



**SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL
SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİğİ**

**KLİNİğİMİZE BAŞVURAN USHER SENDROMLU HASTALARIN KLİNİK
VE GENETİK ARAŞTIRMA SONUÇLARI**

Dr. Abdurrahman Alpaslan Alkan

İSTANBUL 2019



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ**

**KLİNİĞİMİZE BAŞVURAN USHER SENDROMLU HASTALARIN KLİNİK
VE GENETİK ARAŞTIRMA SONUÇLARI**

Dr. Abdurrahman Alpaslan Alkan

Prof. Dr. Dilek Güven

(UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL 2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi aldığım yıllar boyunca bana ve tüm asistanlarına karşı her zaman anlayışla ve nezaketle yaklaşmış, asistanlarının eğitim hakkını her şartta şiddetle savunmuş, hem mesleki hem de akademik anlamda bize hep yol gösterici olmuş ve hepsinden daha önemlisi etik değerlere bağlı, ahlaklı bir hekim olarak bize hep güzel örnek olmuş kıymetli hocam Prof. Dr. Dilek Güven'e teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim boyunca öğrendiğim her şeyi onlara borçlu olduğum, uzman asistan hiyerarşisini bir kenara bırakarak bana hep sevgi ve saygıyla yaklaşmış ve daha iyi bir eğitim almam için her türlü fedakarlığı yapmış Doç.Dr. Mehmet Demir, Op.Dr. Ayşe Burcu Dirim, Op. Dr. Delil Özcan, Op.Dr. Selam Yekta Şendül, Op.Dr. Eyüp Düzgün, Op.Dr. Semra Tiryaki Demir ve tüm uzmanlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Klinikte ve ameliyathanede beraber çalıştığım gerek mesleki gerekse sosyal anlamda hastane içinde yaşadığım tüm sorunları çözmemde bana hep yardımcı olmuş birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım tüm hemşire ve personellerimize ayrı ayrı teşekkür ederim.

Asistanlık sürem boyunca beraber çalıştığım, hepsinden ayrı ayrı çok fazla şey öğrendiğim sadece hastane içinde değil hastane dışında da ömür boyu süreceğine inandığım dostluklar kurduğum başta eşkıdemim Dr. Gürcan Doğukan Arslan olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Fen lisesine girdiğim ilk günden bugüne kadar her zaman yanımda olmuş tüm arkadaşlarıma; hem fakültede, hem zorunlu hizmet sürem boyunca hem de asistanlık hayatımda yanımda olan desteğini her zaman hissettiğim değerli meslektaşım Dr. Fikret Berkan Anarat'a ve uzmanlık eğitimi aldığım dört yıl boyunca aynı evi paylaştığım, fen lisesindeki ilk günümünden bugüne kadar yıllarımı beraber geçirdiğim, varlığıyla bana her zaman güç vermiş kardeşim Yalım Can Arslan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemde kuşkusuz en büyük pay sahibi olan, evlatlarının eğitimi için hep kendi ihtiyaçlarından kısararak her türlü fedakarlığı yapmış, tüm nasihatlerinde doktorluğun her şeyden önce iyi insan olmak olduğunu ifade etmiş çok değerli anneme ve babama ve hiçbir koşulda benden desteğini esirgemeyen sevgili kardeşime ayrı ayrı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER	4
KISALTMALAR	6
ÖZET.....	8
ABSTRACT.....	9
GİRİŞ VE AMAÇ.....	10
TANIM, GENEL SINIFLAMA ve EPİDEMİYOLOJİ.....	10
USHER SENDROMU TIPLERİ	11
Usher Sendromu Tip 1	11
Usher Sendromu Tip 2.....	12
Usher Sendromu Tip 3.....	13
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ.....	13
Usher Sendromuna Sıklıkla Sebep Olan Genler.....	14
PATOGENEZ	16
USHER 1B.....	17
USHER 1C.....	19
USHER 1D	20
USHER 2A	21
TEDAVİ YAKLAŞIMLARI	21
Farmakolojik Tedaviler.....	23
Kök Hücre Tedavileri	24
Gen Tedavileri	25
Usher Sendromu İçin Uygulanan Gen Tedavileri.....	29
Retinal Protezler	33
Optogenetik Tedaviler	34
GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
ETİK KURUL ONAYI.....	35
HASTA SEÇİMİ.....	35

DIŞLAMA KRİTERLERİ	37
MOLEKÜLER ANALİZ	37
MYO7A, PCDH15, USH1C, CDH23, USH2A Genlerinin Analizi.....	39
İSTATİSTİK	40
SONUÇ	40
DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER.....	40
GÖZ VE GÖRME MUAYENESİ SONUÇLARI	41
İŞİTME VE DENGE MUAYENESİ SONUÇLARI	42
MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI	43
MYO7A Geni Mutasyon Analizi Sonuçları	43
PCDH15 Geni Mutasyon Analizi Sonuçları.....	44
USH1C Geni Mutasyon Analizi Sonuçları.....	45
CDH23 Geni Mutasyon Analizi Sonuçları	45
USH2A Geni Mutasyon Analizi Sonuçları.....	46
MUTASYON TESPİT EDİLEN HASTALARIN DETAYLI SONUÇLARI VE DİĞER HASTALARLA KIYASLANMASI	46
TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65
EKLER.....	67

KISALTMALAR

- Aa : aminoasit
- AAV: Adeno ilişkili virüs
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- EHS : El hareketleri seviyesi
- EIAV: Equine enfeksiyöz anemi virüsü
- ERG : Elektoretinografi
- FA: Floresein anjiyografi
- FAF: Fundus autoflorescence
- FAZ: Foveal avasküler zone
- FDA: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
- GİB : Göz içi basınç
- IH : Işık hissi
- ILM: İç limitan membran
- KBB : Kulak Burun Boğaz
- KMÖ: Kistik makula ödemi
- LCA: Leber'in konjenital amarozisi
- MPS : Metreden parmak sayma
- NGS: Next generation sequencing
- O.R. : Otozomal Resesif
- OKT: Optik Koherens Tomografi
- OKTA: Optik koherens tomografi anjiyografi
- PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
- RBP: Retinol bağlayıcı protein
- RNA : Ribonükleik asit
- RP : Retinitis Pigmentosa
- RPE: Retina pigment epiteli

Sh-1 : Shaker-1

USH : Usher Sendromu

USH1 : Usher Sendromu Tip 1

USH2 : Usher Sendromu Tip 2

USH3 : Usher Sendromu Tip 3

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

WES: Whole exome sequencing

WGS: Whole genome sequencing

μ l: Mikrolitre

μ m : Mikrometre

<: Küçüktür

>: Büyüktür

ÖZET

Amaç: Ülkemizin bir çok bölgesinden gelerek kliniğimize başvurmuş Usher sendromu hastalarının demografik özelliklerini, klinik bulgularını ve moleküler epidemiyolojilerini araştırmak

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız kapsamında Usher sendromu ön tanısıyla kliniğimizde takip edilen 48 hastanın özgeçmiş, soygeçmiş özellikleri görme, işitme ve denge muayenelerinin sonuçları ve genetik araştırma sonuçları değerlendirildi.

Bulgular: Hastalarımızdan 14 tanesi Usher sendromu Tip 1, 16 tanesi ise Usher sendromu Tip 2 olarak tespit edildi. Hastalarımızdan 18 tanesine klinik olarak sınıflandırma yapılamadı. Klinik olarak Tip 2 ile uyumlu 7 hastamızda MYO7A geninde mutasyon tespit edildi.

Sonuç: Usher sendromu Tip1'e sebep olduğu bilinen MYO7A gen mutasyonu, klinik olarak Usher sendromu Tip2 ile uyumlu 7 hastamızda tespit edildi. Bu hastalarımızın 6 sında heterozigot, 1 hastamızda ise homozigot mutasyon tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: genetik, Usher sendromu, MYO7A, retinitis pigmentosa, moleküler epidemiyoloji

ABSTRACT

Purpose : To investigate the demographic characteristics, clinical findings and molecular epidemiology of Usher syndrome patients who apply to our clinic from many regions of our country.

Materials and Methods: In this study, medical and family history, ophthalmologic, hearing and vestibular examination findings and genetical research findings of 48 patients who were followed-up in our clinic with a prediagnosis of Usher syndrome were evaluated.

Results: 14 of the patients were Usher syndrome Type 1, 16 of them were Usher syndrome Type 2. 18 patients could not be clinically classified. MYO7A gene mutation was detected in 7 patients.

Conclusions: MYO7A gene mutation, which is known to cause Usher syndrome Type 1, was detected in 7 patients clinically compatible with Usher syndrome Type2. Heterozygous mutation was detected in 6 of these patients and homozygous mutation in 1 patient.

Keywords: genetics, usher syndrome, MYO7A, retinitis pigmentosa, molecular epidemiology

GİRİŞ VE AMAÇ

TANIM, GENEL SINIFLAMA ve EPİDEMİYOLOJİ

Usher sendromu (USH) retinitis pigmentosa (RP), nörosensoriyal işitme kaybı ve denge problemleriyle seyreden kronik, progresif, otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. 1914 yılında Charles Usher tarafından tanımlanmıştır. Retinitis pigmentosanın görülmeye başladığı yaşa, işitme kaybının şiddetine ve denge probleminin eşlik edip etmemesine göre üç farklı klinik tipe ayrılmıştır. Konjenital sağırılığı olan hastaların % 3 – 6’sında, RP hastalarının % 8 – 33 ‘ünde ve hem kör hem sağır hastaların %50’sinde Usher sendromu görülmektedir [1]. Usher sendromu klinik ve genetik olarak heterojenite göstermektedir. Davenport ve Omenn tarafından 1977 yılında yapılan sınıflandırma günümüzde halen aktif olarak kullanılmaktadır [2]. USH Tip 1 ‘de (USH1) hastalar sağır olarak doğarken vestibüler problemler de eşlik eder. Bununla beraber görme kaybı da ilk dekatta başlamaktadır. USH Tip 2’de (USH2) daha hafif seyirli işitme kaybı görülürken denge problemleri izlenmez. USH Tip3’te (USH3) ikinci tipe benzer biçimde daha hafif şiddette işitme kaybı izlenirken Tip 2’den farklı olarak işitme kaybı progresif seyreder ve vestibüler problemler eşlik edebilir [3].

Tablo 1. Usher sendromu tipleri ve klinik özellikleri

	Tip 1	Tip 2	Tip 3
İşitme	Doğumsal bilateral sağırılık	Doğumdan itibaren orta şiddette ya da şiddetli işitme kaybı	Doğumda normal; çocukluk ve ergenlikte başlayıp progresif ilerleyen işitme kaybı
Görme	İlk ya da ikinci dekatta başlayan retinitis pigmentosa	Puberte sonrası başlayan retinitis pigmentosa	Pubertede başlayan klinik şiddeti değişkenlik gösteren retinitis pigmentosa
Vestibüler sistem	Doğuştan vestibüler fonksiyon kaybı	Normal	Normal veya normale yakın vestibüler fonksiyon

USHER SENDROMU TİPLERİ

USH1 kliniği en gürültülü olan formdur. Etkilenmiş çocuklar 6 aylıktan yardım almadan oturamaz 18 ay olmadan yürüyemezler [4, 5]. Geceleri görme azlığıyla başlayan retinopati görme alanında azalmayla devam eder ve hastalar progresif biçimde görme yetilerini kaybederler. 3 yaşından itibaren ERG'de bulgu vermeye başlayan hastalık devamında da fundus muayenesinde de bulgu vermeye başlar. Kemik spikül formasyonu ve kan damarlarında daralma izlenir. USH2 ise doğumda sağırılık izlenmemesi ve düşük frekans sesleri işitmede daha az kayıp izlenirken yüksek frekansta sesleri işitmede daha fazla problem yaşanmasıyla USH1'den klinik olarak ayrılabilir. Bunun yanında görme sorunlarının pubertede başlaması ve vestibüler fonksiyon kaybının görülmemesi tanıda yardımcıdır [6]. Progresif görme kaybı hastadan hastaya klinik olarak USH1'de daha fazla çeşitlilik göstermektedir [7].

Tüm tiplerde Korti organında ve kohleada ciddi dejenerasyon izlenirken kohlear gangliyonun ise atrofiye gittiği tespit edilmiştir. USH1'de vestibüler uç organlar normal görülebileceği ciddi hasarlar da tespit edilebilirken USH2 ve USH3'de vestibüler anomali izlenmemiştir [6]. Tiplendirme yapılamamış hastalarda yapılan çalışmalarda ise hem fotoreseptör hücrelerin silyumlarında hem de olfaktör reseptör nöron silyumlarında anomali tespit edilmiştir [8, 9]. Bununla beraber bu hastalarda sperm motilitesinde azalma ve anormal sperm silyumları izlenmiş ve fertilitenin azaldığı görülmüştür [10]. Ayrıca USH1 hastalarında görülen bronşektazi ve nazal mukosilyer patolojilerin silyer disfonksiyona bağlı olduğu düşünülmektedir [11].

