da kesilerek yapı kafatasından ayrıldı. Tüm kobaylardan elde edilen iç kulak dokuları, iç ve dış tüylü hücrelerin stereosilya yapıları, spiral ganglion hücreleri ve stria vaskülaris damarlanması yönünden ışık mikroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmek üzere işlem gördü.

3.3.1 Işık Mikroskobu İncelemesi

Yanal kemik ile birlikte çıkarılan iç kulak örnekleri, %10 formaldehit çözeltisinde 24 saat boyunca fikse edildi. Ardından, numuneler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Kalsifik yapının uzaklaştırılması amacıyla, bazik pH'da (7.4) hazırlanmış 0.1 M EDTA çözeltisinde doku örnekleri inkübe edildi. EDTA işleminden sonra PBS ile yeniden yıkanan örneklerden iç kulak dokusu ayrıldı ve tekrar %10 formaldehit içerisinde 24 saat fikse edildi. Bu fikse sürecinin ardından doku örnekleri artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildi, toluol ile temizlendi ve ardından parafinle bloklanarak kesit hazırlığı tamamlandı.

Parafin bloklarından alınan 5 mikrometrelik (µm) kesitlere Hematoksilen-Eosin (H-E) boyama uygulandı. Boyama öncesinde kesitler, parafinin uzaklaştırılması için toluol ile işlendi ve ardından sırasıyla %100, %96, %90 ve %70'lik alkol serilerinden geçirilerek sulu ortama indirildi. Kesitler 10 dakika süreyle Mayer's hematoksilen ile boyandıktan sonra, morartma işlemi için akan çeşme suyu altında bekletildi. Takiben, 1 dakika süreyle Eosin boyası uygulandı. Dehidrasyon işlemi; artan derecelerde alkol serilerinden geçirilerek yapıldı ve kesitler son olarak toluol ile temizlendikten sonra Entellan ile kaplanarak kalıcı preparatlar hazırlandı.

3.3.2. TUNEL Metodu

Konjenital işitme kaybı oluşturulan kobaylara ait koklea dokularında hücre ölümü değerlendirmesi, Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, 5 µm kalınlığında hazırlanan parafin doku kesitleri üzerine ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit protokolü uygulandı.

Kesitler öncelikle deparafinizasyon işleminden geçirildi ve ardından Proteinaz K ile inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük H_2O_2 çözeltisi ile muamele edilen kesitler, ardından oda sıcaklığında dengeleme tamponu içinde 30 dakika bekletildi.

Digoksigenin işaretli dUTP kuyruklarının bağlanmasını sağlamak amacıyla, kesitler 37 °C'de 1 saat boyunca terminal deoksinükleotidil transferaz enzim solüsyonu ile inkübe edildi. Sonrasında kesitler, durdurma/yıkama tamponu ile 10 dakika yıkandı.

Antidigoksigenin peroksidaz antikor ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen kesitler, peroksidaz substratı olarak DAB ile işaretlendi. Zıt boyama için hematoksilen

kullanıldı. Bu işlemler sonucunda nükleusu koyu kahverengi ile boyanan hücreler TUNEL pozitif olarak değerlendirildi.

3.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Çalışmamızda, konjenital işitme kaybı oluşturulan deney grubu ile işitmesi normal olan kontrol grubuna ait koklear doku örneklerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. İncelemeler için hazırlanan 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler, 56 °C'de bir gece boyunca bekletildi. Takiben, toluol ile deparafinizasyon işlemi uygulandı ve kesitler azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi.

Antijen geri kazanımı amacıyla kesitler, 10 mM sitrat tamponu (pH 6.0) içinde 15 dakika kaynatıldı ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için kesitler, %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi içinde 15 dakika inkübe edildi. Spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe özgü bloklama solüsyonu (Invitrogen, Carlsbad, ABD) ile 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.

İmmün boyama aşamasında, antikor dilüe etme solüsyonu (Invitrogen) ile hazırlanmış tavşan poliklonal anti-VEGF antikoru ile kesitler oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. Negatif kontrol gruplarında ise primer antikor yerine yalnızca antikor dilüe etme solüsyonu uygulandı. Primer antikora karşı biyotinle işaretlenmiş sekonder antikor ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve ardından kesitler HRP-streptavidin ile muamele edildi.

Kromojen reaksiyonu için 3,3-diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zıt boyama amacıyla hematoksilen uygulandı. Ardından, kesitler artan derişimdeki alkol serilerinden geçirildi, toluol ile muamele edildi ve entellan ile daimi preparat haline getirildi.

