

Doğuştan Bilateral İşitme Engeli Olan Çocuklar ile Sağlıklı Çocukların Prestin ve Ribeye Protein Düzeylerinin Karşılaştırılması

Mahmut Tayyar Kalcioğlu^{1,2}, Serdal Çelik^{1,2}, Metin Budak^{3,4}, Mustafa Alp Candemir^{1,2}, Emirhan Çeviken^{1,2}, Emre Yakut^{1,2}, Nazım Eymen Turan^{1,2}, Ahmet Mutlu^{1,2}

¹İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı , İstanbul, Türkiye

²Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi KBB Kliniği, İstanbul, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Edirne Türkiye

⁴ Mirko Tos Ear & Hearing Research Center, Trakya University, Edirne, Türkiye

Corresponding Author:

Mahmut Tayyar Kalcioğlu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı , İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bilateral çok ileri derecede sensörinöral işitme kaybı (SNİK) olan çocuk hastalarda, koklear hücrel hasarın ve sinaptopatinin non-invaziv biyobelirteçleri olarak serum Prestin ve Ribeye (CtBP2) protein düzeylerinin tanısal potansiyelini araştırmak ve normal işiten çocuklarla karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Bu vaka-kontrol çalışmasına 1-6 yaş aralığında toplam 153 çocuk dahil edilmiştir. Hasta grubu bilateral doğuştan çok ileri derecede SNİK tanısı alan 75 çocuktan, kontrol grubu ise işitmesi normal olan 78 çocuktan oluşturulmuştur. Serum Prestin ve Ribeye seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. İstatistiksel analizlerde Mann-Whitney U, Çok Değişkenli Kovaryans Analizi (MANCOVA), ROC ve lojistik regresyon testleri kullanılmıştır.

Bulgular: Hasta grubunda serum Prestin (Medyan: 930.70 vs 414.08 pg/ml; $p=0.001$) ve Ribeye (Medyan: 15.49 vs 6.26 ng/mL; $p<0.001$) düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Gruplar arasındaki yaş farkı MANCOVA ile kontrol edildikten sonra dahi, protein profillerindeki bu farkın yüksek düzeyde anlamlılığını koruduğu doğrulanmıştır (Wilks' $\lambda = 0.864$, $p < 0.001$). ROC analizinde Ribeye proteininin hastalığı ayırt etme gücü (AUC=0.76), Prestin'den (AUC=0.65) daha yüksek saptanmıştır. Lojistik regresyon analizine göre, Ribeye düzeyindeki her 1 birimlik artışın SNİK riskini 1.18 kat artırdığı belirlenmiştir.

Sonuç: Serum Prestin ve özellikle Ribeye düzeyleri, doğuştan çok ileri dereceli SNİK olgularında koklear dış tüy hücresi hasarını ve ribbon sinaps yıkımını sistemik düzeyde yansıtan güçlü, yenilikçi biyobelirteçlerdir. Bu proteinler, yeni doğan döneminde işitme kaybının öngörülmesinde işitsel beyin sapı yanıtlarını desteklemek için kullanılabilir. Objektif bir tanı modülü olabileceği gibi özellikle koklear implantasyon karar süreçlerinde nöral sağkalımı öngörmede prognostik bir değere sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: Sensörinöral işitme kaybı, Prelingual, Prestin, Ribeye, CtBP2, biyobelirteç, koklear sinaptopati, çocuk.

1. GİRİŞ

Sensörinöral işitme kaybı (SNİK), çocukluk çağında dil gelişimi, bilişsel beceriler ve sosyal entegrasyon üzerinde derin ve kalıcı etkiler bırakan en yaygın duyuşal defisitlerden biridir [1]. Özellikle bilateral çok ileri derecede SNİK tablosunda, iç kulaktaki hücreşel hasarın boyutunu ve lokalizasyonunu objektif olarak değerlendirmek, koklear implant gibi erken müdahalenin gerçekleştirilmesi ve prognoz tayini açısından kritik öneme sahiptir. Günümüzde işitme kaybının tanısı ve takibi temel olarak odyometri, işitsel beyinsapı cevapları (ABR) ve otoakustik emisyon (OAE) gibi fonksiyonel testlere dayanmaktadır. Ancak bu elektrofizyolojik ve davranışsal yöntemler, koklear hasarın spesifik hücreşel ve moleküler doğası hakkında doğrudan hücreşel bilgi verememektedir [2]. Bu durum, kan veya serumdan elde edilebilecek objektif ve kulak spesifik biyobelirteçlere olan ihtiyacı gündeme getirmiştir.