Usher Sendromu Tip 1

USH1 hastaları sağır olarak ve vestibüler fonksiyon bozukluğuyla doğarlar. Puberte öncesi RP gelişimi izlenir [4]. Motor gelişimde gecikme vestibüler fonksiyon bozukluğunun klinik bulgusudur. USH1 Usher sendromu'nun klinik olarak en şiddetli ilerleyen formudur. Tüm Usher sendromlu hastaların yaklaşık yüzde 30-40'ı

bu tiptedir [12]. USH1'in Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletlerin'de en sık görülen alt tipi ise MYO7A geniyle ilişkili olarak myosinVIIa proteinindeki mutasyona bağlı olarak ortaya çıkan USH1B'dir [13, 14]. İkinci en sık görülen ise CDH23 genine bağlı olarak ortaya çıkan USH1D'dir. Fenotipe yansıyan hastaların %10-35 arasını bu tip oluşturur. PCDH15 geninde mutasyon ise Birleşik Devletler ve Birleşik Krallık'ta %11 oranında görülmüştür. Fakat MYO7A genine bağlı olarak görülen mutasyonlar atipik USH tablolarına da sebep olabilir. MYO7A hem non-sendromik dominant hem de non-sendromik resesif sağırılık tablolarına sebep olabilir. MYO7A geniyle fenotip arasında kesin bir korelasyon bulunmamaktadır. Fakat USH1'de en sık fenotipik çeşitlilik CDH23 genine bağlı olarak görülmektedir. CDH23'e bağlı olarak aynı zamanda yine non-sendromik sağırılık da görülebilmektedir [15]. Orta şiddetten şiddetliye değişiklik gösteren progresif ve/veya asimetrik işitme kaybıyla beraber vestibüler fonksiyon kaybında da çeşitlilik görülebileceği de bildirilmiştir [13]. Bununla beraber CDH23 genine bağlı mutasyonlarda genetik ve fenotip arasında korelasyon bulunmaktadır. Eğer mutasyon homozigot non-sense ya da çerçeve kayması mutasyon ise USH1D tablosu ortaya çıkmaktayken mis-sense mutasyonlarda USH2 veya USH3 ya da non-sendromik sağırılık ortaya çıkmaktadır [16, 17]. Atipik USH1G tablolarında ise orta şiddetten şiddetli spektruma değişiklik gösteren prelingual sağırılık görülürken görme ve vestibüler fonksiyon normal olarak izlenir [18]

Usher Sendromu Tip 2

USH2 USH1'e göre daha hafif şiddette işitme kaybına sebep olurken vestibüler problemler izlenmez. Retinitis pigmentosa ise ilk ya da ikinci dekatta ortaya çıkabilir. Gece görmesinde azalma ortalama 15 yaşında ortaya çıkarken retinitis pigmentosa tanısı ortalama 24 yaşında konur [19]. Fakat USH1 ile USH2 arasında görme kaybının şiddeti kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir fark ortaya konmamıştır [20].

USH2 %85 oranında USH2A genine bağlı olarak kodlanan usherin proteinindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar [21]. USH2A genindeki mutasyonlar çeşitli klinik tablolara sebebiyet verebilir. Tipik veya atipik USH2

yanında otozomal resesif (O.R.) non-sendromik RP de görülebilir [22]. Diğer USH2 tipleri daha nadir olarak görülmektedir. Genetik mutasyonlarla oluşan klinik tablolar arasında kesin bir klinik korelasyon bulunmamaktadır.

Usher Sendromu Tip 3

USH3 tipik olarak progresif işitme kaybı, başlangıç yaşı değişiklik gösteren RP, normal veya normale yakın vestibüler fonksiyon ile karakterize bir klinik tablodur. Usher sendromlu hastaların yaklaşık %2-4'ü USH3'tür. Fakat Finlandiya ve Askenazi yahudilerinde %40 oranında görülür ve en sık görülen USH tipidir [23, 24].

MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ

İlk olarak tespit edilen genetik lokus 1990 yılında USH2 için USH2A idir. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupada etkilenen aileler için yapılan araştırmada kromozom 1q nun distal ucunda tespit edilmiştir [25]. Ardından Fransa'da USH1A lokusu tespit edilmiştir [26]. USH3 için bildirilen ilk lokus ise 1995 yılında finli ailelerde saptanmıştır [27].

Günümüzde Usher sendromu için tanımlanmış 12 farklı genetik lokus bulunmaktadır. USH1 için 6 farklı lokus tanımlanmıştır. Bunlar kromozom 14q32'de USH1A, kromozom 11q13.5'ta USH1B, kromozom 11p15.1'de USH1C, kromozom 10q'da USH1D, kromozom 21q21'de USH1E, kromozom 10'da USH1F'dir [26, 28-32]. USH2 için 3 farklı genetik lokus tanımlanmıştır. Bunlar ise kromozom 1q41 üzerinde USH2A, kromozom 3p23-24.2 üzerinde USH2B, kromozom 5q14.3-21.3 üzerinde USH2'dir [25, 33, 34]. USH3 içinse kromozom 3q21-25 üzerinde USH3A ve kromozom 20 üzerinde USH3B'dir[27]. Otozomal resesif olarak kalıtılan bu sendromda en sık görülen genetik lokuslar ise USH1B ve USH2A'dır.

Tablo 2 : Usher sendromu genetik tipleri [6]

Usher Tipi	Kromozom	Gen	Protein
USH1A	14q32		
USH1B	11q13.5	MYO7A	Miyozin VIIA
USH1C	11p15.1	USH1C	Harmonin
USH1D	10q	CDH23	Cadherin23
USH1E	21q21		
USH1F	10	PCDH15	Protocadherin15
USH2A	1q41	USH2A	Usherin
USH2B	3p23-24.2		
USH2C	5q14.3-21.3	WLGR1	
USH3A	3q21-25	CLRN1	Clarin

Usher Sendromuna Sıklıkla Sebep Olan Genler

USH1B

USH1B' ye sebep olan MYO7A geni Usher sendromuna sebep olan genler arasında ilk izole edilen gendir. Shaker-1 (sh-1) mutant fareleriyle yapılan deney sonucunda ortaya konmuştur [12, 35]. Sh-1 farelerinde vestibüler fonksiyon bozukluğuna işaret edecek hiperaktif yapı ve dönme hareketleri izlenirken korti organında hasar ve progresif işitme kaybı da saptanmıştır [36]. Ayrıca miyozin VIIA'yı kodlayan ekzon hem sh-1 farelerinde hem de USH1B hastalarında tespit edilmiştir [37-39].

MYO7A 48 farklı ekzon içerir. 1995'ten bu yana USH1B hastaları için 81 farklı mutasyon tespit edilmiştir [39, 40] Bu mutasyonların yarısı missense ya da çerçeve içi insersiyon/delesyon mutasyonlarıdır. 10 farklı sh-1 alelinden 7 tanesinde tespit edilen mutasyonlar insan mutasyonlarıyla benzer olarak görülmüştür [38, 41]

Miyozin proteinleri 16 farklı sınıfta incelenen bir protein ailesidir. Aktin filamentleri arasında ATP'den elde ettikleri enerjiyle hareketlerini sağlarlar. Her

miyozin proteini farklı fonksiyonel özellik gösterirken taşıyıcı moleküller, regülatör enzimler gibi sistemik önemi olan büyük proteinlerin yapısında yer alırlar [42].

İnsandaki miyozin VIIA 2215 aminoasit (aa) uzunluğundadır. Bunun 729 aa'ı proteinin baş bölümünde iken 126 aa boyun bölümündedir. Kalmodülin proteinine bağlanan 1360 aa'lık de kuyruk bölümü olan proteinin baş bölümünde ATP-aktin bağlanma bölümü mevcuttur.

USH1C

İlk olarak 1994 yılında tespit edilmiştir. USH1C harmonin proteinini kodlar ve 28 ekzon içerir. Bu zamana kadar 6 farklı mutasyon bildirilmişken bu mutasyonlardan hiçbiri missense mutasyon değildir. 2 farklı mutasyon şekli bildirilmişken birincisinde transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel süreçte problem izlenirken ikincisinde ise ekzon değişimi saptanmıştır [43-45].

USH1C genindeki ekzonların farklı transkripsiyonları sonucunda farklı harmonin izoformları üretilmektedir. Mürin deneylerinde 8 farklı harmonin izoformu tespit edilmiştir. Bunun dışında hem transmembran proteinlerinde hem de iyon kanallarında bu proteinler tespit edilmiştir [44, 46, 47]

USH1D

USH1D ilk defa Pakistanlı bir ailede yapılan genetik çalışma sonucunda tanımlanmıştır. CDH23 geni hastalığın bu tipine sebep olmaktadır. CDH23 geni 69 adet ekzon içermektedir [31, 48]

Bu genle ilgili 8 farklı bölgede mutasyon bildirilmiştir. Bunların 2 tanesi non-sense mutasyon, 1 tanesi tek-kodon mutasyonu, 1 tanesi mis-sense mutasyondur [48, 49]. USH1D tüm USH1'ler arasında en sık görülen ikinci genetik tiptir. Fakat ilginç biçimde CDH23'ün homozigot mutasyonu saptanmış olan hastalarda retinitis pigmentosa hafif olarak görülmektedir [13, 48].

CDH23 geni Kadherin-23 proteinin kodlar. Bu protein 3354 aa'ten meydana gelmektedir. 27 adet ekstraselüler kadherin tekrarı içermektedir ve bu kısım kalsiyum bağlanması için fonksiyon göstermektedir [15, 48]

USH2A

USH2A geni 21ekzondan oluşur, usherin proteinin kodlar ve ilk ekzon kodlama yapmaz. Usherin proteini 1551 aa'ten oluşmaktadır. Bu protein sinyal peptit ile başlar ve laminin zincirleri içerir. Ekstraselüler matriks yapısına katılmaktadır.

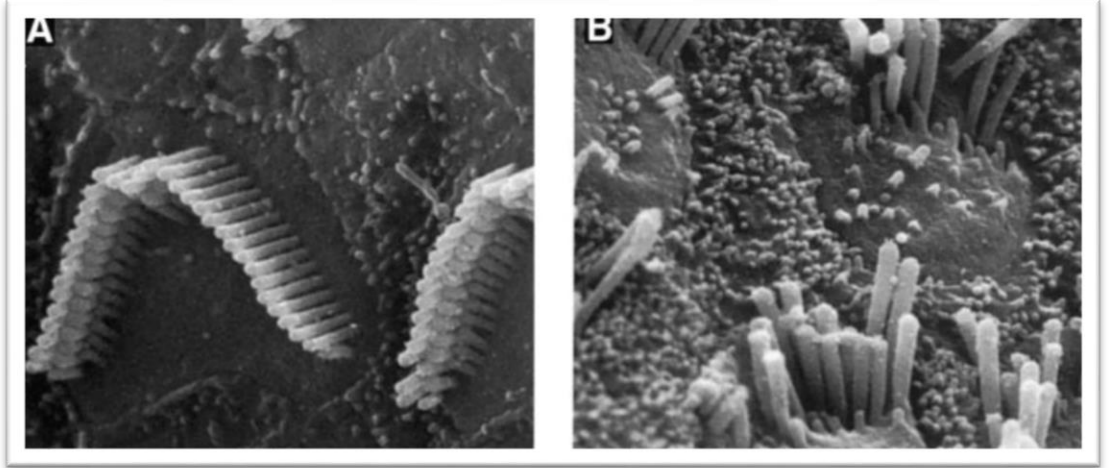
USH2A hastaları için 20 farklı genetik mutasyon çeşidi bildirilmiştir. Bunların 7'si nonsense, 7'si çerçeve kayması, 6 tanesi ise missense mutasyondur. Missense mutasyonlardan 4 tanesi laminin tip VI' yı etkilemektedir. Avrupa ve Amerika'da bu 4 farklı mutasyon çeşidininin USH2A hastalarının %20'sini etkilediği saptanmıştır. USH2A proteini'nin retina ve kohlea yapısında önemli fonksiyonlar gösterdiği düşünülmektedir [21, 50].

PATOGENEZ

Genetik olarak heterojenite gösteren bir çok hastalığı anlamak için hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda patohistolojik anomaliler araştırılmaktadır. Hastalığa sebep olan genlerin kalıtım paternleri, proteinlerin hücre içi ve hücre dışı fonksiyonları da bu çalışmalarda araştırılmaktadır. Usher sendromu gibi nadir görülen hastalıkların da genetik ve patofizyolojik kökeni bu çalışmalarla ortaya konmaya çalışılmıştır.

USHER 1B

İç kulak sensöriyel hücreleri apikal yüzeyde polarizasyon gösteren ve oldukça organize olmuş yapıda hücrelerdir. Tüysü çıkıntıları (stereosilya) olan bu hücelere tüylü hücreler adı da verilir. Bu polarizasyon farklı hücre tipleri olsa da tüm tüylü hücrelerin organize olarak fonksiyon göstermesiyle meydana gelmektedir. Tüysü çıkıntıları U, V, W şeklinde olabilirler. Kinosilyalar ise bu çıkıntıların tabanında yer almaktadır. Tüysü çıkıntıların polarizasyonu aynı zamanda kinosilyaların mekanotransdüksiyon kanallarını açmasına yardımcı olmaktadır [51]. Sh-1 mutant farelerinde mutasyon sonucunda kinosilyaların yerlerinde değişiklik olduğu ve stereosilyaların organizasyonunun da bozulduğu ve bu bozulmanın progresif biçimde ilerlediği yapılan elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda gösterilmiştir [52].



Resim 1 : A resminde normal bir faredeki stereosilya yapısı elektron mikroskobu yardımıyla gösterilmişken, B resminde sh-1 faresindeki stereosilya yapısı gösterilmiştir. Mutant farelerde miyozin proteininin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak stereosilya organizasyonunda bozukluk olduğu görülmektedir [52]

Stereosilyaların bu düzensiz pozisyonları aynı zamanda mutant marina balıklarında da gözlenmiştir. Fakat onlarda da düzensizlik olmasına karşın sh-1 farelerinin transdüksiyon yeteneklerinin kaybolmadığı mutant marina balıklarının bu yeteneği kaybettiği gözlenmiştir. Mutant farelerin mekanotransdüksiyon için stereosilya diziliminden dolayı daha fazla yerdeğişimi gerekmesine rağmen bu

fonksiyonu gösterebilmeleri USH1B hastalarında işitme kaybının temel sebeplerinden biri olarak stereosilya diziliminin olduğunu düşündürmektedir [52-54]. Ayrıca hem mutant farelerde hem mutant balıklarda aminoglikozid birikiminin engellendiği saptanmıştır. Sensöriyel hücelere aminoglikozid girişinin de mekanotransdüksiyon kanallarının açılmasında etkili olduğu düşünülmektedir [55].

Miyozin VIIA sentezi çoğunluğu epitel hücresi olan bir çok hücrede yapılmaktadır ve bu hücreler mikrovillus ya da silia içermektedir. İmmünoelektron mikroskopik incelemelerde bu hücrelerde mikrovillus ve silia boyunca miyozin VIIA olduğu ortaya konmuştur. Fare kulağında embriyonik gelişimin 10. gününde miyozin VIIA görülmeye başlanır. Daha sonra memelilerde kohleada iç ve dış tüylü hücrelerde kinosilyum ve stereosilya boyunca görüldüğü memelilerde yapılan testlerle ortaya konmuştur [56-58].

Miyozin VIIA'nın hücre içindeki düzeyi mutant fare ve balıklarda görülen fenotipik anomalilerin anlaşılmasında yardımcı olmaktadır. Dictyostelium discoideum amoeba'daki miyozin VIIA proteini memelilerdeki miyozin VIIA ile benzerlik göstermektedir. Mutantlarda fagositoz ve migrasyonun arttığı adhezyonda ise problem olduğu ortaya konmuştur [59, 60].