Hazırlanan preparatlar Olympus BX-51 marka araştırma mikroskobu ile incelendi ve dijital olarak fotoğraflandı. VEGF immünreaktivitesi; zayıf, orta ve şiddetli olmak üzere üç düzeyde sınıflandırıldı. Tüm değerlendirmeler, preparatların hangi gruba ait olduğunu bilen ve bilmeyen iki bağımsız araştırmacı tarafından, X200 objektif büyütmesinde gerçekleştirildi.

3.3.4. Tarama Elektron Mikroskobisi – Ultrastruktürel Değerlendirme

Elektrofizyolojik testler tamamlandıktan sonra kobaylara yüksek doz Tiopental sodyum enjeksiyonu uygulanarak dekapitasyon işlemi gerçekleştirildi ve kafa kemikleri çıkarıldı. Diseksiyon öncesinde, fiksasyon amacıyla orta kulak boşluğuna veya timpanik kaviteye %2,5'lik glutaraldehit enjeksiyonu yapıldı. Kafa kemiklerinin kesilmesini takiben timpanik kemikler çıkarıldı ve iç kulak yapısına ulaşıldı. Elde edilen doku örnekleri, pH'sı 7,4 olacak şekilde hazırlanmış %2,5 glutaraldehit içeren fosfat tamponu içerisinde 12 saat boyunca prefiksasyon işlemine tabi tutuldu.

Prefiksasyonu takiben, kemik dokular fosfat tamponu içerisinde bir gün süreyle bekletildi ve ardından pH'sı 7,4 olan 0,1 M Na-EDTA (Sigma, Germany) solüsyonunda, oda sıcaklığında iki hafta boyunca dekalsifiye edildi. Kafa kemiğinde kokleaya ulaşım şekline göre bu yöntemin doku bütünlüğünü daha iyi koruduğu gözlendi. Kalsiyum uzaklaştırma işleminin ardından, koklear materyal, otik kapsülle çevrili olduğundan, bu kapsül stereo mikroskop (Olympus 1x71 S8-F3, Japan) yardımıyla bazalden apekse doğru, simetrik olmayan şekilde disseke edildi. Elde edilen yapılar, 72 saat boyunca +4 °C'de fosfat tamponu içinde bekletilerek rutin SEM işlemleri için hazır hâle getirildi. SEM incelemelerinde, Korti organının yüzey anatomisi detaylı şekilde değerlendirildi. Bu incelemelerde, genel hücre morfolojisi ile iç ve dış tüylü hücrelerin stereosilya yapıları, koklear frekans bandları boyunca bazalden apekse doğru analiz edildi. Bu sayede, konjenital işitme kaybının iç kulak düzeyindeki ultrastruktürel etkileri ortaya kondu.

3.3.5 Antioksidan Kapasite Ölçümü

Koklear yapıların değerlendirilmesi öncesinde, elektrofizyolojik testler tamamlandıktan sonra kobaylara yüksek doz Tiopental sodyum enjeksiyonu uygulanarak dekapitasyon işlemi gerçekleştirildi ve kafa kemikleri çıkarıldı. Fiksasyon amacıyla, çıkarılan kafa kemiklerine %2,5'lik glutaraldehit enjekte edildi. Ardından, kafa kemiklerinin disseksiyonu yapılarak koklear yapılara ulaşıldı. Elde edilen koklear yapılar, pH'sı 7,4 olarak ayarlanan %2,5 glutaraldehit içeren fosfat tamponunda 12 saat süreyle prefiksasyon işlemine tabi tutuldu.

Prefiksasyonun ardından, kemik dokular bir gün süreyle fosfat tamponunda bekletildi ve sonrasında pH'sı 7,4 olan 0,1 M Na-EDTA solüsyonunda, oda sıcaklığında iki hafta boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işlemini takiben, koklear materyal otik kapsülle

çevrili olduğundan, bu yapı stereo mikroskop yardımıyla disseke edildi. Elde edilen dokular, 72 saat boyunca +4 °C'de fosfat tamponunda bekletilerek SEM incelemeleri için hazırlandı.

Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) analizlerinde Korti organının yüzey anatomisi incelendi; bu kapsamda, hücre morfolojisi ile iç ve dış tüylü hücre stereosilya yapıları koklear frekans bandlarında bazalden apekse doğru detaylı biçimde değerlendirildi.

Antioksidan kapasite analizleri için göğüs ön duvarı insizyonla açılarak kalp bölgesine ulaşıldı ve sol ventrikülden en az 1 cc'lik kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri, +4 °C'de çalışan soğutmalı santrifüjde, 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serumlarda toplam antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri, spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü. Elde edilen değerler, istatistiksel analiz ile deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

Bu prosedür sayesinde, konjenital işitme kaybının serum antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiş oldu.