Memeli kokleasında normal işitme fonksiyonu, dış tüy hücrelerinin (DTH) mekanik amplifikasyon yeteneği ve iç tüy hücrelerinin (İTH) işitsel sinyalleri sinirsel impulslara dönüştürmesi ile gerçekleşir. Prestin (SLC26A5), yalnızca DTH'lerin bazolateral membranında yüksek oranda eksprese edilen ve koklear amplifikasyondan sorumlu olan spesifik bir motor proteindir [3]. Son yıllarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, akustik travma, ototoksisite veya idiyopatik ani işitme kaybı gibi durumlarda hasar gören DTH'lerden sistemik dolaşıma Prestin salındığını göstermiştir. Bu bağlamda, serum Prestin seviyelerinin koklear DTH hasarını erken dönemde yansıtan spesifik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir [4, 5].

Öte yandan, işitsel sinyallerin İTH'lerden spiral ganglion nöronlarına (işitme sinirine) aktarımı, son derece özelleşmiş presinaptik yapılar olan "ribbon (kurdele) sinapşlar" aracılığıyla sağlanır. Ribeye (CtBP2 proteininin spesifik bir varyantı), bu ribbon sinapşların ana yapısal ve fonksiyonel bileşenidir [6]. Güncel literatür, birçok SNİK patogenezinin (özellikle koklear sinaptopati veya gizli işitme kaybı) temelinde, belirgin tüy hücresi kaybından bile önce bu ribbon sinapşların hasar görmesinin yattığını göstermektedir [7]. Hayvan modellerinde koklear dokudaki Ribeye ekspresyonundaki azalma işitme kaybı ve sinaptik dejenerasyon ile doğrudan ilişkilendirilmiş olsa da, bu proteinin sistemik dolaşımdaki seviyelerinin insanlarda ve özellikle pediatrik SNİK

hastalarında diagnostik bir biyobelirteç olarak klinik kullanımıyla ilgili veriler son derece kısıtlıdır.

Literatürdeki bu önemli eksiklikten yola çıkarak planlanan bu çalışmanın amacı; bilateral doğuştan çok ileri derecede sensörinöral işitme kaybı olan çocuk hastalar ile işitmesi normal olan sağlıklı çocuklarda serum Prestin ve Ribeye protein düzeylerini karşılaştırmaktır. Çalışmamızdan elde edilecek bulguların, bu iki spesifik proteinin pediatrik SNİK olgularında DTH hasarını ve İTH sinaptopatisini yansıtan yenilikçi birer biyobelirteç olarak potansiyelini aydınlatması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Çalışma Tasarımı ve Etik Kurul Onayı

Bu vaka-kontrol çalışması, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları kliniğinde yürütülmüştür. Çalışmaya başlamadan önce Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmış olup (E-10840098-202.3.02-4841) , tüm katılımcı çocukların ebeveynlerinden/yasal vasilerinden yazılı aydınlatılmış onam belgesi alınmıştır. Çalışma, Helsinki Bildirgesi prensiplerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya 1 ile 6 yaş aralığında olan toplam 153 çocuk dahil edilmiştir. Hasta grubu, kliniğimize başvuran ve objektif/sübjektif odyolojik testler (ABR, OAE vb.) sonucunda "prelingual bilateral çok ileri derecede sensörinöral işitme kaybı (SNİK)" tanısı kesinleşen 75 hastadan (kız ve erkek) oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise, aynı klinikte adenoidektomi ve/veya adenotonsillektomi operasyonu planlanan, bilinen hiçbir otojik veya sistemik hastalığı olmayan ve işitmesi tamamen normal olan 1-6 yaş arası 78 çocuktan oluşturulmuştur. Daha önce kulak cerrahisi geçiren, aktif enfeksiyonu olan, genetik sendromu veya işitme kaybına yol açabilecek majör kraniyofasiyal anomalisi olan, B veya C tipi timpanometrik değerleri saptanan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