Bununla birlikte MiyozinVIIA'nın C terminal bölümünde 2 farklı alt ünite bulunmaktadır. Bunlardan ilki cAMP bağımlı protein kinazdır e cAMP bağımlı fosforilasyonda rol alır. İkinci kısma ise vezatin adı verilmiştir ve hücre adezyonunda görev alır. Miyozin VIIA tüysü hücreler ve destek hücreler arasında vezatin sayesinde bağlanarak yüzey gerilimi oluşturur ve hücre adezyonunu sağlar. Aynı zamanda stereosilyanın tabanında vezatin olduğu gösterilmiştir. Vezatin-Miyozin VIIA kompleksi stereosilyanın kasılmasında ve adezyonunda görev alırken mutant hayvanlarda stereosilyada görülen fonksiyon kaybının sebebi olarak miyozin VIIA yapısında bozukluk gösterilmektedir [61-63].

Sh-1 farelerinde kinosilyumların pozisyonunda da anormallik izlenmektedir. Mikrotübül ve mikrofilamanlardaki asimetrik dizilim kinosilyumun alması gereken son periferik pozisyonunu da engellediği için bu hücre bağlantılarında polarizasyon sağlanmasında da problem oluşmaktadır [64].

Fare retinasında ise Miyozin VIIA embriyonik gelişimin ilk olarak 12. haftasında optik çukurun dış tabakasında görülmektedir. Pigment epitel hücreleri de bu tabakadan oluşmaktadır. Miyozin VIIA hem fotoreseptör hücrelerde hem de pigment epitel hücrelerinin apikal kısmında lokalize edilmiştir. Fotoreseptör hücrelerde protein siliaların periferinde izlenirken aynı zamanda tavuk deneylerinde de fotoreseptörlerin sinaps bölgelerinde de tespit edilmiştir [58, 65, 66]

Sh-1 mutant farelerinde hiçbir yaşta retinada dejenerasyon gözlenmemiştir. Fakat patolojik alel taşıyan bazı mutant farelerde Elektoretinografide (ERG) anormallik olduğu saptanmıştır. Fagozomlar normal olarak izlenirken mutant farelerde melanozomlar normal farelerde bulunduğu şekilde apikal yüzde izlenmemiştir. Sh-1 farelerinde morfolojik olarak fotoreseptör anomalisi de tespit edilmemişken opsin döngüsünde azalma olduğu ortaya konmuştur. Bunun sebebi olarak da miyozin VIIA ve aktin proteinlerinin opsin transportunu kolaylaştıran etmenlerden olması gösterilmiştir [67-69].

RP hastalarında görme kaybı fotoreseptör dejenerasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda bir çok RP hastasında fotoreseptör hücrelerde ya da retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinde kayıp olduğu ortaya konmuştur. USH1B hastalarında görülen retinal dejenerasyonun hücresel kökenine inildiğinde iki hücre tipinde de miyozin VIIA ekspresyonunun olduğu görülmüştür. RPE hücrelerinde görülen melanozom transportundaki kaybınsa USH1B hastalarında görülen retinal dejenerasyonun sebebi olmadığı düşünülmektedir. Bununla beraber RPE hücrelerinde görülen fagositoz fonksiyonunun yanında miyozin VIIA yapısı insana benzer olarak tespit edilmiş olan ameoba mutantlarında görülen anormal fagositoz fonksiyonunun da hastalığın kökeniyle ilgili olabileceği düşünülmektedir [59, 67, 70]

USHER 1C

Ush1C tüm mürin deneylerinde üretilmiş, göz, iç kulak ve böbrekte yüksek miktarda tespit edilmiştir. Harmonin proteini ise iç kulaktaki tüm tüylü hücrelerde

bunun yanıdaysa tüm stereosilya boyunca ve retinada fotoreseptör tabakada gösterilmiştir [43, 44].

Fakat USH1C hastalarındaki retinal ve kohlear patolojinin primer olarak sensöriyel hücrelerdeki defektten kaynaklandığı düşünülmektedir. İç kulakta göze göre çok farklı şekilde transkripsiyon çeşitliliği saptanmışken iç kulaktaki bazı kodlamaların gözde olmadığı görülmüştür. Günümüzde yeterli hayvan çalışması olmadığı için USH1C'nin patogenezi hakkında kısıtla sayıda bilgi mevcuttur. Fakat harmonin proteiniyle miyozin VIIA arasındaki ilişkinin bu hastalığa sebep olabileceği düşünülmektedir. İki proteinin defektinde de benzer fenotip ortaya çıkmaktadır. İki protein de benzer hücrelerde ve ortak olarak mikrovilluslarda bulunmaktadır. Önümüzdeki yıllarda harmonin proteininin bağlandığı transmembran proteinlerle ilgili yapılabilecek çalışmalarla veya hayvan deneylerinin sayısının artırılmasıyla beraber bu hastalığın patogenezi hakkında daha fazla bilgi edinilebileceği düşünülmektedir [6].

USHER 1D

CDH23 transkripsiyonu mürin dokularında oldukça çeşitli varyasyonlarla gerçekleşmektedir. Bu gen retina yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. İç kulakta da tüylü hücrelerde tespit edilmiştir. Waltzer mutantlarında kinosilya ve stereosilya pozisyonlarında defekt izlenmiştir. Kadherin proteininin hücre içi fonksiyonları net olarak bilinmemekle beraber intermembran etkileşimlerinde fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Ayrıca miyozin VIIA ve kadherin23 proteini adhezyonda ve hücre iskeletinin sağlanmasında birlikte görev almaktadır. Sh-1 deneylerinde double heterozigot farelerde 3-6 ay içinde sağırılık gelişirken single heterozigot farelerde sağırılık gelişmediği gösterilmiştir [71-73]

USH1B ve USH1D fare modellerinin bazılarında retinal dejenerasyon izlenmezken sağırılık görülmüştür. Bu farelerde miyozin VIIA, harmonin ve kadherin 23 proteininin hücre içi veya membrandaki lokalizasyonunun tam anlamıyla tespit edilemediği için USH1'de görülen retinitis pigmentosanın sebebi halen tam anlaşılabilmiş değildir.

RP görülmeyen sh-1 ve waltzer sağır mutant farelerinde USH1 geni transkripsiyona uğramaktadır. Miyozin VIIA insada hem sinaptik birleşme noktalarında hem müller glial hücrelerinde hem de fotoreseptör hücre tabakasının iç segmentinde bir dizi reaksiyonda görev almaktadır. Fotoreseptör hücre tabakasında görülen bu reaksiyon farelerde görülmemektedir. İnsanda RP görülmesine rağmen bazı mutantlarda görme kaybı izlenmemesinin nedeninin bu olduğu düşünülmektedir [6, 74].

USHER 2A

USH2A ile ilgili henüz yapılmış bir hayvan çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca insitu çalışmalarda da USH2A transkripsiyonu fotoreseptör hücrelerde de işitmede görev alan nörosensöriyel hücreleride tespit edilememiştir. Fakat RPE hücrelerinde ve kohleadaki epitel hücrelerinde ortaya konmuştur. İmmünohistolojik çalışmalar retina ve kohleada usherin proteinin retina ve kohleada bazal membranda bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar USH2A geninin kohlea ve retinadaki sensöriyel hücrelerde defekte sebep olduğunu düşündürmektedir [75].

Usher sendromunun patogeneziyle ilgili yapılmış tüm bu çalışmalar hastalığın çok çeşitli alt tipi olsa da tüm alt tiplerinde benzer sinyal yollarının etkilendiğini ortaya koymuştur. Bununla beraber kinosilya ve stereosilya organizasyonundaki problem de bu sendromun ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Hastalığın patogenezinin tüm detaylarıyla ortaya konması günümüzde önemi ve sıklığı gittikçe artan gen tedavilerinin bu sendroma sahip hastalarda da başarıyla uygulanmasının önünü açacaktır.

TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Hem RP hem de Usher sendromu için son dönemde bir çok tedavi yöntemi araştırılmakta ve uygulanmaktadır. Bu hastalıkların tedavisi sürecinde hastaları tedavi etmenin yanında tedavi güvenliğini sağlamak da önemli bir konudur.

Göz anatomik, fizyolojik ve immünolojik açıdan bir çok tedavide klinisyenlere avantaj sağlamaktadır. İç organların aksine kolay erişilebilir olması, gerekli tedavi dozunun az olması, immünolojik açıdan bir çok organa göre daha az yan etki potansiyelinin olması ve kan retina bariyeri sayesinde sistemik dolaşımdan ayrılması tedavi açısından gözü avantajlı hale getirmektedir. Retinal hücreler normal olarak bölünmediği için, hücre popülasyonunda değişim olmaması sürekli transgen ekspresyonu için bütünleştirici olmayan vektörlerin kullanılmasına imkan sağlamaktadır. [76].

Bunlarla birlikte gözün bir diğer avantajı ise kontralateral göz sayesinde tedavi etkinliği ve güvenliği diğer organlara göre daha rahat biçimde kontrol edilebilmektedir. Ayrıca yeni geliştirilen görüntüleme modaliteleri sayesinde mikrovasküler ve histolojik düzeyde de anatomik ve fonksiyonel değişimleri klinisyenlerin kontrol etme şansı da geçmişe göre artmıştır.

Usher sendromu genetik açıdan ciddi heterojenite içeren bir patolojidir. Bu zamana kadar bilinen yüzlerce mutasyonun yanında literatürdeki çalışmaların çoğunluğunda araştırılan hasta popülasyonunun ortalama yarısında hastalığa sebep olan mutasyon tespit edilememektedir. Genetik olarak gözükten bu varyasyonun yanında genetiğin fenotipe yansımada da ciddi varyasyonlar görülmektedir. Bu durumlar gen tedavisi açısından Usher sendromu tedavisini daha zor bir hale getirmektedir. Spesifik göz durumları için en etkili tedavi yaklaşımları, kalan fotoreseptörlerin sayısına bağlıdır [77]. Fotoreseptörleri kurtarma stratejileri, erken aşamalarda düşünülmeli ve ileri aşamalarda ışık sinyal iletim yolu göz önünde bulundurulmalıdır.

Erken aşamada, nöroprotektif maddelerin kullanıldığı farmakolojik tedaviler, fotoreseptör ve RPE hücre kaybının ilerlemesini geciktirebilir. Farmakolojik tedavi iyi tolere edildiği ve yan etkisi görece daha az olduğu için, erken evrede sık tercih edilir ancak ek bir tedavi olarak tüm aşamalarda da kullanılabilir.

Fakat farmakolojik tedavi Usher sendromunun temel patogeneze yönelik bir tedavi değil daha çok destek amaçlı kullanılan bir tedavidir. Bu bağlamda Usher sendromu için en doğru tedavi hastalık genetik kökenli bir hastalık olduğu için gen tedavileridir. Günümüzde gen tedavileri hastalıkların progresyonunu engellemek

açısından umut verici sonuçlar ortaya koysa da anatomik ve fonksiyonel olarak halihazırdaki tahribatın geri dönüşümünü sağlamak konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden fotoreseptör ve nörosensöriyel hücre kaybı ilerlemeden tedaviye başlamak önem arz etmektedir. Ancak gen tedavisi için uygulanan prosedürlerin risklerinden dolayı ilk aşamada bu tedaviler denenmemekte ve doğru hasta seçimi ciddi bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. İlaç şirketleri, dünya genelinde nispeten az sayıda hastayı etkileyen nadir RP ve USH genlerini hedef alan gen terapisinin onay sürecinin karmaşık olması ve yüksek maliyetleri nedeniyle, gen tedavilerine temkinli yaklaşmaktadır [78].

RP'nin ileri aşamalarında ise ciddi fotoreseptör kaybı izlenir, ancak gangliyon hücrelerini içeren birçok ikinci ve üçüncü dereceden nöronlar sağlam kalabilir. Bu nedenle, hücre transplantasyonu veya optogenetik ile yeni fotosensörlerin oluşturulması veya retinal protez ile diğer nöronlara görsel sinyallerin iletilmesi sağlanabilir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin klinik etkinliği, alınan risk ile karşılaştırıldığında, çok da fazla olmadığı için hastalığın ilerlemiş aşamalarında, hastalara iyi bir vizyon sağlamak için daha fazla teknolojik gelişme gerekmektedir.

Usher sendromu hastaları retinitis pigmentosa hastalarıyla kıyaslandığında ciddi işitme kaybına da sahip oldukları için çok daha dramatik bir klinik tablo ortaya koymaktadır. Fakat gen tedavileri açısından aslında daha umut verici olan hasta profili Usher sendromu hastalarıdır. Usher sendromu hastalarının ciddi bir çoğunluğu henüz doğumdan itibaren ciddi işitme kaybı yaşadıkları için RP kliniği ortaya çıkmadan önce tanı alma imkanları bulunmaktadır. Gen tedavilerinin anatomik ve fonksiyonel tahribatı tedavi etme de yetersiz kaldığı ve asıl amacın hastalık henüz başlamadan bu tedavilere başlamak olduğu düşünüldüğünde USH hastalarının gen tedavileri için daha doğru bir popülasyon olduğu düşünülmektedir.

Farmakolojik Tedaviler

Farmakolojik tedavide öncelikli olarak nöroproteksiyon sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla bir çok tedavi denenmektedir. (silyer nörotrofik faktör (CNTF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF))

[79]. Apoptozu önlemek veya yavaşlatmak amaçlı antiapoptotik ajanlar; tauroursodeoksikolik asit (TUDCA), rasajilin, norgestrel ve myriocin hayvan modellerinde olumlu sonuçlar vermiştir [80-84]. Retinanın yüksek metabolik aktivitesinden dolayı özellikle fotoreseptör hücrelerde antioksidan tedaviler kullanılmaktadır [80]. Antioksidan ajanlar arasında, A vitamini, DHA (Docosahexaenoic asit), lutein ve N-asetilsistein, büyük ölçekli, uzun süreli randomize klinik çalışmalarla incelenen farmakolojik ajanlardır [84-86]. Bazı hastalarda izlenen KMÖ için de non-steroid ve steroid ajanlar, anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (anti-VEGF) ajanlar kullanılabilir [87, 88].