3.3.6 iNOS, p53 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Değerlendirmeleri

Konjenital işitme kayıplı ve işitmesi normal olan kobaylarda, koklear düzeyde meydana gelen hücresel değişikliklerin belirlenmesi amacıyla iNOS, p53 ve COX-2 immünohistokimyasal değerlendirmeleri gerçekleştirildi.

Elektrofizyolojik testlerin ardından kobaylara yüksek doz anestezik ajan uygulanarak dekapitasyon yapıldı ve kafa kemikleri çıkarıldı. Kafa kemiklerinden otik kapsüller küçük kesilerle ayrıldı ve numuneler sabitlenmek üzere fiksatif solüsyon içerisinde bekletildi. Sabitlenen doku örneklerinde kalsiyum uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi ve ardından rutin ışık mikroskobu takip protokolü uygulandı.

Takip işlemlerinin ardından, koklear yapılar orta modiolar eksende asimetrik olarak disseke edildi ve elde edilen dokular parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan alınan kesitler, hematoksilen-eozin (H&E) ile boyandı. Boyanmış kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi ve fotoğrafları alındı.

İmmünohistokimyasal analiz kapsamında iNOS ve COX-2 antikorları ile yapılan boyamalar yarı kantitatif ölçekte derecelendirildi. Boyanmanın şiddeti ve pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesi dikkate alınarak immüno boyama skoru oluşturuldu. p53 proteini için

yapılan değerlendirmelerde, nükleer düzeyde pozitif boyanma gösteren hücreler saptandı ve bu hücreler pozitif olarak kabul edildi.

Bu analizler sonucunda, konjenital işitme kaybının koklear dokularda oluşturduğu inflamatuar ve hücresel stres yanıtlarının iNOS, p53 ve COX-2 düzeylerindeki değişimlerle ilişkili olduğu ortaya kondu.

3.4 Serum Prestin ve Ribeye Düzeylerinin Ölçümü

Bu tez çalışmasında, konjenital işitme kaybı olan ve normal işitmeye sahip kobaylarda serum Prestin ve Ribeye düzeylerini belirlemek amacıyla enzim bağlı immünsorbent analiz (ELISA) yöntemi kullanıldı.

- Kan Örneği Toplanması: Kobaylardan alınan kan örnekleri, yüksek doz anestezi altında kardiyak ponksiyon yoluyla alındı. Alınan kanlar serum ayırıcı tüplere aktarıldı ve pıhtılaşma için oda sıcaklığında iki saat ya da 2–8°C'de uygun süre boyunca bekletildi.
- Serumun Elde Edilmesi ve Saklanması: Bekletilen kan numuneleri 3.000 G'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Elde edilen serumlar, steril pipet yardımıyla ayrılarak -80°C'de muhafaza edildi. Numunelerin yalnızca bir kez dondurulup çözdürülmesine özen gösterildi; tekrar eden donma-çözülme döngülerinden kaçınıldı.
- ELISA Yöntemiyle Analiz: Serum Prestin ve Ribeye düzeylerini ölçmek için MyBioSource firmasına ait MBS282125 ve MBS290178 ELISA kitleri (Guinea pig; MyBioSource, San Diego, CA) kullanıldı. Bu kitler sırasıyla Prestin için SLC26A5 ve Ribeye için CtBP2 antijenlerini saptamaya yönelik olarak geliştirilmiş mikroplaka esaslı test sistemleridir.
- Testin Uygulanması: İlk olarak kitin talimatlarına uygun şekilde standartlar ve serum numuneleri mikroplaka kuyucuklarına pipetle aktarıldı. SLC26A5 ve CtBP2 antijenlerine özgü kaplanmış antikorlar ile reaksiyona giren örneklerde bağlanmamış maddeler yıkama tamponu ile uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyulara biyotin konjuge edilmiş sekonder antikorlar eklendi ve yeniden yıkama işlemi yapıldı. Takiben, streptavidin-konjuge peroksidaz enzimi eklendi ve tekrar yıkandı. Reaksiyonun

devamı için substrat solüsyonu ilave edildi ve renk değişimi gözlendi. Renk gelişimi durdurularak optik yoğunluk (OD) değerleri spektrofotometre ile 450 nm'de ölçüldü.