2.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Her iki gruptaki hastalardan, ameliyat kararı verildikten sonra ameliyata hazırlık aşamasında alınan tetkikler sırasında steril tüplere venöz kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri uygun devir ve sürede santrifüj edilerek serum kısımları ayrıştırılmıştır. Elde edilen serum örnekleri Eppendorf tüplerine aktarılmış ve biyokimyasal analiz gününe kadar soğuk zincir kurallarına uygun olarak -32°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

2.4. Biyokimyasal Analizler (ELISA)

Serum örneklerindeki hedef protein düzeyleri, enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Dış tüy hücresi hasarını değerlendirmek amacıyla Prestin seviyeleri "Human Prestin (PRES)" ve İç tüy hücresi sinaptik ribbon yapılarını değerlendirmek amacıyla ise Ribeye (CtBP2) seviyeleri "Human C-terminal Binding Protein 2" düzeyleri, ticari olarak temin edilen ELISA kiti (96T; BT LAB, Korain Biotech Co., Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Analizler, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak sandwich ELISA prensibine dayalı şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygun şekilde seyreltilmiş örnekler ve standartlar önceden antikor kaplı mikropalak kuyucuklarına eklenmiş ve belirlenen süre boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar üretici önerilerine uygun şekilde yıkanmış ve ardından biyotin-konjuge antikor ve enzim konjugatı eklenerek ikinci inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında substrat çözeltisi ilave edilerek renk gelişimi sağlanmış ve reaksiyon stop solüsyonu ile sonlandırılmıştır. Optik dansite (OD) değerleri mikropalak okuyucu (iki ayrı cihazda AllSheng AMR-100, Çin ve Tecan Infinite M1000Pro, Avusturya) kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Konsantrasyonlar, kit ile sağlanan standartlar kullanılarak oluşturulan standart eğri (genellikle 4-parametre lojistik regresyon, 4PL) yardımıyla hesaplanmıştır. Tüm örnekler en az çift tekrar (duplicate) halinde çalışılmış ve ölçümlerin doğruluğunu sağlamak amacıyla intra- ve inter-assay varyasyonları kontrol edilmiştir. Sonuçlar ilgili birimlerde (pg/mL ve ng/mL) ifade edilmiştir.

2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics (version 27) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kategorik değişkenler (cinsiyet vb.) sayı ve yüzde olarak ifade edilmiş ve gruplar arası karşılaştırmalarda Pearson Ki-kare testi

kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin (Yaş, Prestin, Ribeye) normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermediği için tanımlayıcı istatistikler medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) veya minimum-maksimum değerler olarak sunulmuş; iki grup arasındaki farklılıkların analizinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Gruplar arasındaki mevcut yaş farkının protein düzeyleri üzerindeki olası karıştırıcı (confounding) etkisini kontrol etmek amacıyla Çok Değişkenli Kovaryans Analizi (MANCOVA) uygulanmıştır. Ayrıca, değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon Analizi ile değerlendirilmiştir. Prestin ve Ribeye proteinlerinin hasta grubunu normal gruptan ayırt etmedeki tanısıl performansını (kestirim gücünü) belirlemek için ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizi yapılmış, eğri altında kalan alan (AUC) değerleri hesaplanmıştır. ROC analizi verileri üzerinden Youden İndeksi kullanılarak en uygun kesim (cut-off) değerleri, duyarlılık ve özgüllük oranları belirlenmiştir. Ek olarak, hedef proteinlerdeki değişimin hastalık riskine olan etkisini modellemek amacıyla Lojistik Regresyon analizi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Demografik Özellikler ve Tanımlayıcı İstatistikler