Kök Hücre Tedavileri

Kök hücre transplantasyonu retina dokusunda sağlıklı olarak kalmış diğer hücreye bağlanabilen bunun yanında da fonksiyon görmeyen hücrelerin yerine geçebilecek hücreleri hastaya transfer etmek olarak tanımlanabilir [89]. Retina fotoreseptör hücre öncülleri ve farklılaşmış embriyonik kök hücreler kök hücre tedavileri için iki temel kaynağı oluşturmaktadır [90]. Kök hücreler, embriyonik kök hücreler (ESC), uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC) gibi eksojen kaynaklardan veya endojen kökenli bir kaynaktan türetilir [91]. Kök hücrelerin retinal hücreler dahil olmak üzere hemen hemen tüm dokulardaki hücelere dönüşebilmesi bu tedavi yönteminin en önemli avantajıdır.

RP tedavisi için kök hücre nakliyle ilgili oldukça az sayıda klinik çalışma mevcuttur ve bu tedavinin etkinliği henüz tam olarak kanıtlanamamıştır. Yakın zamana kadar, RP tedavisi için hücre transplantasyonunun çok az sayıda klinik çalışması olmuştur ve ara raporlarda olumlu sonuçlar bildirilmesine karşın etkinliği henüz tam olarak kanıtlanmamıştır [92]. Yeni kanserojen hücrelerin ortaya çıkması, hücrelerin yeniden programlanması ve gelişen immünolojik reaksiyonlarla beraber aynı zamanda ortaya çıkan etik sorunlar teorik olarak başarılı olma ihtimali yüksel olan bu tedavi yönteminin karşısındaki en büyük engeller olarak ortaya çıkmaktadır [76].

Gen Tedavileri

Usher sendromu gibi genetik kökenli hastalıklarda hastadan hastaya farklılık gösteren bir çok varyasyon hastaların tamamını kapsayan bir tedavi modalitesi ortaya konmasına engel olmaktadır. Mutasyonlar normal proteinin yokluğuna veya fonksiyonel olarak inaktif bir proteinin üretilmesine yol açtığı için gen tedavisiyle replasman yapılması başarılı sonuçlar vermektedir. Böylece, mutasyona uğramış genin azalan aktivitesinin artırılması veya genin değiştirilmesi hastalık semptomlarını hafifletebilir [93]. Fakat teorik olarak ortaya konan bu çıkış yolu sayesinde sağlıklı protein dokulara ne düzeyde enjekte edilirse edilsin mutant proteinlerin yol açtığı tahribatı engellemede yetersiz kalabilmektedir [94]. Bu durum her hastanın mevcut durumunu klinik ve genetik varyasyonlarını ve tedavi ihtiyaçlarını göze alarak hasta spesifik tedavi yöntemleri ortaya konmasını zorunlu kılmaktadır.

Gözün anatomik açıdan kolay ulaşılabilir olması ve daha önce belirtildiği üzere immünolojik açıdan diğer organlara göre nispeten daha güvenli olması gen tedavisiyle ilgilenen insanlar için gözü tercih sebebi yapmaktadır. Literatürde bildirilen ilk gen tedavisi 2008 yılında Leber Konjenital Amarozisli bir hastada adenoviral vektör yardımıyla yapılan gen tedavisidir[95, 96]. Ardından bu hastalarda herhangi bir yan etki izlenmeden kontralateral gözde de görme keskinliğinin arttığı da aynı otörler tarafından bildirilmiştir [97] .

Günümüzde yurtdışında bir çok merkezde Usher sendromuna sahip hastaların çoğunun doğuştan işitme kaybına sahip olmasından dolayı, bu hastalar genetik taramaya alınarak Usher sendromu tanısı konmakta ve gen tedavisi için henüz gözde deformasyon başlamadan aday haline gelmektedirler.

Usher sendromuyla ilgili yapılan ilk gen tedavisi in-vivo olarak lentiviral vektörler yardımıyla MYO7A geni için yapılan gen tedavisidir. MYO7A'nın hem RPE'de hem de fotoreseptör hücrelerde bulunduğu bilinmektedir. MYO7A mutasyonuna sahip olan farelerde subretinal aralığa lentiviral vektör yardımıyla yapılan enjeksiyonun başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir [98].

Klasik olarak viral vektör yardımıyla yapılan gen tedavilerinde uzun yıllardır adenoviral vektörler kullanılmaktadır. Fakat adenoviral vektörler 5 kb' tan daha büyük genlerin taşınması için yeterli olmamaktadır. MYO7A'yı kodlayan sekans ise 6.7 kb büyüklüğündedir. Bazı hastalıklarda parçalanmış genomu farklı adenoviral vektörler yardımıyla transfer ederek yapılan bazı gen tedavileri klasik adenoviral vektörler yardımıyla yapılan tedavilerle kıyaslandığında ve fenotipe yansıyan sonuçlar incelendiğinde de başarılı sonuçlar vermektedir [99, 100].

Tüm Usher sendromuna sebep olan genler ve kodladıkları proteinler oldukça çeşitli varyasyonlar göstermektedir. Farelerde yapılan deneyler başarılı sonuçlar vermiş olsa da bu proteinlerin insandaki izoformlarının farelerdekiyle gösterebileceği muhtemel farklılıklar insanda yapılacak olan tedavilerin başarısı açısından soru işaretlerine sebep olmaktadır [57].

Günümüzde gen tedavileri için iki temel yöntem olarak non-viral ya da viral vektörler kullanılmaktadır. Usher sendromu hastaları için temel olarak viral vektör aracılı gen tedavileri daha çok tercih edilmektedir.

Non-viral Vektör Aracılı Gen Tedavileri

Non-viral vektörler, viral vektörlere nazaran daha önce yapılmış çalışmalar göz önüne alındığında daha başarısız sonuçlar vermişlerdir. [101].Fakat son dönemde nanoparçacık kullanılarak yapılan çalışmalar eski tedavi yöntemlerine göre daha başarılı olmuş ve gelecekte bu yöntemin kullanılması açısından umut verici sonuçlar ortaya konmuştur [102]. Çıplak DNA, DNA kapsülleyici lipozomlar, sıkıştırılmış DNA nanopartikülleri genel anlamıyla tamamlayıcı roller üstlenen viral olmayan taşıyıcı moleküllerdir [103]. Bu yöntemler genel anlamıyla daha büyük gen sekanslarının DNA parçalarıyla taşınmasına olanak verir ve viral vektörlerde ortaya çıkan immünolojik reaksiyon riski bu yöntemlerde olmadığı için bu açıdan daha güvenlidirler [102, 104]. Ayrıca bu durum uygulama dozununun viral vektörlerde olduğu gibi sınırlanmamasından dolayı avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca intravitreal enjeksiyon yapıldığında retina içi dokulara viral vektörlere göre daha fazla geçiş göstermesi yine bu yöntemin avantajlarından. Fakat uzun süreli gen ekspresyonu

eksikliği, bu vektörlerin önemli bir sınırlamasıdır [105]. Nano-taşıyıcıların son teknolojik gelişmelerine rağmen, viral olmayan vektör sistemi kullanan çalışmaların sayısı, viral vektörlere sahip olanlardan önemli ölçüde daha düşüktür. Viral olmayan vektör sistemlerinin geliştirilerek viral vektör sistemlerinin mevcut sınırlamalarının üstesinden gelme potansiyeli vardır. Kullanımları şimdiye kadar sınırlı olmasına rağmen, artırılmış etkinlik için geliştirilmeleri onları gelecek yıllarda gen teslimatı için çok yönlü araçlar haline getirebilir.

Adenoviral Vektörler Yardımıyla Yapılan Gen Tedavileri

Nispeten büyük genetik sekansları taşıyabilmeleri, transükdisyona engel olmayan yapıları gözde kullanılan gen tedavileri açısından adenoviral vektörleri tercih sebebi yapmaktadır. 1996 yılında Bennett ve arkadaşları rd1 fare modelinde fosfodiesteraz alt ünitelerini adenoviral vektör yardımıyla fotoreseptör hücrelere implante ederek fotoreseptör dejenerasyonunu 6 hafta geciktirmiş ve ilk başarılı sonuçları ortaya koymuşlardır [106, 107].

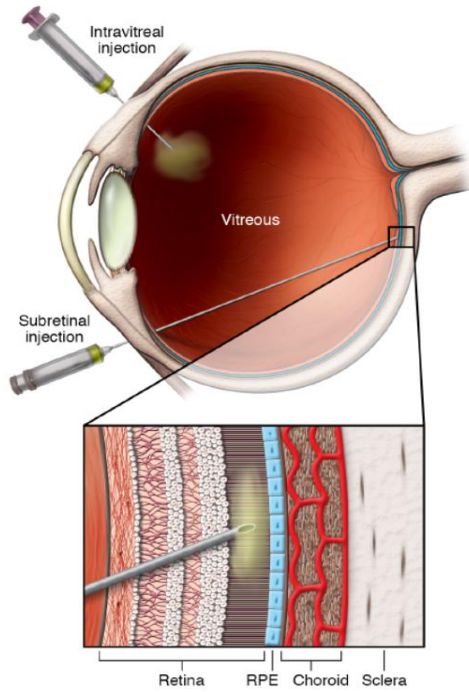
Adenoviral vektör kullanımının önünde iki temel engel vardır. Bunlardan ilki daha önce bahsedildiği üzere taşınabilecek baz sayısının Usher sendromu tedavisi için engeller oluşturması ikincisi ise bu vektörlere karşı insan dokularının gösterdiği immünolojik reaksiyondur. Özellikle Aa5 serotipine karşı belirgin immün reaksiyon geliştiği bildirilmiştir. Fakat cerrahi teknik olarak ve komplikasyon riski açısından düşünüldüğünde daha zor bir uygulama olmasına karşın, intravitreal uygulama yerine subretinal uygulama yapıldığı durumlarda daha düşük şiddette reaksiyon görüldüğü ve daha başarılı sonuçlar alındığı ortaya konmuştur [108-110]. Ayrıca yapılmış bazı fare ve sıçan deneylerinde adenoviral vektörler yardımıyla yapılan tedavilerin koroidal ve retinal neovaskülarizasyonu geriletmediği, fare modeliyle yapılan bir çalışmada ise retinoblastom büyümesini durdurduğu gösterilmiştir [111, 112].

Adenoviral vektör kullanımının en önemli avantajlarından biri de uzun etki süreleridir. Yapılmış hayvan çalışmalarından birinde 11 yıl boyunca etki gösterdiği ortaya konmuş bunun yanında Leber konjenital amarozis hastasına yapılmış tedavide 6 yıl sonunda etkinin devam ettiği gösterilmiştir [113]. Son dönemde yapılan

çalışmalarda da daha önce bahsedildiği üzere genlerin parçalanarak farklı adenoviral vektörler yardımıyla taşınarak yapılan tedavilerde de başarılı sonuçlar alınmış olması adenoviral vektörlerin gen tedavisindeki yerini önümüzdeki yıllarda da koruyacağını göstermektedir.

Lentiviral Vektörler Yardımıyla Yapılan Gen Tedavileri

Lentivirüsler Retroviridae ailesine mensup olan RNA virüsleridir. Konak genomuna reverse transkriptaz ve integraz enzimleri sayesinde entegre olurlar. İnsan klinik çalışmalarında kullanılan ilk lentivirus Enfeksiyöz anemi virüsüdür ve yapılan çalışmalarda insanda kullanımının etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir. 5 kb'a kadar genom transferine olanak sağlayan klasik adenoviral vektörlerle kıyaslandığında 9 kb'a kadar olan kapasiteleri sayesinde ön plana çıkmaktadırlar. Yine adenoviral vektörlerde olduğu gibi uzun süren etki potansiyeli bu vektörlerin avantajlarından biridir [114].



Resim 2 : İntravitreale enjeksiyon uygulama açısından daha kolay olması ve komplikasyon riskinin daha düşük olmasından dolayı avantajlıyken, immün reaksiyona daha fazla sebep vermesi ve dokulara geçen doz miktarının ayarlanmasında oluşan problemlerden dolayı dezavantajları vardır. Subretinal enjeksiyonla yapılan tedavilerde daha başarılı sonuçlar bildirilmiş olmasına karşın uygulama sırasında görülebilecek komplikasyonlar bu yöntemin dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır [115].

Usher Sendromu İçin Uygulanan Gen Tedavileri

Usher sendromunun patogenezi araştıran çalışmalar sonucunda USH1B hastalarında MYO7A sağlıklı biçimde fonksiyon gösteren MYO7A proteininin olmadığı ve MYO7A'nın fonksiyonları açıkça ortaya konduğu için USH1B hastaları gen replasman tedavileri için oldukça uygun adayla haline gelmişlerdir [116]. MYO7A'nın byklğden dolayı ilk tedavilerde adenoviral vektörler kullanılamamış ve lentiviral vektörlere yönelinmiştir. Fakat son dönemde çift adenoviral vektör (AAV) kullanılarak gen tedavileri yapılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar bildirilmiştir [100].

Lentiviral vektörler 10kb'a kadar büyüklükteki genleri taşıyabilmeleri ve etki sürelerinin uzunluğu nedeniyle MYO7A için yapılan gen terapilerinde tercih sebebi olmuştur. Bu zaman kadar yapılan çalışmalarda iki farklı lentiviral vektör kullanılmıştır. Bunlar HIV (Human Immunodeficiency Virus) ve EIAV (Equine Infectious Anaemia Virus) virüsleridir.

HIV Vektörleriyle Yapılan Gen Tedavileri

HIV-1 vektörüyle yapılan ilk gen tedavisi denemesi 1997 yılında yapılmıştır. Ardından Hashimoto ve arkadaşları subretinal enjeksiyon ile bu vektörü fare deneylerinde RPE ve fotoreseptör hücrelere enjekte etmişlerdir. MYO7A proteini RPE'de tespit edilmesine karşın fotoreseptör hücrelerde izlenmemiştir. Ancak mutant farelerde fenotipe yansıyan düzelme izlenmiş ve enjeksiyon bölgesinin yakınında 3 hafta sonra protein tespit edilmiştir [98, 117-119].

Lentivirslerin integrasyona zemin oluşturan yapısı ve insersiyonel mutasyonlara sebebiyet verebilmesinden dolayı bu tedavilerden dolayı fonksiyon gören genin tahribata uğraması ya da anormal gen ekspresyonunun aktivasyonu görülebilmektedir. Bu varyasyonlar tüm genetik tedavi çeşitlerinde görülmesine

karşın vektörün tipi ve hedef doku bu varyasyonların çeşitlerinde etkili olmaktadır. Hedef dokuya tam olarak ulaşabilmek henüz mümkün olmasa da önümüzdeki yıllarda aktif olmayan DNA bölgelerine implantasyon yapılabilmesi başarıyı arttıracaktır [120].