- Veri Analizi: Standart eğri oluşturularak her bir örneğin optik yoğunluğu karşılaştırıldı ve Prestin ile Ribeye düzeyleri pg/mL cinsinden belirlendi. Elde edilen bu biyokimyasal veriler, konjenital işitme kaybı ile ilişkili moleküler düzeydeki değişiklikleri ortaya koymak amacıyla değerlendirildi.

3.5 İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında konjenital işitme kaybının moleküler belirteçler aracılığıyla değerlendirilmesini amaçlayan model oluşturulmuş ve çalışmada kullanılacak hayvan sayısı Power analizi yöntemiyle belirlenmişti. Power analizi, istatistiksel sonuçların güvenilirliğini artırmak ve örneklem büyüklüğünün yeterli düzeyde olmasını sağlamak amacıyla kullanıldı. Literatürde yer alan benzer hayvan modeli çalışmalarında rapor edilen DPOAE sinyal-gürültü oranı (SNR) değerleri ile ABR işitme eşik değerleri arasındaki varyasyonlar dikkate alınarak etki büyüklüğü (effect size) hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda etki büyüklüğü $d = 0.726$ olarak belirlendi.

Ardından, $\alpha = 0.01$ anlamlılık düzeyinde ve %95 istatistiksel güç ile çalışmanın yürütülebilmesi için her grupta en az sekiz kobayın yer alması gerektiği saptandı. Bu hesaplamaya göre minimum örneklem büyüklüğü belirlenmiş ve çalışma 10 konjenital işitme kayıplı ile 10 normal işitmeye sahip olmak üzere toplam 20 kobayla yürütüldü.

Elde edilen parametrelerin grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarında, verilerin dağılım özelliklerine bağlı olarak parametrik analizlerde tekrarlayan ölçümlerde t - testi, parametrik olmayan koşullarda ise Mann-Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Bu değerin altındaki p değerleri, elde edilen farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi.

4. BULGULAR

Konjenital işitme kayıplı kobayla ve normal işitmeye sahip kontrol grubunun prestin seviyeleri Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1 Deney ve kontrol grubu serum prestin seviyeleri

Grup	**Ortalama (pg/ml)**	**Standart Sapma**	**n**	**Min – Max (pg/ml)**	**t-testi p-değeri**	**Mann-Whitney U p-değeri**
Deney Grubu	152.95	25.14	10	120.0-165.7	0.412	0.662*
Kontrol Grubu	160.34	21.62	10	148.0-167.0		

*Bağımsız Örneklem t- Testi

*Mann Whitney U Testi

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek amacıyla yapılan bağımsız örneklem t-testi sonucunda $p = 0.412$ değeri elde edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Ayrıca, parametrik olmayan karşılaştırma yöntemi olarak uygulanan Mann-Whitney U testi sonucunda $p = 0.662$ değeri bulundu ve bu sonuç da prestin düzeyleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Tablo 4.2 Deney ve kontrol grubu serum ribeye seviyeleri

Grup	Ortalama + Standart Sapma (SS) pg/ml	Min–Maks (pg/ml	n	t-testi p-değeri	Mann-Whitney U p-değeri
Deney Grubu	32.72 ± 8.65	20.1 – 48.3	10	0.599	0.662*
Kontrol Grubu	39.12 ± 9.18	2.36 – 5.24	10		

*Bağımsız Örneklem t- Testi

*Mann Whitney U Testi

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek amacıyla yapılan bağımsız örneklem t-testi sonucunda p = 0.599, Mann-Whitney U testi sonucunda ise p = 0.662 değeri elde edildi. Her iki testte de p değerinin 0.05'ten büyük olması, ribeye düzeyleri açısından deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

4.1. Gruplar Arası Karşılaştırmalar

Deney ve kontrol gruplarındaserum prestin ve ribeye seviyeleri karşılaştırıldığında, her iki parametrede de kontrol grubunda ortalama değerlerin deney grubuna oranla daha yüksek olduğu saptandı. Prestin düzeyi kontrol grubunda ortalama 160.34 ± 21.62 pg/ml, deney grubunda ise 152.95 ± 25.14 pg/ml olarak belirlendi. Ribeye seviyeleri ise kontrol grubunda 39.12 ± 9.18 pg/ml, deney grubunda 32.72 ± 8.65 pg/ml olarak ölçüldü.