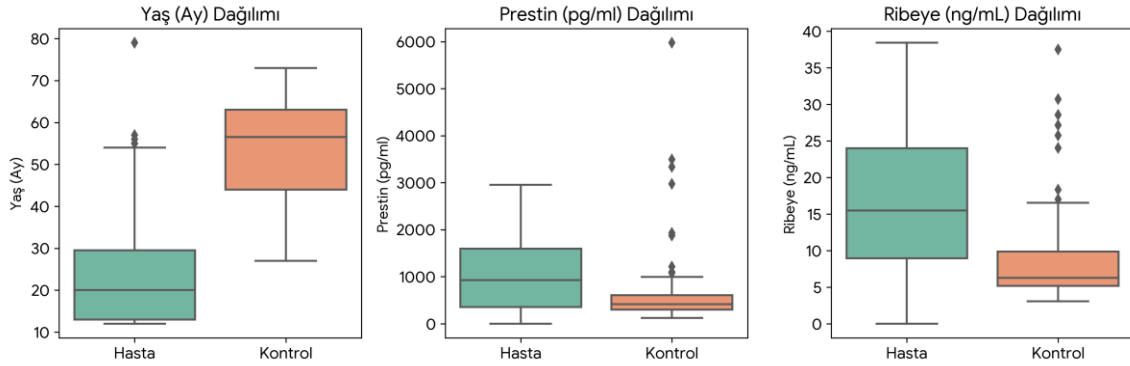
Çalışmaya toplam 153 çocuk dahil edilmiştir (Hasta grubu $n=75$, Kontrol grubu $n=78$). Tablo 1'de çalışma gruplarının demografik özellikleri ve protein düzeyleri özetlenmiştir. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Hasta: %54.6 erkek, Kontrol: %56.4 erkek; $p=0.956$). Yaş dağılımı incelendiğinde; hasta grubunun medyan yaşı 20 ay, kontrol grubunun medyan yaşı ise 56.5 ay olarak bulunmuştur. Hasta grubunun ortalama yaş dağılımı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu. ($p<0.001$).

Değişken	Hasta Grubu (n=75)	Kontrol Grubu (n=78)	p Değeri
Yaş (ay), Medyan (Min-Maks)	20 (12-79)	56.5 (27-73)	<0.001*
Cinsiyet (E/K), n (%)	41 (%54.7) / 34 (%45.3)	44 (%56.4) / 34 (%43.6)	0.956
Prestin (pg/ml), Medyan	930.70	414.08	0.001*
Ribeye (ng/mL), Medyan	15.49	6.26	<0.001*

Tablo 1: Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve serum protein düzeyleri (*: İstatistiksel olarak anlamlı p<0.05).

Protein Düzeylerinin Karşılaştırılması

Verilerin normal dağılım göstermediği saptandığından, gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Hasta grubunda Prestin düzeyleri (Medyan: 930.70 pg/ml), kontrol grubuna (Medyan: 414.08 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.001). Benzer şekilde, hasta grubundaki Ribeye düzeyleri (Medyan: 15.49 ng/mL), kontrol grubuna (Medyan: 6.26 ng/mL) kıyasla anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p<0.001). (Şekil1)



Şekil 1: Hasta ve kontrol gruplarının Yaş (Ay), Prestin (pg/ml) ve Ribeye (ng/mL) düzeylerinin kutu grafiği (boxplot) ile dağılımı.