EIAV Vektörleriyle Yapılan Gen Tedavileri

HIV vektörleri yardımıyla yapılan gen tedavileriyle kıyaslandığında EIAV vektörleri yardımıyla yapılan tedavilerde etkinin daha hızlı başladığı izlenmiştir. Ayrıca gen ekspresyonu tedaviden 16 ay sonra dahi hem RPE hem fotoreseptör hücrelerde görülmüş ve fenotipe yansıyan düzelme de saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise enjeksiyonun ardından MYO7A hem RPE hem fotoreseptör hücrelerde mutant olmayan farelerde saptanan düzeyde saptanmış ve yine fenotipe yansıyan başarı elde edilmiştir. Fakat bazı farelerde tedavi sonrası bazı bölgelerde fotoreseptör yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür [121, 122].

Başka hastalık gruplarıyla ilgili yapılan prelinik araştırmalarda deney hayvanlarına HIV vektörleri yardımıyla Faktör 9 verilmesinin ardından karaciğer tümörü geliştiği görülmüştür [123]. Etki ve yan etki profili göz önüne alındığında EIAV vektörleri, HIV vektörlerine göre daha uygun bir seçim olarak öne çıkmaktadır.

Adenoviral Vektörlerle Yapılan Gen Tedavileri

Uzun yıllardır gen tedavilerinde en sık kullanılan vektörler adenoviral vektörler olmuştur. Serotip 2 ve Serotip 5 bu zamana kadar en sık kullanılan vektörlerdir. Uzun süren etki potansiyeli, fotoreseptör etkinliğini arttırmaları, toksik etkilerinin az olması tercih sebebi olmalarını sağlamıştır. Ancak daha önce bahsedildiği üzere 5 kb' tan daha büyük genomların transferinde yetersiz kalmaları araştırmacıları farklı arayışlara yönlendirmiştir [124].

Genlerin sadece esansiyel elemanlarını içeren kısımlarını vektörler yardımıyla implante edilmesi denenmiş ancak protein denatürasyonuna sebep olması ve başarılı sonuç elde edilememesinden dolayı bu yöntemden vazgeçilmiştir [125]. Adenoviral vektör serotip 5 MYO7A geninin taşınmasında yeterli olmuş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir ancak AAV2 tüm genomu tek başına transfer edemediği için iki farklı vektöre genomu bölerek aynı anda enjeksiyonu yapılmış diğer patolojilerin aksine Usher sendromunda başarılı sonuç elde edilememiştir. Gen tedavilerinde kullanılan tekniklerin gelişmesiyle beraber çift vektörle yapılan tedavilerde başarı ihtimalinin artacağı düşünülse de günümüzde tek vektörle yapılan tedavi daha uygun gözükmektedir [100, 126].

Tablo 3 : Çeşitli gen tedavi yöntemleri ve başarıları[127]

	Lentiviral Vektör		Adenoviral Vektör		
	HIV	EIAV	AAV2	AAV5	AAV8
MYO7A taşınması	Tek vektör	Tek vektör	Çift vektör	Tek vektör	Çift vektör
Genom integrasyonu	+	+	-	-	-
Hedef	RPE	RPE,FR	RPE,FR	RPE,FR	RPE,FR
Fenotipe Yansıyan Başarı					
RPE	Mozaik pattern	Mozaik pattern	Mozaik pattern	+	Mozaik pattern
Fotoreseptör hücre (FR)	+	+	+	+	Bilinmiyor

Hastalara Uygulanan Gen Tedavileri

Hayvan deneyleri sonucunda elde edilen başarılı sonuçlar araştırmacıları insanlarda da gen tedavisi yapma konusunda motive etmiştir. Şu an halihazırda devam etmekte olan UshStat çalışması da 2012 yılında başlamış ve 2021 yılında sonlandırması planlanmakta olan bir çalışmadır. Çalışma kapsamına 28 adet USH1B

hastası dahil edilmiş ve bu hastalara lentiviral vektörler yardımıyla (SAR 421869 (Oxford Biomedica's LentiVector® , Sanofi)) MYO7A genomu subretinal olarak enjekte edilmiştir. Çalışmanın sonuçları henüz yayınlamamıştır. Bizim de bu tez çalışmamız sonucunda 7 hastamızda MYO7A geninde mutasyon bulmuş olmamız hastalarımıza bu çalışmanın olası başarılı sonuçları sayesinde yeni bir tedavi imkanı sunabilecek olmamızdan dolayı heyecan vermektedir.

RP ve Usher sendromu hastalarında halihazırda devam eden gen tedavisi çalışmalarının listesi (Tablo 4) aşağıdaki gibidir.

Tablo 4: RP ve Usher sendromu ile ilgili devam eden gen tedavisi çalışmaları (ClinicalTrials.gov/Mayıs 2019 itibariyle)

	ÇALIŞMA İSMİ	HASTALIK	MÜDAHALE	UYGULAMA MERKEZİ
1.	A First-in-human, Proof of Concept Study of CPK850 in Patients With RLBPI Retinitis Pigmentosa	RP	Biological: CPK850	Novartis Investigative Site Stockholm, Sweden
2.	Safety and Efficacy Study in Patients With Retinitis Pigmentosa Due to Mutations in PDE6B Gene	RP	Biological: AAV2/5-hPDE6B	Clinique Ophtalmologique, CHU de Nantes, France
3.	Dose-escalation Study to Evaluate the Safety and Tolerability of GS030 in Subjects With Retinitis Pigmentosa	RP	Combination Product: Gene therapy: GS030-DP and Medical device: GS030-MD	
4.	Safety and Efficacy of rAAV2tYF-GRK1-RPGR in Subjects With X-linked Retinitis Pigmentosa Caused by RPGR-ORF15 Mutations	XLRP	Biological: rAAV2tYF-GRK1-RPGR	Duke Eye Center Durham, North Carolina, United States / Casey Eye Institute, Oregon Health and Sciences University Portland, Oregon, United States / University of Pennsylvania Scheie Eye Institute Philadelphia, Pennsylvania, United States
5.	Gene Therapy for X-linked Retinitis Pigmentosa (XLRP) Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR)	XLRP	Genetic: AAV-RPGR	Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust London, United Kingdom
6.	A Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for X-linked Retinitis Pigmentosa	XLRP	Biological: AAV-RPGR	Manchester Royal Eye Hospital Manchester, United Kingdom Oxford Eye Hospital Oxford, United Kingdom
7.	Long-Term Follow-Up Gene Therapy Study for Leber Congenital Amaurosis OPTIRPE65	LCA	Biological: AAV OPTIRPE65	Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust London, United Kingdom

8.	Clinical Trial of Gene Therapy for the Treatment of Leber Congenital Amaurosis (LCA)	LCA	Biological: AAV RPE65	Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust London, United Kingdom
9.	Study of UshStat in Patients With Retinitis Pigmentosa Associated With Usher Syndrome Type 1B	RP, USHER	Genetic: LV-MYO7A	Portland, Oregon, United States / Paris, France

Retinal Protezler

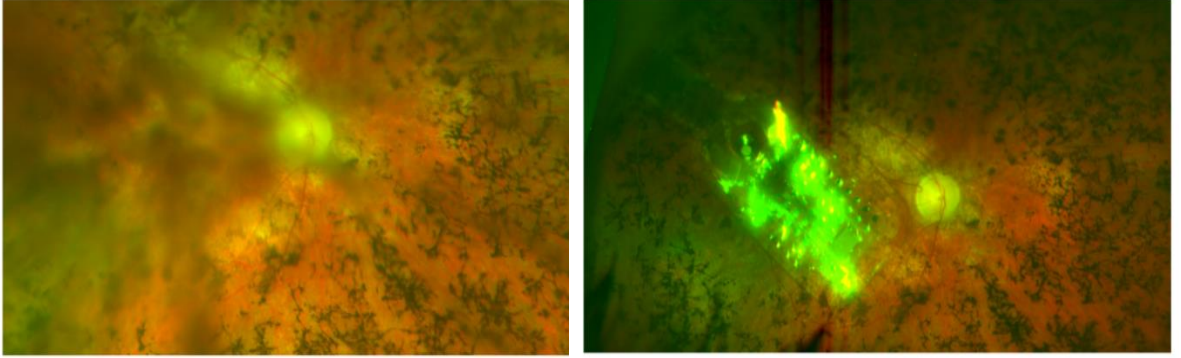
Usher sendromu ve dolayısıyla RP hastalarında sayısı ve fonksiyonu oldukça azalmış olan fotoreseptör hücre etkinliğinin artırılması için retinal protezlerin bir tedavi stratejisi olarak ortaya konmasının ardından bu alanda hızlı bir ilerleme kaydedilmiştir [128]. Retina protezleri harici bir güç kaynağı olmadan ışıkla aktive edilen bir pasif stimülasyon cihazı veya uyarıcının yazılım ile kontrol edilebildiği aktif bir stimülasyon cihazı olarak ve genellikle elektrodların bulunduğu göz içi pozisyonuna göre epiretinal, subretinal ve suprakoroidal protezler olarak sınıflandırılır [129]. Argus II ve Alpha-IMS olmak üzere iki farklı ticari formu olan retinal protez mevcuttur ve ikisiyle ilgili de RP hastalarında uzun dönem klinik sonuçlarda başarılı olduğu bildirilmiştir.

Argus II Retinal Protez Sistemi (Second Sight Medical Products, Sylmar, CA), retinitis pigmentosa (RP) başta olmak üzere dış retina dejeneratif hastalıkları olan hastalara yapay görme sağlamak için tasarlanmıştır. Bu protez ilk olarak çoğu son evre olan 30 RP hastasına implante edilerek denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. [130]. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylandıktan ve piyasaya sürüldükten sonra bu sistem tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [131].

Alfa-IMS (Retina Implant AG, Reutlingen, Almanya) ise subretinal olarak implante edilen kablosuz bir protez sistemidir. 25 retinitis pigmentosa hastasının dahil edildiği çalışmanın sonucunda hastaların yüzde 45'inde yaşam kalitesinde artış olduğu ortaya konmuştur. Sonuçlar Alpha-IMS'nin, ileri kalıtsal retinal

dejenerasyonları olan ve görme seviyesi ışık persepsiyonu veya daha düşük bir seviyede olan hastalarda faydalı olabileceğini göstermiştir [132].

Cerrahi sonrası rehabilitasyon süreci gerektirmelerinden dolayı bu yöntemlerin Usher sendromu hastalarında şu aşamada kullanılması tartışmalı olmakla beraber Argus II Retinal Protez Sistemi uygulanan ve 16 ay takip edilen 53 yaşında bir USH2 hastasında başarılı sonuçlar bildirilmiştir [133].



Resim 3 : Argus 2 Retinal Protez Sistemi uygulanan hastada cerrahi öncesi ve sonrası [133]

Optogenetik Tedaviler

Bu tedavi yöntemi son dönemde kullanımı artan ve RP gibi ciddi retinal dejenerasyonu olan hastalarda kullanılan bir yöntemdir. Duyarlılığını yitirmiş retina hücrelerinde ışığa duyarlılık kazandırmayı amaçlamaktadır. Opsin bazlı proteinleri hücre zarına genetik olarak implante ederek bipolar hücre gibi hücrelerin fotosensitizasyonu amaçlanmaktadır. Preklinik çalışmalarda başarılı sonuçlar bildirilmiştir [134-136].

Sonuç olarak Usher sendromu hastalarda klinik olarak oldukça dramatik bir tabloya sebebiyet vermesinin yanında hasta yakınlarının yaşam kalitelerinde yaşattığı kayıp da düşünüldüğünde teşhis ve tedavisi oldukça önemli olan bir hastalıktır. Son dönemde bu sendromun tedavisi için yapılan çalışmalar içerisinde gen tedavileri daha fazla öne çıkmaktadır. Anatomik ve fonksiyonel olarak geri dönüş sağlama konusunda tedavilerin yetersiz kaldığı ve tedavide ana amacın sağlıklı hücreleri

korumak olduğu düşünöldüğünde bu sendromun hastaların çoğunluğunda doğumda bulgu veren bir patoloji olması erken tanı ve tedavi açısından Usher sendromunu daha avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca daha önce belirtildiğı üzere halihazırda devam eden çalışmalar da önümüzdeki yıllarda bu sendromun tedavisinin bulunabilmesi açısından umut vericidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (09/01/2018 ; 1855).

Ayrıca bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2018/090).

HASTA SEÇİMİ

Bu çalışmaya, kliniğimizde Usher sendromu ön tanısıyla takip edilen gece körlüğü, değişik seviyelerde perifer görme alanı daralması, görme azalması veya kaybı öyküsü ve muayenesinde tipik pigmentasyonlu bilateral retina dejenerasyonu, optik diskte balmumu solukluğu ve retinal damar atenüasyonu görülmesiyle klinik olarak RP tanısı alan ve bunun yanında işitme kaybı olan 58 hasta dahil edildi. Yapılacak olan çalışma hakkında detaylı sözel bilgilendirme yapılmasının ardından kooperasyonu olan hastaların kendilerine koopere olmayan hastaların ise birinci derece yakınlarına aydınlatılmış onam formu sözel olarak da okunduktan sonra imzalatıldı. Hastaların hikayesi, özgeçmiş ve soy geçmişleri ile ilgili bilgiler kendilerinden ve/veya birinci derece yakınlarından alınarak ayrıntılı olarak kaydedildi. Bu bilgileri; yaşı, cinsiyeti, doğum yeri, sistemik hastalık varlığı (ve/veya

sendrom varlığı), geçmişte geçirilen göz, kulak veya diğer cerrahi müdahaleler, kullanılan veya kullanılmış olan medikal tedaviler, anne-baba akrabalığı, anne veya babanın ailesinde USH öyküsü, kardeş sayısı ve cinsiyeti, kardeşlerde USH varlığı (varsa hasta kardeşin cinsiyeti), çocuğu varsa USH varlığı (varsa hasta çocuğunun cinsiyeti), ek göz ve kulak hastalığının olup olmadığı (glokom, katarakt vs.) gece görme azalmasının başlama yaşı, merkezi körlüğün başlama yaşı, ağır görme kaybı varsa başlama yaşı ; ayrıca işitme ve vestibüler fonksiyonlarda kayıp olup olmadığı, kayıp varsa başlama yaşı ve progresyonu, işitme cihazı kullanımı, eğitim durumu, erkek hasta ise askere gidip gitmediği oluşturdu.