Bununla birlikte, her iki parametrede de gruplar arasında gözlenen bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Bu sonuçlar doğrultusunda, konjenital işitme kaybının serum prestin ve ribeye düzeyleri üzerinde belirgin bir farklılığa yol açmadığını düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, konjenital işitme kaybı modeline sahip kobaylarda serum Ribeye ve Prestin seviyelerini inceleyerek, bu proteinlerin işitme kayıplarında biyobelirteç olarak kullanım potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Elde edilen bulgular, konjenital işitme kaybı modelinde serum Prestin ve Ribeye düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermediğini ortaya koymuştur. Böylece, bu iki proteinin konjenital işitme kayıplarında biyobelirteç olarak kullanımının sınırlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma, özellikle konjenital işitme kayıplarına odaklanması açısından literatüre özgün bir katkı sunmaktadır. Mevcut literatürde Prestin düzeyleri çoğunlukla gürültüye bağlı veya ototoksik ajanlara maruz kalan sensörinöral işitme kaybı modellerinde incelenmiştir. Gürültüye bağlı işitme kaybı olan bireylerde ve hayvan modellerinde, serum Prestin düzeylerinde belirgin artışlar bildirilmiştir (9, 51). Bunun başlıca nedeni olarak, gürültü ya da toksik ajanların dış tüylü hücrelerde ani hücre ölümüne yol açması ve Prestin proteininin hücre membranından kana salınması gösterilmektedir (27). Ancak konjenital işitme kayıpları genetik ya da gelişimsel kökenli olduğu için dış tüylü hücreler doğuştan işlevsizdir veya sayıca azalmıştır. Prestin'in membrana bağlı bir protein olduğunu ve gelişimsel bozukluklarda membran yıkımının sınırlı olması nedeniyle serum düzeylerinde belirgin artış beklenmediğini ifade edilmiştir (11). Çalışmamızın bulguları, bu literatür bilgileri ile uyumlu olarak, konjenital kayıplarda serum Prestin düzeyinin değişmediğini göstermektedir.

Ribeye proteini açısından literatürde serum düzeylerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ribeye, iç kulaktaki ribbon sinapsların yapısal bütünlüğünde önemli bir rol oynayan bir proteindir ve eksikliği işitme sinyallerinin sinaptik iletiminde bozulmalara yol açmaktadır (28, 29). Zebrafish modellerinde Ribeye eksikliğinin işitme sinyali iletimini bozduğunu ancak bu değişimin serum düzeylerine yansımadığı belirtilmiştir (40). Çalışmamızın bulguları da benzer şekilde, konjenital işitme kayıplı kobaylarda Ribeye düzeylerinin serumda anlamlı bir değişim göstermediğini ortaya koymuştur. Bu durum, Ribeye'nin çoğunlukla sinaptik bölgede lokalize olması ve serumda saptanabilir düzeyde salınım göstermemesi ile açıklanabilir.

Bu araştırmanın en güçlü yönü, konjenital işitme kaybı modelinde Prestin ve Ribeye düzeylerinin birlikte değerlendirilmiş olması ve serum biyobelirteç potansiyellerinin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesidir. Bununla birlikte, bazı sınırlılıklar bulunmaktadır.

Çalışmada her grupta yalnızca 10 kobay kullanılmış olması, sonuçların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Ayrıca kesitsel bir tasarım benimsenmiş olup, biyobelirteç düzeylerinin zaman içindeki değişimlerini ortaya koyabilecek longitudinal ölçümler yapılmamıştır. Prestin ve Ribeye dışında işitme kaybı fizyopatolojisinde rol alan Otoferlin, Sox2 ve CaV1.3 gibi diğer moleküllerin de incelenmemiş olması, moleküler düzeyde daha geniş bir perspektif sunulmasını engellemiştir.

Elde edilen bulgular, konjenital işitme kaybının moleküler patofizyolojisinin edinsel işitme kayıplarından belirgin farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Prestin ve Ribeye düzeylerinin anlamlı değişim göstermemesi, bu proteinlerin konjenital kayıplarda serum biyobelirteci olarak sınırlı bir değer taşıdığını, ancak dış tüylü hücre ve sinaptik ribbon fonksiyonlarını yansıtan histopatolojik çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde daha açıklayıcı olabileceğini göstermektedir.