Yaş Faktörünün Kontrolü ve Çok Değişkenli Analiz

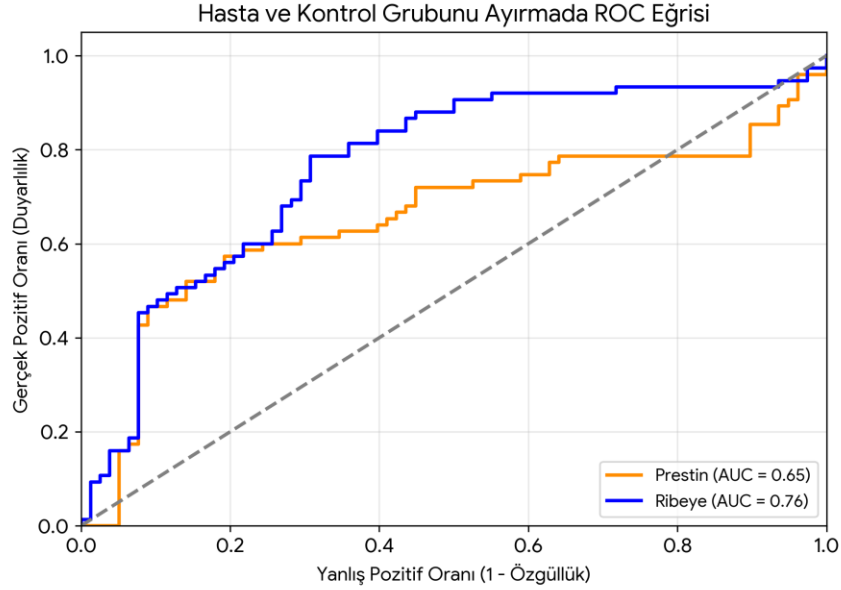
Gruplar arasındaki yaş farkının protein düzeyleri üzerindeki olası etkisini dışlamak amacıyla yapılan Spearman korelasyon analizinde; hem hasta hem de kontrol grubunda yaş

ile Prestin ve Ribeye düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (tüm gruplar için $p > 0.05$). Bulguları doğrulamak adına uygulanan MANCOVA (Çok Değişkenli Kovaryans Analizi) sonucunda, yaş değişkeni kontrol edildikten sonra dahi, Hasta ve Kontrol gruplarının protein profilleri (Prestin ve Ribeye) arasındaki farkın anlamlılığını koruduğu tespit edilmiştir (Wilks' $\lambda = 0.864$, $F(2, 149) = 11.63$, $p < 0.001$).

Ek olarak prestin ve ribeye düzeylerinin yaş ile ortaya çıkabilecek değişimlerin sonuçlarımızı etkileiş olma ihtimali düşünülerek kontrol grubu yaş aralıklarına göre iki alt gruba ayrıldı. İlk grup 24–48 ay ($n=24$) aralığında iken ikinci grup ise 48–72 ($n=54$) ay aralığında. Gruplar arasında demografik ve biyokimyasal parametreler karşılaştırıldı. Cinsiyet dağılımı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uymaması nedeniyle analizlerde non-parametrik testler kullanıldı. Yaş açısından değerlendirildiğinde, tanımlanan yaş aralıklarına paralel olarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p < 0.001$) Buna karşın, Prestin ve Ribeye düzeyleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (her iki parametre için $p > 0.05$).

Tanımsal Performans ve Risk Analizi (ROC ve Lojistik Regresyon)

Proteinlerin hasta grubunu ayırt etme gücünü belirlemek için yapılan ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi sonuçları Şekil 2'de sunulmuştur. Ribeye proteini 0.76 AUC değeri (Eğri Altında Kalan Alan) ile iyi düzeyde bir ayırt edicilik sergilerken; Prestin proteini 0.65 AUC değeri ile kabul edilebilir düzeyde bir performans göstermiştir. Youden İndeksi temel alınarak belirlenen optimal kesim (cut-off) değerleri; Ribeye için 8.78 ng/mL (%78.7 duyarlılık, %69.2 özgüllük) ve Prestin için 659.90 pg/ml (%57.3 duyarlılık, %80.8 özgüllük) olarak saptanmıştır. Lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre, Ribeye düzeyindeki her 1 birimlik artışın hasta grubunda yer alma olasılığını (Odds Ratio) 1.187 kat artırdığı saptanmıştır ($p < 0.001$, %95 GA: 1.097-1.284).