Göz muayenesinde; görme keskinliği, göz içi basınç değerleri, primer pozisyonda gözün konumu, nistagmus varlığı, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği (Snellen eşeli ile), pitoz vb. ekstraoküler patoloji varlığı makroskopik olarak değerlendirildi ve kaydedildi. Tropikamid %1 göz damlası ile dilatasyon sonrası biyomikroskopik muayenede lens durumu ve fundus bulguları kaydedildi. Lens durumu; fakik-saydam, fakik-arka kapsül kesafeti (ASK), afaki, fakik-matür senil katarakt-nükleokortikal katarakt olarak gruplandırıldı. Fundus bulguları; erken evre RP (ekvatoryal bölgede kemik korpüskülü pigmentasyonun yeni başlamış, makulasının ve optik diskin etkilenmemiş olması), geç evre RP (yaygın pigmentasyon düzensizliği ve koryoretinal atrofinin görülmesi, makulada belirgin retina pigment epitelyum düzensizliğinin olması, belirgin optik disk solukluğu bulunması), sektöryel RP, sine pigmenti, paravenöz pigmenter retinopati, Coat's benzeri RP veya atipik RP, ciddi maküler atrofi-RP, subretinal sıvı veya retina dekolmanı eşlinde RP olarak gruplanarak kaydedildi. Ardından tüm hastalarımız Kulak Burun Boğaz (KBB) kliniğine yönlendirilerek detaylı kulak, burun ve boğaz muayenelerinin yapılmasının ardından odyometrik ölçümleri, vestibüler ve serebellar fonksiyon muayeneleri ve detaylı nistagmus muayeneleri yapıldı. İşitme kaybı 45 desibel (dB) veya daha az olan hastalar hafif, 45-70 dB arası olan hastalar orta, 70 dB'den fazla olan hastalarsa şiddetli işitme kaybına sahip olarak sınıflandırıldı.

Aksiyel uzunluk ölçümü Nidek AL-Scan biyometri cihazı ile yapıldı, hastanın gözü fikse olamıyorsa B ve A-mod ultrasonografi (EZ Scan AB5500 Ophthalmic ultrasound scanner) ile ölçüm yapıldı. Optik koherens tomografi (OKT) ve fundus otofloresans görüntüleme (FAF) için, spektral domain (SD) 3D OCT-2000 (Topcon

Corp., Tokyo, Japan) cihazı ($\lambda=840$ nm, 27.000 A-tarama/saniye ve 5 μ m aksiyel çözünürlüğe sahip) kullanıldı. Makula 3D (6.0x6.0 mm-512x128) modu ayrıca koroidin görüntülemesinde foveanın merkez alındığı 9 mm “line” modunda arttırılmış derinlikli görüntüleme “Enhanced Depth Imaging”(EDI) tekniği kullanıldı. Nistagmusu olan veya fikse edemeyen olgularda makula dışı bölgeden çekim yapılabildiyse kaydedildi. Koroid kalınlık ölçümü subfoveal bölgede hiperreflektif retina pigment epitelin (RPE) dış kenarı ile koroid-sklera sınırı arasında manuel olarak yapıldı. Yazılımının ölçüm aracı (kalibre) kullanılarak RPE'nin dış kenarından başlayan ve bu kenara dik bir çizginin koroid sklera sınırına getirilmesi ile yapıldı.

DIŞLAMA KRİTERLERİ

18 yaşından küçük, 60 yaşından büyük hastalar; işitme muayenelerinde nörosensoriyel kayıp dışında kayıp tespit edilen hastalar, görme ve işitme muayenesine koopere olamayan hastalar, numune için periferik venöz kan örneği alınmasını kabul etmeyen hastalar çalışma kapsamı dışında bırakıldı.

MOLEKÜLER ANALİZ

Göz ve KBB muayenelerinin ardından hastalara gerekli açıklama yapılarak ve aydınlatılmış onamları alınarak bir hemogram ve bir biyokimya tüpü olmak üzere 5-10 cc periferik venöz kan örnekleri alındı. Alınan kanlar uygun şartlar sağlanarak SBÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı'na genetik araştırma için transfer edildi ve çalışma multidisipliner bir şekilde yürütüldü.

Alınan kan örneklerinden Column-Pure Blood Genomic DNA Mini (*Applied Biological Materials (abm) Inc.*) ticari kiti ile üretici firmanın protokolü izlenerek genomik DNA izolasyonu yapıldı.

- 2.0 ml'lik bir santrifüj tüpüne ~ 100 μ l kan toplandı. Üzerine 100 μ l PBS çözeltisi ekledi. Yavaşça santrifüj uygulandı ve oda sıcaklığında iyive karıştırıldı.

liziz tamamlanıncaya kadar 1 dakika bekletildi. Çökelti iki kez 500 µl TE Tamponla yıkandı. Her yıkama sırasında 1 dakika boyunca 4,000 x g'de (8,000 rpm) santrifüj uygulandı. Son çökelti beyaz olarak görüldüğünde sonraki basamağa geçildi.

- Proteinaz K. 20 ul eklendi, iyice karıştırıldı. Tampon CL 200 ul eklendi. Yavaşça santrifüj uygulandı. 10 dakika boyunca 56 ° C'de inkübe edildi. Çözelti lizis işlemi tamamlayıncaya kadar inkübasyonu uzatıldı.
- Karışıma% 100 etanol 200 µl eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Tüm tüp bileşenlerini 2.0 ml Toplama tüpüne aktarıldı. 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 2 dakika boyunca 8,000 x g'de (10,000 rpm) santrifüj uygulandı.
- 500 µl CW1 Solüsyonu eklendi. 1 dakika boyunca 8,000 x g'de (10,000 rpm) santrifüj uygulandı.
- 500 µl CW2 Solüsyonu eklendi. 1 dakika boyunca 8,000 x g'de (10,000 rpm) santrifüj uygulandı.
- Çökelti alınarak 1 dakika daha 8,000 x g'de (10,000 rpm) santrifüj uygulandı.
- Column temiz bir 1.5 ml Eppendorf tüpüne yerleştirildi. Column zarının ortasına 30-50 µl CE Tamponu eklendi. 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 8000 x g'de (10.000 rpm), 1 dakika boyunca DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla santrifüj uygulandı.
- DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı Nanodrop 2000c (Thermon Scientific,USA) spektrofotometre ile 2 µl DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm örnekler toplanana kadar izole edilen her DNA örneği -80 °C'de muhafaza edildi. Tüm örnekler toplandıktan sonra tanımlanmış olan genlere özgü primerler ile uygun sıcaklıkta DNA örnekleri çoğaltıldı. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) uygulaması, sekans analizi için gerekli gen bölgesine ve primerlerin erime sıcaklığına uygun sıcaklık oranlarına göre gerçekleştirildi. Bu iş paketleri SBÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Bundan sonraki iş paketleri, hizmet alımı şeklinde (*Gentera Biyoteknoloji Limited Şirketi, İstanbul*) yapıldı.

MYO7A, PCDH15, USH1C, CDH23, USH2A Genlerinin Analizi

Çoğaltılan DNA örnekleri; PCR pürifikasyonu, Cycle sekans ve Na asetat ile pürifikasyon basamakları sonrasında, tanımlanmış mutasyonları içeren MYO7A, PCDH15, USH1C, CDH23, USH2A genleri hedef alındı. Paneller Sanger dizileme yöntemi kullanılarak dizilendi. Dizileme sonucu veriler tarafımıza gönderildi.

Tablo 5: İlgili genler ve hedeflenen mutasyonlar

Gen	Nükleotid Değişimi	Aminoasit	Ekzon
MYO7A	C.1343+1 G>A	Yok	Intronik (ekzon 12 yanında)
USH1C	G>A / G>C / G>T	p.R357W	13
CDH23	C>A / C>T	P.R1060W	26
PCDH15	G>A / G>C	P.R991X	24
USH2A	C>A / C>G	P.G1301V	18

İlgili genlerin ekzonlarını çoğaltmak için kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir. (Tablo 6)

Tablo 6: Bu primerler; MYO7A, PCDH15, USH1C, CDH23, USH2A genlerinin mutasyon tespit edilmek istenen bölgelerinin öncesinde ve sonrasında yer alan baz dizimlerini temsil eder

GEN	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	(bp)
MYO7A	AGTGGCTGATCACTGCCTTT	AGCTGACCTTGAGGAGGTGA	354
PCDH15	TTCCAAGATGTGAGATACCAAGTG	TACCTGCAAGTCGTGTGAGG	330
USH1C	ACAGATCCCTCCTACCTCGAT	GAGCACAGCGTCCAGACT	899
CDH23	GGAGGCTAAATGAAATGGTCTGC	TGTCACCTGAGCCCTGAATC	884
USH2A	TAGTTAAGCCATTTTCGCCCA	TGTCCCTACCCTACCCCTAAAG	593

İSTATİSTİK

Tanımlayıcı istatistiklerde sayı, yüzde, ortalama, standart sapma, minimum, maksimum değerler kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar için Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

SONUÇ

DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER

Çalışmamıza Temmuz 2016 – Haziran 2018 tarihleri arasında kliniğimizde RP nedeniyle takibi yapılan ve aynı zamanda işitme kaybı olan 58 hasta dahil edildi. Hastalarımızdan ikisi periferik venöz kan örneği alınmasını reddettiği için, Sekiz hasta ise KBB muayenesinde nörosensöriyel tipte işitme kaybı saptanmadığı için çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $33,56 \pm 11,12$ idi. 23'ü kadın 25'i erkek 48 hastanın 14'ü USH1, 16'sı USH2 iken 18 hastanın tiplendirmesi yapılamadı. Hastalarımızın ortalama hastalık süresi $25,4 \pm 13,49$ idi. Hastalarımızın 32 tanesinde anne-baba akrabalığı mevcut iken 16 hastada anne-baba akrabalığı olmadığı öğrenildi. Hastalarımızdan dördünün ebeveynlerinin kardeşlerinde de Usher sendromu olduğu öğrenildi. Ayrıca 18 hastanın kardeşinde de Usher sendromu tespit edildi. İki hastada diabetes mellitus, üç hastada sistemik hipertansiyon, üç hastada epilepsi öyküsü mevcuttu.

Tablo 7: Demografik Özellikler

	n	%	
Cinsiyet	Kadın	23	48
	Erkek	25	52
USH Tipi	Tip 1	14	29
	Tip 2	16	33
	Tiplendirme Yapılamayan	18	38
Anne – Baba Akrabalığı	32	67	
Sülalede Hastalık	4	8	
Kardeşlerde Hastalık	18	38	

GÖZ VE GÖRME MUAYENESİ SONUÇLARI

Usher sendromu tanısı alan 48 hastanın 15 tanesinde görme keskinliği bilateral ışık hissi(IH) düzeyindeyken, 10 hastada el hareketleri seviyesindeydi (EHS). Hastalarımızın 2 tanesi 1 metreden parmak sayabilirken (1 mps), 13 hastamızın görme keskinliği Snellen eşeline göre 0.1 olarak tespit edildi. Hastalarımızdan 8 tanesinin görme keskinliği düzeyi kooperasyonları yeterli olmadığı için tespit edilemedi. Ortalama göz içi basınçları (GİB) sağ gözde $14,04 \pm 1,69$ olarak tespit edilirken, sol gözlerin ortalaması $14,55 \pm 1,7$ olarak ölçüldü. Hastalarımızdan 6 tanesinin ön segment muayenesinde bilateral psödofaki (pf) izlenirken 20 hastada bilateral arka subkapsüler katarakt (ASK) izlendi. Hastalarımızdan 22 tanesinde ise bilateral fakik olarak izlendi. Fundus muayenelerinde tüm hastalarda RP ile uyumlu görülürken 10 hastada erken evre, 29 hastada ise ileri evre RP tespit edildi. Bir hastada ise kistik makula ödemi(KMÖ) izlendi. Aksiyel uzunluk ölçümleri ortalaması $22, 32 \pm 3,48$ olarak tespit edildi. Kooperasyon sağlanabilen hastaların Fundus oto floresans (FAF) görüntülemelerinde ise 4 hastada perifoveal hiper AF halka izlenirken, 3 hastada retiküler paternde otofloresans, 4 hastada ise yaygın otofloresans kaybı izlendi. Optik Koherens

Tomografi cihazı yardımıyla yapılan ölçümlerde ise fiksasyon sağlayabilen 32 hastanın santral makula kalınlıkları (SMK) ortalaması $152,71 \pm 37,9$ olarak ölçüldü.

Tablo 8: Göz Muayenesi Sonuçları

		n	%
Lens durumu	Pf	6	12
	Fakik	22	46
	ASK	20	42
Fundus muayenesi	Erken evre RP	10	21
	İleri evre RP	29	60
	KMÖ	1	2
SMK		$152,71 \pm 37,9$	
Aksiyel Uzunluk		$22,32 \pm 3,48$	
FAF	Hiper AF halka	4	8
	Retiküler patern	3	6
	Yaygın AF kaybı	4	8

(GİB: Göz içi basınç ; pf: psödofaki ; ASK : Arka subkapsüler katarakt ; RP : Retinitis Pigmentosa ; KMÖ : Kistoid makula ödemi SMK : Santral Makula Kalınlığı; FAF :Fundus Otofloresans)

İŞİTME VE DENGE MUAYENESİ SONUÇLARI

Hastalarımızdan yedi tanesine kooperasyon sağlayamadığı için KBB muayenesi yapılamadı. Muayene edilen 41 hastadan 8 tanesinde nörosensöriyel tipte kayıp izlenmediği için çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Muayene edilen tüm hastaların otoskopik, rinoskopik ve boğaz muayeneleri doğal olarak izlendi. Hastalarımızdan 4 tanesinde hafif şiddette 10 tanesinde orta şiddette 27 hastada ise şiddetli nörosensöriyel işitme kaybı tespit edildi. 21 hastada nistagmus tespit edildi.