Gelecek çalışmalarda, daha geniş örneklemli ve farklı yaş gruplarını içeren longitudinal tasarımlar önerilmektedir. Ayrıca Prestin, Ribeye, Otoferlin ve Sox2 gibi moleküllerin aynı anda değerlendirileceği çoklu biyobelirteç panel analizleri yapılmalı ve elde edilen moleküler veriler iç kulak histopatolojisi ile korele edilmelidir. Bu tür çalışmalar, konjenital ve edinsel işitme kayıpları arasındaki patofizyolojik farklılıkların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma, konjenital işitme kayıplarında serum Ribeye ve Prestin seviyelerinin biyobelirteç olarak tek başına yeterli olmadığını ortaya koymuş, ancak konjenital işitme kayıplarının moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayarak bu alandaki ileri araştırmalar için temel oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

1. Hood LJ. Clinical applications of the auditory brainstem response. San Diego: Singular Publishing Group; 1998. 1-50.
2. Hall JW. New handbook of auditory evoked responses. Boston: Pearson Education; 2007. 215-400.
3. Burkard RF, Don M, Eggermont JJ. Auditory evoked potentials: Basic principles and clinical application. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 231-84.
4. Picton TW. Human auditory evoked potentials. San Diego: Plural Publishing; 2010. 213-46.
5. Kemp DT. Otoacoustic emissions: Basic facts and applications. Audiology in Practice. 2002;Spring:16-22.
6. Lonsbury-Martin BL, Martin GK. Evoked otoacoustic emissions as objective screeners: Application in pediatric hearing screening. Ear Hear. 2000;21:264-76. doi:10.1097/00003446-200006000-00002.
7. Harris FP, Probst R. Repeatability and reliability of transiently evoked otoacoustic emissions. Ear Hear. 1990;11:105-112. doi:10.1097/00003446-199004000-00004.
8. Ashmore J. Cochlear outer hair cell motility. Physiol Rev. 2008;88:173-210. doi:10.1152/physrev.00037.2006.
9. Borkholder DA, Zhu X, Yan X, Domenech VT. Serum prestin as a biomarker for outer hair cell damage in noise-induced hearing loss. Hear Res. 2014;312:26-33. doi:10.1016/j.heares.2014.02.002.
10. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. J Neurosci. 2009;29:14077-85. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.
11. Matthews G, Fuchs P. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. Nat Rev Neurosci. 2010;11:812-822. doi:10.1038/nrn2937.
12. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a silent revolution. N Engl J Med. 2006;354:2151-64. doi:10.1056/NEJMra050700.

13. Prosen CA, Dallos P, Cheatham MA, Peters J. Frequency mapping of the cochlea in the guinea pig. Hear Res. 1978;1:15-28. doi:10.1016/0378-5955(78)90020-0.

14. Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J, et al. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*. 2002;419:300-04. doi:10.1038/nature01059.

15. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. Neuroscience. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2012. 315-40.

16. Hudspeth AJ. How the ear's works work. Nature. 1989;341:397-404. doi:10.1038/341397a0.

17. Robles L, Ruggero MA. Mechanics of the mammalian cochlea. Physiol Rev. 2001;81:1305-52. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1305.

18. Dallos P. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. Curr Opin Neurobiol. 2008;18:370-76. doi:10.1016/j.conb.2008.09.001.

19. Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P, et al. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature.* 2000;405:149-55. doi:10.1038/35012134.

20. Korver AMH, Smith RJH, Van Camp G, et al. Congenital hearing loss. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:16094. doi:10.1038/nrdp.2016.94.

21. Smith RJH, Bale JF, White KR. Sensorineural hearing loss in children. Lancet. 2005;365:879-90. doi:10.1016/S0140-6736(05)71047-3.

22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Identifying infants with hearing loss—United States, 1999–2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010;59:220-23.

23. Henry KR, Chole RA. Genotypic differences in behavioral, physiological and anatomical expressions of age-related hearing loss in the laboratory mouse. Audiology. 1980;19:369-83. doi:10.3109/00206098009070082.

24. World Health Organization (WHO). World report on hearing. Geneva: WHO; 2021. 14-15.

25. Oliver D, Fakler B. Prestin and the cochlear amplifier. Curr Opin Neurobiol. 2001;11:437-42. doi:10.1016/S0959-4388(00)00233-0.

26. Cheatham MA, Dallos P, Zheng J. Prestin and the cochlear amplifier. J Physiol. 2004;576:59-64. doi:10.1113/jphysiol.2004.072678.

27. Parham K, Dyhrfjeld-Johnsen J, Sun W. Outer hair cell protein prestin as a potential marker of cochlear damage. Audiol Neurotol. 2011;16:112-20. doi:10.1159/000315162.

28. Matsuda K, Cho Y, Kimura T, Nakanishi T, Ohyama T, Shibata S, et al. Prestin is indispensable for hearing in mice. Neurosci Lett. 2004;367:295-98. doi:10.1016/j.neulet.2004.06.048.

29. Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J, et al. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. J Neurosci. 2002;22:9659-70. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-22-09659.2002.

30. Liberman MC, Zuo J, Guinan JJ Jr. Otoacoustic emissions without somatic motility: Can stereocilia mechanics drive the cochlear amplifier? J Acoust Soc Am. 2004;116:1649-55. doi:10.1121/1.1784446.