Şekil 2: Hasta ve kontrol grubunu ayırmada Prestin ve Ribeye proteinleri için ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrileri.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmanın temel amacı, doğuştan bilateral çok ileri derecede sensörinöral işitme kaybı (SNİK) olan pediatrik hastalarda (1-6 yaş) koklear hücresel hasarın spesifik biyobelirteçleri olarak serum Prestin ve Ribeye (CtBP2) düzeylerini araştırmaktır. Çocukluk çağı SNİK tablosu, dil gelişimi ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde geri döndürülemez etkiler bırakabilen kritik bir halk sağlığı sorunudur [1]. Ancak güncel klinik pratikte kullanılan ABR (İşitsel Beyinsapı Cevabı) ve OAE (Otoakustik Emisyon) gibi testler fonksiyonel bilgi vermekle birlikte, koklear hasarın spesifik moleküler lokalizasyonu hakkında doğrudan hücresel veri sunmamaktadır [2]. Elde ettiğimiz bulgular, Prestin ve Ribeye proteinlerinin hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu ve özellikle Ribeye proteininin koklear patolojiyi öngörmeye (AUC=0.76) son derece güçlü bir tanısal biyobelirteç potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Memeli kokleasında işitsel duyarlılık ve frekans seçiciliğinden sorumlu olan dış tüy hücreleri (DTH), akustik travma, ototoksinite ve genetik mutasyonlara karşı iç kulağın en savunmasız yapılarıdır [8, 9]. Prestin (SLC26A5), yalnızca DTH'lerin bazolateral membranında yüksek konsantrasyonda bulunan ve mekanik amplifikasyonu sağlayan

spesifik bir motor proteindir [3]. Normal fizyolojik koşullarda, kan-labirent bariyeri (KLB) iç kulak sıvıları ile sistemik dolaşım arasındaki madde geçişini katı bir şekilde sınırlar [10, 11]. Ancak hipoksi, inflamasyon veya şiddetli hücrenel hasar durumlarında KLB'nin bütünlüğü bozulur ve permeabilitesi artar [12]. Parham ve ark. [2], gürültüye bağlı işitme kaybı (NIHL) oluşturulan hayvan modellerinde DTH dejenerasyonu ile eř zamanlı olarak serum Prestin seviyelerinin belirgin şekilde arttığını ilk kez göstermiştir. Benzer şekilde, sisplatin ve aminoglikozid ototoksisitesinde de hücrenel apoptoz sonucu Prestin'in dolaşıma salındığı rapor edilmiştir [13, 14]. Klinik çalışmalarda ise, idiyopatik ani SNİK gelişen yetişkin hastalarda serum Prestin düzeylerinin sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir [4, 5]. Çalışmamız, yetişkinlerde ve genellikle akut tablolarla (ani işitme kaybı) elde edilen bu verileri, pediatrik yaş grubuna ve doğuştan var olan çok ileri derecede SNİK profiline taşıması açısından literatüre eşsiz bir katkı sunmaktadır. Hasta grubumuzda saptanan yüksek serum Prestin seviyeleri (Medyan: 930.70 pg/ml), DTH dejenerasyonunun ve hücrenel içerik sızıntısının sistemik dolaşımdan izlenebileceğini doğrulamaktadır [15]. Ancak ROC analizimizde Prestin'in ayırt edicilik gücünün Ribeye'a göre daha düşük kalması (AUC=0.65); çok ileri dereceli kayıplarda DTH rezervinin zamanla büyük oranda tükenmiş olabileceğini ve dolaşıma salınan Prestin miktarının bir plato evresine ulaşmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın çarpıcı ve literatür açısından yenilikçi bulgularından biri Ribeye proteinine aittir. Ribeye (CtBP2 proteininin spesifik bir varyantı), i tüy hücreleri (İTH) ile spiral ganglion nöronları (SGN) arasındaki nörotransmitter salınımını koordine eden "ribbon (kurdele)" sinapsların ana yapısal bileşenidir [6, 16]. Kujawa ve Liberman'ın çığır açan çalışmalarıyla literatüre giren "koklear sinaptopati" veya "gizli işitme kaybı" (hidden hearing loss) kavramı, kalıcı odyometrik tüy hücresi kaybından (eşik artışından) ok daha önce bu ribbon sinapsların hasar gördüğünü ortaya koymuştur [7,17,18]. Özellikle glutamat eksitotoksisitesi ve aşırı kalsiyum akışı, ribbon yapılarının şişmesine ve İTH bazolateral membranından kopmasına neden olmaktadır [19]. İnsan temporal kemik çalışmalarında da yaşlanma (prezbikuzi) ve gürültü öyküsü olan bireylerde ribbon sinaps sayısında dramatik bir azalma olduğu histopatolojik olarak kanıtlanmıştır [20, 21]. Ancak bugüne kadar Ribeye ekspresyonu çoğunlukla ex-vivo hayvan deneylerinde ve postmortem immünfloresan boyamalarla incelenmiş olup, sistemik dolaşımdaki (serum) Ribeye