Dix- Hallpike manevrasıyla yapılan vertigo muayenesinde ise 6 hastada nistagmus tespit edildi. Serebellar testlerde 13 hasta başarısız olurken 20 hasta başarılı oldu. Sekiz hasta ise koopere olamadığı için muayene yapılamadı. Hastaların kooperasyon eksikliğinden dolayı Videonistagmografi (VNG) testi uygulanamadı.

Tablo 9: İşitme ve Denge Muayenesi Sonuçları

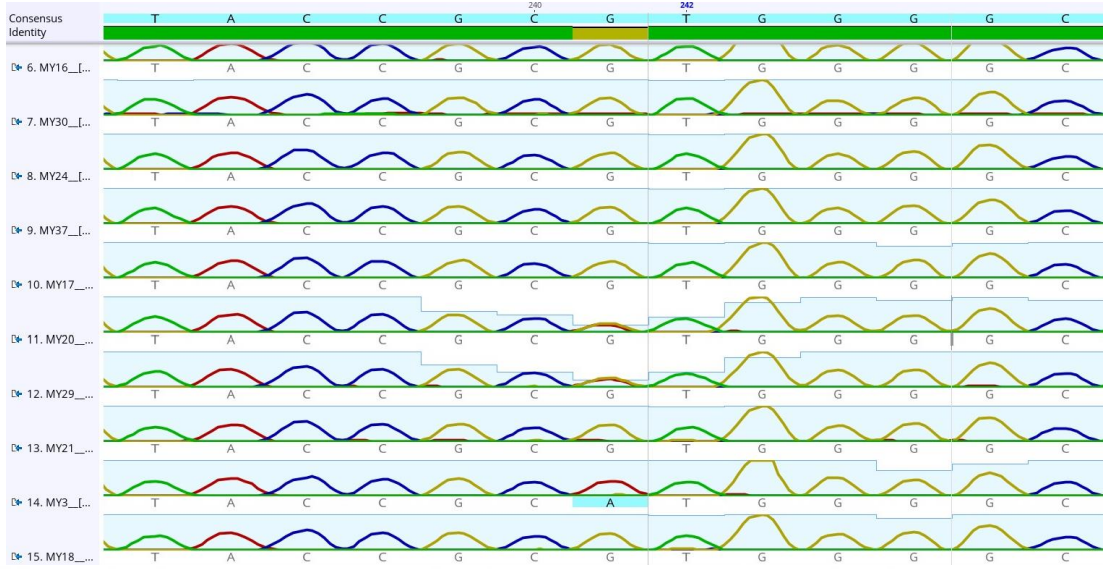
		n	%
İşitme kaybı şiddeti	Hafif	4	10
	Orta	10	24
	Şiddetli	27	66
Nistagmus	Pozitif	21	53
	Negatif	20	47
Dix-Hallpike	Pozitif	6	15
	Negatif	35	85
Serebellar muayene başarısı	Başarılı	20	48
	Başarısız	13	32

MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

Çalışma kapsamında 48 hastadan aldığımız periferik venöz kan örneklerinden daha önce yapılmış çalışmalarda saptanan mutasyonlarla Usher sendromuna sıklıkla sebebiyet verdiği bilinen MYO7A, PCDH15, USH1C, CDH23, USH2A genlerinde Sanger DNA dizileme yöntemi kullanılarak ilgili noktalarda mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

MYO7A Geni Mutasyon Analizi Sonuçları

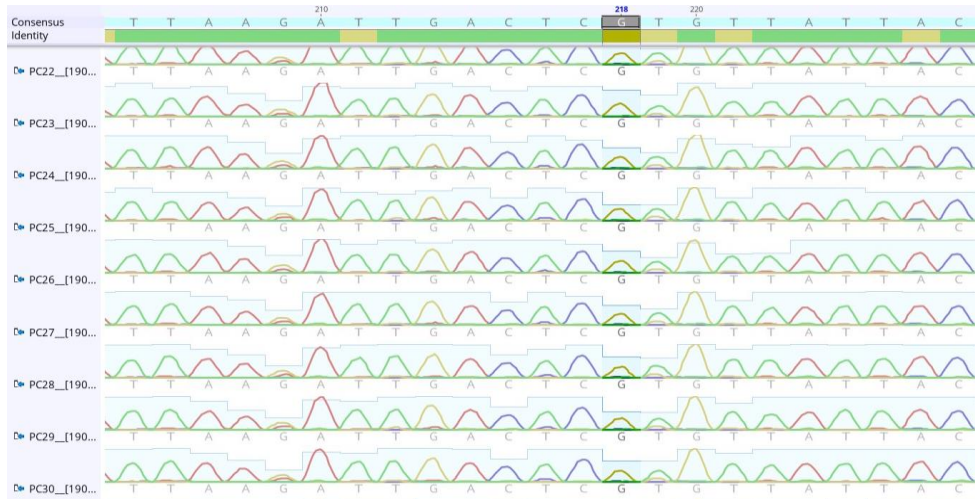
Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 48 hastanın 6 tanesinde heterozigot, 1 tanesinde ise homozigot mutasyon sonucu C.1343+1 aminoasitinde 241. bazda guanin yerine adenin geldiği görülmüştür.



Resim 4: Bir grup hastanın, ham verilerinin analizinin yapıldığı Geneious Prime (Geneious version 2019.1 created by Biomatters) uygulamasından alınan görüntülerde MYO7A geninde odaklanılan noktada görülen heterozigot ve homozigot mutasyonlar

PCDH15 Geni Mutasyon Analizi Sonuçları

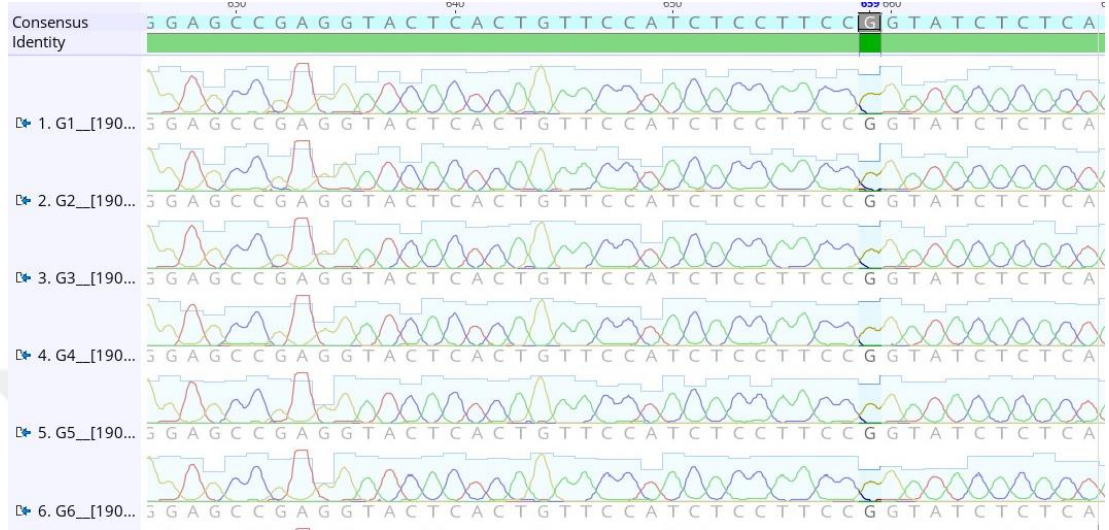
Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 48 hastadan herhangi birinde PCDH15 geninde odaklanılan noktada mutasyon saptanmamıştır.



Resim 5: Bir grup hastanın, ham verilerin analizinin yapıldığı Geneious Prime (Geneious version 2019.1 created by Biomatters) uygulamasından alınan görüntülerde PCDH15 geninde odaklanılan noktada baz değişiminin olmadığı görülmektedir.

USH1C Geni Mutasyon Analizi Sonuçları

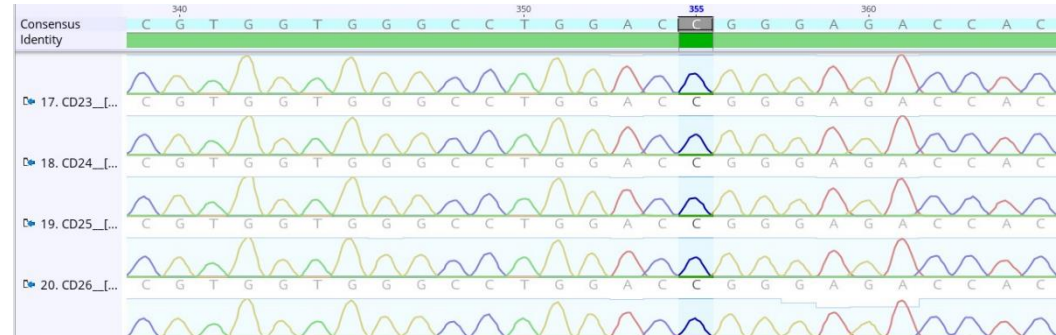
Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 48 hastadan herhangi birinde odaklanılan noktada mutasyon saptanmamıştır.



Resim 6: Bir grup hastanın, ham verilerinin analizinin yapıldığı Geneious Prime (Geneious version 2019.1 created by Biomatters) uygulamasından alınan görüntülerde USH1C geninde odaklanılan noktada baz değişiminin olmadığı görülmektedir.

CDH23 Geni Mutasyon Analizi Sonuçları

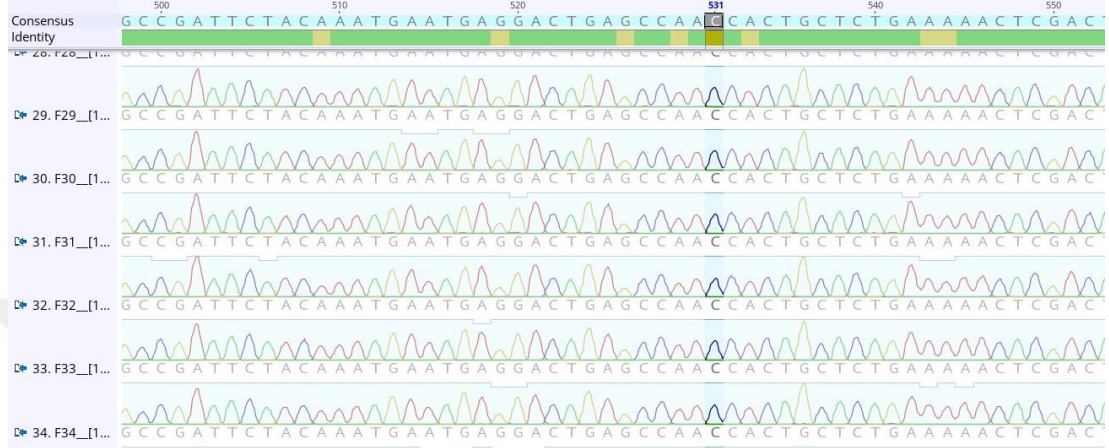
Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 48 hastadan herhangi birinde mutasyon saptanmamıştır.



Resim 7 : Bir grup hastanın, ham verilerinin analizinin yapıldığı Geneious Prime (Geneious version 2019.1 created by Biomatters) uygulamasından alınan görüntülerde cdh23 geninde odaklanılan noktada baz değişiminin olmadığı görülmektedir.

USH2A Geni Mutasyon Analizi Sonuçları

Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 48 hastadan herhangi birinde mutasyon saptanmamıştır.



Resim 8: Bir grup hastanın, ham verilerinin analizinin yapıldığı Geneious Prime (Geneious version 2019.1 created by Biomatters) uygulamasından alınan görüntülerde *cdh23* geninde odaklanılan noktada baz değişiminin olmadığı görülmektedir.

MUTASYON TESPİT EDİLEN HASTALARIN DETAYLI SONUÇLARI VE DİĞER HASTALARLA KIYASLANMASI

MYO7A geninde mutasyon tespit ettiğimiz 5 erkek, 2 kadın 7 hastanın yaş ortalaması $29,71 \pm 12,69$ idi. Bu hastaların ortalama tanı alma yaşlarının $15,14 \pm 5,81$ olduğu görüldü. Oftalmolojik muayenelerinde 1 hastamızın görme keskinliği bilateral IH(+) düzeyindeyken 4 hastamızın görme keskinliği EHS olarak tespit edildi. İki hastamızın görme keskinliği ise 0.1 idi. Biomikroskopik muayenelerinde 6 hastamız fakik olarak izlenirken 1 hastamız ise psödofakik idi. Fundus muayenelerinde 1 hastada erken evre 3 hastada ise ileri evre RP izlendi. Hastalarımızın SMK ortalaması ise $148,71 \pm 33,9$ olarak hesaplandı. Yapılan odyolojik testlerde 15,18 ve 23 yaşındaki 3 hastada hafif derecede nörosensöriyel işitme kaybı tespit edilirken, 29,34,37 ve 52 yaşındaki 4 hastamızda ileri düzeyde nörosensöriyel işitme kaybı tespit edildi. Hastalarımızdan 4'ünün işitme cihazı

kullandığı öğrenildi. Vestibüler muayenelerinde ise hiçbir hastamızda denge problemi izlenmedi.

Klinik olarak USH2 ile uyumlu olan 6 erkek 3 kadın 9 hastamızda ise mutasyon tespit edilmedi. Bu hastalarımızın yaş ortalaması $28,84 \pm 13,59$ iken ortalama tanı alma yaşları $14,66 \pm 6,12$ idi. Hastalarımızdan 2'sinin görme keskinliği IH(+) düzeyindeyken 5 hastamızın görme keskinliği EHS, 2 hastamızın ise 0,1 idi. Biomikroskopik muayenelerinde 8 hastamız fakik olarak izlenirken 1 hastamız ise psödo fakikti. Fundus muayenelerinde ise 1 hastada erken evre 4 hastada ileri evre RP izlendi. Bu hastaların ortalama SMK'ları ise $150,64 \pm 30,66$ idi. Yapılan odyolojik muayene sonucunda 2 hastamızda hafif, 1 hastamızda orta, 6 hastada ise ileri düzey nörosensöriyel işitme kaybı olduğu görüldü. Hastalarımızdan 4 tanesinin işitme cihazı kullandığı öğrenildi. Vestibüler muayenelerinde ise hiçbir hastamızda denge problemi izlenmedi.