31. Fettiplace R, Hackney CM. The sensory and motor roles of auditory hair cells. In: Shepherd GM, editor. The Synaptic Organization of the Brain. 5th ed. New York: Oxford University Press; 2004. 16-23. doi:10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0002.

32. Boettcher FA. Presbyacusis and the auditory brainstem response. J Speech Lang Hear Res. 2002;45:1249-61. doi:10.1044/1092-4388(2002/100).

33. Buerkle H, Martin E. Blood sampling in laboratory animals. In: National Research Council (U.S.). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2015:142-61.

34. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin Chem. 2005;51:2415-18. doi:10.1373/clinchem.2005.051979.

35. National Research Council (U.S.). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011. 17-50.

36. Ryan AF, Woolley SM. The role of the cochlea in the development of auditory temporal processing. Curr Opin Neurobiol. 2016;40:115-21. doi:10.1016/j.conb.2016.06.005.

37. Taylor RR, Nevill G, Forge A. Rapid hair cell loss: A mouse model for cochlear lesions. J Assoc Res Otolaryngol. 2008;9:44-64. doi:10.1007/s10162-007-0105-8.

38. Safieddine S, El-Amraoui A, Petit C. The auditory hair cell ribbon synapse: From assembly to function. Annu Rev Neurosci. 2012;35:509-28. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150400.

39. Glowatzki E, Fuchs PA. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. Nat Neurosci. 2002;5:147-54. doi:10.1038/nn782.

40. Jean P, Anttonen T, Michanski S, et al. The synaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse. eLife. 2018;7:e30241. doi:10.7554/eLife.30241.

41. Declau F, Boudewyns A, Van den Ende J, Peeters A, Van den Heyning P. Etiologic and audiologic evaluations after universal neonatal hearing screening: Analysis of 170 referred neonates. Pediatrics. 2008;121:1119-26. doi:10.1542/peds.2007-2210.

42. Portelius E, Hansson SF, Tran AJ, Zetterberg H. Synaptic proteins in CSF as potential biomarkers for neurodegeneration. Biomark Med. 2015;9:403-14. doi:10.2217/bmm.15.17.

43. Zallocchi M, Meehan DT, Delimont D, et al. Role for a novel Usher protein complex in hair cell synaptic maturation. J Neurosci. 2017;37:3058-71. doi:10.1523/JNEUROSCI.3066-16.2017.

44. Northern JL, Downs MP. Hearing in children. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 253–76.

45. Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, et al. ClinGen—the Clinical Genome Resource. N Engl J Med. 2015;372:2235-42. doi:10.1056/NEJMsr1406261.

46. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) mutations and congenital hearing loss: A systematic review. Genet Med. 2002;4:258-74. doi:10.1097/01.GIM.0000018755.87793.58

47. Moser T, Grabner CP, Schmitz F. Sensory processing at ribbon synapses in the retina and cochlea. Physiol Rev. 2020;100:103-44. doi:10.1152/physrev.00026.2019.

48. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. J Pediatr. 2017;188:303-07. doi:10.1016/j.jpeds.2017.05.029.

49. Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. Kidney Int. 2007;72:931-35. doi:10.1038/sj.ki.5002434.

50. Vohr BR. Overview: Infants and children with hearing loss—Part I. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2003;9:62-4. doi:10.1002/mrdd.10061.

51. Al Samarrai ARH, Parham K, Mahdi BM, Al-Lami FH. Relationship of serum prestin levels to the severity of sensorineural hearing loss. Cureus. 2024;16:e53763. doi:10.7759/cureus.53763.