seviyelerinin pediatrik SNİK hastalarında in-vivo olarak araştırıldığı bir klinik çalışma literatürde bulunmamaktadır[22]. Çalışmamızda, hasta grubunda serum Ribeye düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla belirgin derecede yüksek saptanması (Medyan 15.49 vs 6.26 ng/mL; $p < 0.001$), primer DTH hasarına ek olarak İTH sinapslarındaki şiddetli ve devam eden nöral yıkımın dolaşıma yansıdığına açık bir göstergesidir. Lojistik regresyon analizimizde Ribeye düzeyindeki her 1 birimlik artışın SNİK riskini 1.18 kat artırdığının bulunması, bu proteinin patolojiyi hücresel düzeyde yansıtmadaki benzersiz gücünü kanıtlamaktadır.

Bu bulguların klinik pratiğe yansması hem yeni doğan işitme sağlığının saptanması hem de "koklear implantasyon (Kİ)" karar süreçlerinde büyük önem taşımaktadır. Çalışmamıza dahil edilen 1-6 yaş arası çok ileri dereceli SNİK vakaları, erken dönem Kİ adaylarıdır. Bir koklear implantın başarısı ve hastanın postoperatif konuşmayı ayırt etme skoru, elektriksel uyarıyı kortekse iletecek olan spiral ganglion nöronlarının sağkalım oranına doğrudan bağlıdır [23, 24]. Hayvan modelleri, ribbon sinaps hasarını (sinaptopatiyi) aylar veya yıllar sonra kaçınılmaz ve ilerleyici bir SGN dejenerasyonunun izlediğini göstermektedir [17]. Bu bağlamda, preoperatif dönemde hastanın kanından tespit edilecek patolojik düzeyde yüksek Ribeye seviyeleri, devam eden yoğun sinaptik yıkımın ve dolayısıyla artmış SGN dejenerasyonu riskinin bir habercisi (prognostik belirteç) olabilir. Klinisyenler için bu bilgi, implantasyonda cerrahi zamanlamanın öne çekilmesi veya uygun elektrot seçimi gibi stratejik kararları şekillendirebilecek potansiyele sahiptir.

Biyobelirteç araştırmalarında yaş faktörü, çocukluk çağındaki yüksek metabolik turnover ve büyüme hızı nedeniyle önemli bir karıştırıcı (confounding) faktördür [25]. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasındaki mevcut yaş farkının karıştırıcı etkisi Çok Değişkenli Kovaryans Analizi (MANCOVA) ile elimine edilmiştir. Yaş kontrol edildikten sonra dahi protein profillerindeki (Prestin ve Ribeye) gruplar arası farkın yüksek istatistiksel anlamlılığını koruması (Wilks' $\lambda = 0.864$, $p < 0.001$), elde ettiğimiz bulguların yaşa bağlı fizyolojik süreçlerden bağımsız, tamamen koklear patolojiye özgü olduğunu doğrulamıştır. Bununla birlikte, çalışmamızın kesitsel (cross-sectional) tasarımı nedeniyle protein seviyelerinin zamansal progresyonunun izlenememesi ve hasta grubunun etiyolojik çeşitliliği (konjenital CMV, GJB2 mutasyonları vb.) kısıtlılıklarımız arasındadır. Ayrıca

bir baska limitasyon koklear implantasyon sonrasi da proteinlerdeki degisikliklerde monitorize edilemedigi icin yapilan mudahale ile proteinlerin seviyesinin degisimi de degerlendirilememistir.

Sonuç olarak, bilateral çok ileri derecede SNİK olan çocuklarda serum Prestin ve Ribeye düzeyleri normal işiten çocuklara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Özellikle serum Ribeye seviyeleri, koklear sinaptopatiyi ve ribbon sinaps hasarını sistemik düzeyde yansıtan güçlü, yenilikçi ve non-invaziv bir tanısal biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır. Bu biyobelirteçlerin, çocuklarda objektif odyolojik testlere tamamlayıcı bir diagnostik araç veya koklear implantasyon süreçlerinde nöral sağkalımı yansıtan prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Gelecekte, etiyojisi spesifik olarak belirlenmiş homojen kohortlarda yapılacak prospektif çalışmalar, bu proteinlerin rutin otolojik pratiğe entegrasyonunu hızlandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Korver, A. M., Smith, R. J., Van Camp, G., et al. (2017). Congenital hearing loss. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 16094.
2. Parham, K. (2015). Prestin as a biochemical marker for early detection of acquired sensorineural hearing loss. *Medical Hypotheses*, 85(2), 130-133.
3. Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., et al. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783), 149-155.
4. Saadat, F., Jalali, M. M., & Akbari, M. (2022). Assessment of prestin level changes as an inner-ear biomarker in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *The Journal of Laryngology & Otology*, 136(11), 1039-1043.
5. Sun, J., et al. (2020). A Preliminary Report on the Investigation of Prestin as a Biomarker for Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Ear, Nose & Throat Journal*, 99(8), 528-531.
6. Schmitz, F., Königstorfer, A., & Südhof, T. C. (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*, 28(3), 857-872.
7. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *The Journal of Neuroscience*, 29(45), 14077-14085.
8. Parker, M. A. (2011). Biotechnology in the treatment of sensorineural hearing loss: foundations and future of hair cell regeneration. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*, 54(6), 1709-1731.
9. Ryals, M. M., et al. (2013). Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 21(5), 458-463.
10. Shi, X. (2016). Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (blood-labyrinth barrier). *Hearing Research*, 338, 52-63.
11. Juhn, S. K., Hunter, B. A., Odland, R. M. (2001). Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *International Tinnitus Journal*, 7(2), 72-83.

12. Lin, L., et al. (2011). Blood-labyrinth barrier opening following noise-induced hearing loss. *Neuroscience Letters*, 505(3), 258-262.
13. Parham, K., & Dyhrfeld-Johnsen, J. (2016). Blood biomarkers for inner ear disorders. *Journal of the American Academy of Audiology*, 27(10), 785-789.
14. Ganesan, P., et al. (2018). Ototoxicity: A challenge in diagnosis and treatment. *Journal of Audiology & Otology*, 22(2), 59-68.
15. Kalinec, G. M., et al. (2017). MicroRNAs as potential biomarkers in inner ear diseases. *Hearing Research*, 349, 148-158.
16. Roux, I., et al. (2006). Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, 127(2), 277-289.
17. Liberman, M. C., & Kujawa, S. G. (2017). Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hearing Research*, 349, 138-147.
18. Möhrle, D., et al. (2016). Noise-induced hidden hearing loss in mice: synaptopathy and altered amplitudes of auditory brainstem responses. *Neuroscience*, 337, 269-281.
19. Puel, J. L., et al. (1998). Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-induced hearing loss. *Neuroreport*, 9(9), 2109-2114.
20. Viana, L. M., Kempfle, J. S., Valdez, T. A., et al. (2015). Cochlear neuropathy in human presbycusis: Confocal analysis of hidden hearing loss in donor ears. *Hearing Research*, 327, 78-88.
21. Wu, P. Z., et al. (2019). Primary neural degeneration in the human cochlea: evidence for hidden hearing loss in the aging ear. *Neuroscience*, 407, 8-20.
22. Moser, T., Predoehl, F., & Starr, A. (2013). Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otology & Neurotology*, 34(6), 995-1004.
23. Nadol, J. B. (1997). Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 117(3), 220-228.
24. Fayad, J. N., & Linthicum, F. H. (2006). Multichannel cochlear implants: relation of histopathology to performance. *The Laryngoscope*, 116(8), 1310-1320.

25. Macherey, O., & Carlyon, R. P. (2014). Cochlear implants. *Current Biology*, 24(18), R878-R884.