EKLER

EK 1: Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

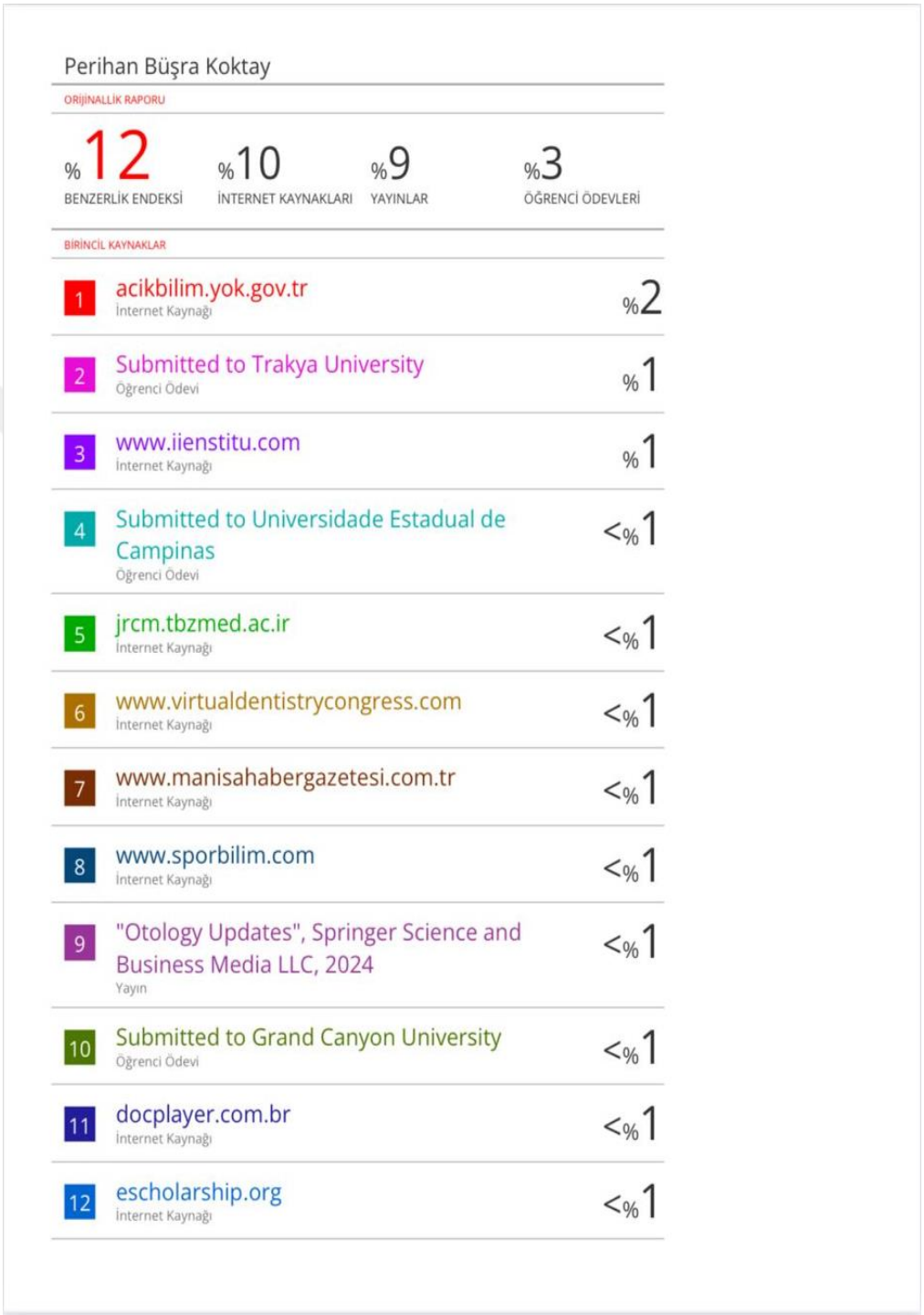
Oturum Sayısı: 2024/08 **Karar Tarihi**: 02.09.2024
Karar No: 2024.08.02
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Pigmente Guinea Pig 10 adet+10 adet (Pigmente Guinea Pig hibe doku)

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Metin BUDAK' ın yaptığı TÜHADYEK-2023/19 protokol no' lu, Y.L. öğrencisi Perihan Büşra KOKTAY' ın yüksek lisans tezi olarak planlanan "Konjenital İşitme Kayıplı Kobayların Serum Ribeye, Prestin Miktarları ve Kokleadaki Ekpresyonları Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı çalışmanın (Karar Tarihi: 29.12.2023, Karar No: 2023.12.01) "**Konjenital İşitme Kayıplı Kobayların Serum Ribeye ve Prestin Miktarlarının Araştırılması**" olması ile ilgili değişiklik önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

KABUL

ÖZGEÇMİŞ

BENZERLİK RAPORU



Perihan Büşra Koktay

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%10	%9	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	%1
3	www.iienstitu.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Öğrenci Ödevi	<%1
5	jrcm.tbzmed.ac.ir İnternet Kaynağı	<%1
6	www.virtualdentistrycongress.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.manisahabergazetesi.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.sporbilim.com İnternet Kaynağı	<%1
9	"Otology Updates", Springer Science and Business Media LLC, 2024 Yayın	<%1
10	Submitted to Grand Canyon University Öğrenci Ödevi	<%1
11	docplayer.com.br İnternet Kaynağı	<%1
12	escholarship.org İnternet Kaynağı	<%1