Tablo 10 : Mutasyon tespit edilen ve edilmeyen USH2 hastalarının kıyaslanması

		Mutasyon Tespit Edilen Hastalar	Mutasyon Tespit Edilemeyen Hastalar
Hasta sayısı		7	9
Cinsiyet	Erkek	5	6
	Kadın	2	3
Yaş		$29,71 \pm 12,69$	$28,84 \pm 13,59$
Tanı alma yaşı		$15,14 \pm 5,81$	$14,66 \pm 6,12$
Retinitis pigmentosa	Erken evre	1	1
	İleri evre	3	4
SMK		$148,71 \pm 33,9$	$150,64 \pm 30,66$
İşitme kaybı	Hafif	3	2
	Orta		1
	Şiddetli	4	6

Mutasyon tespit edilen ve edilmeyen hastaları iki farklı grup olarak ele aldığımızda iki grup arasında hastalığın klinik seyrinde belirgin bir fark olmadığı görüldü.

TARTIŞMA

Kliniğimizde Usher sendromu ön tanısıyla takip edilen 58 hastada moleküler epidemiyoloji araştırması yapmak ve elde ettiğimiz sonuçlarla klinik korelasyon sağlamak amacıyla yaptığımız bu tez çalışmamızın sonucunda 7 hastamızda MYO7A geninde mutasyon tespit ettik. Genetik kökenli her hastalıkta olduğu gibi Usher sendromunda da hastalığın günümüzde kesin bir tedavisi bulunamamış olsa da önümüzdeki yıllarda tedavi edilebilmesi için genetik kökenini saptamak büyük önem arz etmektedir. Dünya çapında Usher sendromuyla ilgili olarak yapılmış bir çok moleküler epidemiyoloji çalışması mevcutken ülkemizde daha önce böyle bir çalışma yapılmamıştır. Ülkemizdeki moleküler epidemiyoloji hakkında bilgi veren ilk çalışma olmasından dolayı hem ülkemiz hem de dünya literatürü adına çalışmamızın değerli olduğuna inanıyoruz.

Usher sendromu tiplendirmesi genetik olarak heterojenite gösteren bir durum olduğundan dolayı tiplendirmesi genel anlamıyla klinik olarak yapılmaktadır. Davenport ve Omenn tarafından 1977 yılında yapılan sınıflandırma halen geçerliliğini korumaktadır [2]. USH1’de doğuştan sağırılık izlenirken vestibüler problemler de hastalığa eşlik eder. İlk dekatta RP görülmektedir. USH2’de ise yine ilk ya da ikinci dekatta RP görülür, doğumda sağırılık görülmez ve işitme kaybı daha hafif şiddette izlenir. USH3’te ise ikinci tipe benzer biçimde daha hafif şiddette işitme kaybı izlenirken Tip 2’den farklı olarak işitme kaybı progresif seyrederek ve vestibüler problemler eşlik edebilir. Retinitis pigmentosa ise genellikle ikinci ya da üçüncü dekatta ortaya çıkar [3]. Bu üç tip de kendi içlerinde sebep olan mutasyona bağlı olarak ayrıca sınıflandırılmaktadır. Bu kendi içinde yapılan sınıflandırma da hastalığın moleküler kökeninin saptanmasına yardımcı olduğu için gen tedavisi çalışmalarında yol gösterici olmaktadır.

Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz 48 hastada klinik olarak sınıflandırma yaptığımızda 14 hasta USH1, 16 hasta ise USH2 olarak sınıflandırılmıştır. Klinik bulgulara bakıldığında hiçbir hastamız USH3 ile uyumlu olarak

değerlendirilmemiştir. 18 hastada ise muayene sırasında hasta kooperasyonundaki yetersizlik ve hasta yakınlarından edindiğimiz bilgilerin tiplendirme için yeterli olmamasından dolayı tiplendirme yapılamamıştır. Dünyada yapılan epidemiyolojik çalışmalara genel bir bakış yapıldığında tüm usher tiplerinin %90'dan fazlasını USH1 ve USH2 oluşturmaktadır. Amerika ve Kuzey Avrupa'da yapılan çalışmalarda ise USH1 %33-44 arasında görülürken, USH2 %56-67 arasında görülmüştür. Kolombiya'da yapılan bir çalışmada ise hastaların %70'inde USH1 saptanmıştır. Genel anlamıyla tüm dünyada USH2, USH1'e göre fazla izlenirken iki tip de yaygın olarak görülmektedir. Farklı olarak Finlandiya'da yapılan bir çalışmada ise USH3 %40 oranında izlenmiş ve tüm Usher sendromlu hastalar içerisinde en sık görülen tip olarak izlenmiştir. Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada ise USH3 %20 oranında izlenmiştir [24, 50, 137-140]. Tüm bu çalışmalarla kendi sonuçlarımızı kıyasladığımızda dünyada görülen epidemiyolojik dağılımla paralel sonuçlara sahip olduğumuzu görmekteyiz. Kliniğimiz RP ve Usher sendromlu hastaların oldukça fazla sayıda takip edildiği bir referans merkez konumunda olduğu için elimizdeki hasta grubunun ülkemizin her bölgesinden gelen hastalardan oluştuğu düşünülürse çalışma sonuçlarımızı bu hastalığın ülkemizdeki epidemiyolojisi için de genelleyebileceğimize inanıyoruz. Fakat epidemiyolojik açıdan sonuçların daha net olarak ortaya konması adına çok merkezli bir çalışma yapılmasının gerekli olduğuna inanıyoruz.

Usher sendromu otozomal resesif olarak kalıtılan bir patoloji olduğu için bu sendroma sahip hastaların tedavi edilmesi ve yaşam kalitelerinin artırılmasının yanında sendromun önümüzdeki nesilleri etkilememesi için hiç kuşku yok ki dünyada ve ülkemizde yaygınlığı halen oldukça fazla olan akraba evliliklerinin potansiyel riskleri konusunda bireysel ve toplumsal bilincin artırılması da önem arz etmektedir. Ülkemizde Ankara, İstanbul ve İzmir'de akraba evliliği oranı %17 iken, diğer kentlerde %19'dur. Köylerde ise bu oran %36'ya çıkmaktadır [141]. Bizim çalışmamız kapsamına dahil ettiğimiz 48 hastanın 32'sinde anne-baba akrabalığının mevcut olduğunu hasta soygeçmişlerini araştırdığımızda tespit ettik. Hastalarımız arasında 2'si kadın 4'ü erkek 6 kardeşin tamamının Usher sendromuna sahip olduğu, anne ve babalarının ise kuzen olduğu bir aile mevcut idi. Oran olarak bakıldığında hastalarımızın %67'sinde anne-baba akrabalığının mevcut olması bu

konunun ciddiyetini oldukça dramatik biçimde ortaya koymaktadır. Son yıllarda hem devlet hem de sivil toplum kuruluşları tarafından yapılan kampanyalar umut verici olmakla beraber bu alanda toplumu bilinçlendirecek daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğine inanıyoruz.

Tez çalışmamız kapsamında sendromun moleküler epidemiyolojisi de araştırılmıştır. Günümüzde mutasyonlarıyla Usher sendromuna sebebiyet verdiği bilinen 10 adet gen bulunmaktadır. Daha önce söylendiği üzere Usher sendromu genetik olarak heterojenite gösteren bir patoloji olduğu için bu genetik mutasyonların fenotipe yansımada da farklılıklar izlenebilmektedir. MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G genlerindeki mutasyonlar USH1'e ; USH2A, GPR98 ve DFNB31 genlerindeki mutasyonlar USH2'ye ; CLRN1 ve HARS genlerindeki mutasyonlar ise USH3'e sıklıkla sebebiyet vermektedir.

Daha önce yapılmış çalışmalarda USH1'in en sık görülen alt tipinin MYO7A genindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan USH1B olduğu gösterilmiştir. Amerika ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda USH1 hastalarının yaklaşık yarısında etken olarak bu gendeki mutasyonlar izlenmiştir. MYO7A genini CDH23, PCDH15, USH1C genindeki mutasyonlar takip etmektedir. USH1 hastalarının %10-35 arasındaki kısmında etken mutasyon olarak CDH23 genindeki mutasyon, %10'undaysa PCDH15 genindeki mutasyon gösterilmiştir. USH2 hastalarında ise %85 oranında USH2A geninde mutasyon saptanmıştır [12-14, 137, 142]. Biz de moleküler epidemiyoloji çalışmamız kapsamında hastalarımızda etken mutasyon olarak görülmesi daha muhtemel olan MYO7A, CDH23, PCDH15, USH1C ve USH2A genlerine odaklandık. Klinik sınıflandırmamız sonucunda hiçbir hastamızın USH3 ile uyumlu olmaması ve USH3 görülme sıklığının dünyada da az olmasından dolayı USH3'e sebep olan mutasyonlar çalışmamız kapsamında araştırılmamıştır.

Günümüzde moleküler epidemiyoloji çalışmaları için kullanılan farklı DNA dizilim teknikleri mevcuttur. Bunlar Sanger dizilim, yüksek verimli dizilim, dizilmiş primer uzatma (APEX : Arrayed Primer Extension) gibi yöntemlerdir[143]. Bu yöntemler içerisinde en çok dikkat çeken APEX'tir. APEX aynı anda yüzlerce mutasyon analizini yapabilen oldukça başarılı bir tekniktir[144].

Bu tekniklerin dışında son dönemde yeni nesil dizileme (NGS : Next Generation Sequencing) adı verilen farklı bir teknik geliştirilmiştir. Bu teknik sayesinde aynı anda milyonlarca dizileme gerçekleştirilebilmekte ve tüm baz çiftleri başarılı bir şekilde analiz edilebilmektedir. Bu teknik insan genomunun incelenmesinde başarıyla kullanılmakla birlikte delesyon, yeniden düzenlenme gibi mutasyonların tespitinde yetersiz kalmaktadır. Ayrıca protein sentezinde ana rolü üstlenen ekzonların incelenmesini başarıyla sağlarken intron incelemesi ve mitokondriyel DNA incelenmesinde de yetersiz kalmaktadır [145]. Günümüzde ortaya konan araştırma sonuçları mutant proteinlerin kodlanmasında ekzonlar dışındaki bölgelerin de etkisinin olduğunu ortaya koymuştur[146].

Yeni nesil dizileme teknikleri bu amaçla daha sonra ortaya çıkan tüm genom dizileme (WGS:Whole-Genome Sequencing), tüm ekzom dizileme (WES: Whole-Exom Sequencing) ve hedeflenen yeni nesil dizileme (Targeted NGS) gibi tekniklerle ciddi bir gelişim göstermiştir. WGS ekzon-intron ayrımı yapmadan tüm DNA'nın taranmasına imkan sağladığı için insan DNA'sının yaklaşık %98'inin başarıyla taranmasını sağlayan oldukça değerli bir yöntemdir. Fakat pahalı olması ve analiz sürecinin zorlukları bu yöntemin dezavantajlarıdır. Daha kolay analiz süreci sunan WES tekniğindeyse sadece ekzonlar taranmaktadır. Genetik kökenli hastalıkların çoğunlukla ekzonlardan kaynaklı mutasyonlardan ortaya çıktığı düşünülürse bu yöntem de kıymetli bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Targeted NGS ise daha önce bilinen mutasyonları hızlı biçimde tarama şansı verdiği için özellikle bilinen mutasyonları popülasyonda taramak için avantajlı bir tekniktir. Ancak bu yöntemde yeni mutasyon ortaya konamıyor olması bu tekniğin en önemli dezavantajıdır [147] [148, 149].

Bizim çalışmamızda kullandığımız Sanger dizileme yöntemi ise geçtiğimiz yıllarda daha hızlı sonuç verir hale gelecek şekilde geliştirilmesine karşın tüm genomun incelenmesi için dezavantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemde bilinen mutasyonları taramak için kısa DNA parçaları kullanılır ve tüm bir genomu bu şekilde taramak zaman ve maliyet açısından avantajlı değildir. Ancak maddi koşullar sebebiyle biz araştırmamız kapsamında mutasyon taradığımız 5 genin her biri için daha önce tespit edilmiş birer mutasyonu bu teknikle taramak durumunda kaldık. Usher sendromunun genetik heterojenite gösteriyor olması ve fenotipe yansımada

oluşan varyasyonlar sebebiyle klinik tiplendirmemize göre hastaları ayırıp her hastada kliniğine uygun biçimde farklı mutasyonları araştırmak yerine tüm hastalarımızda aynı mutasyonları araştırmayı uygun bulduk. Araştırmamız sonucunda USH1'e sebep olduğu bilinen MYO7A genetik mutasyonlarının klinik olarak USH2 ile uyumlu hastalarımızda ortaya çıkmış olması bizim açımızdan verdiğimiz kararın doğruluğunu ortaya koyması açısından sevindirici olmuştur.

USH1C geni için daha önce 2011 yılında Fransa'da yapılmış bir çalışmada mutasyon tespit edilen p.R357W aa'ini kodlayan 899 bazlık dizi incelenmiş ve mutasyon tespit edilmemiştir [150].

CDH23 geni için daha önce 9 farklı çalışmada mutasyon tespit edilmiş P.R1060W aa'ini kodlayan 884 bazlık dizi incelenmiş ve mutasyon tespit edilmemiştir [17, 150-154] [155-157].

PCDH15 geni için daha önce 2016 yılında İngiltere'de yapılan bir çalışmada mutasyon tespit edilmiş P.R991X aa'ini kodlayan 330 bazlık dizi incelenmiş ve mutasyon tespit edilmemiştir [158].

USH2A geni için daha önce ABD'de yapılmış bir çalışmada mutasyon tespit edilmiş P.G1301V aa'ini kodlayan 593 bazlık dizi incelenmiş ve mutasyon tespit edilmemiştir [156].

MYO7A geni için ise daha önce 2014 yılında Çin'de yapılmış bir çalışmada 12.intronda,1343. baz sırasında guanin yerine adenin gelmesi sonucu mis-sense mutasyon izlendiği belirtilmiştir [159]. Bizim çalışmamızda da aynı bölgeyi içine alacak şekilde 354 bazlık bir dizi incelenmiş 6 hastamızda heterozigot, 1 hastamızda ise homozigot mutasyon tespit edilmiştir.

Rong ve arkadaşları çalışmaları sonucunda aynı aileden iki farklı hastada hem 1343. sırada guanin yerine adenin geldiğini hem de 2837. sırada timin yerine guanin geldiğini ortaya koymuş ve hastalarında biallelik mutasyon olduğunu saptamışlardır [158]. Bizim çalışmamız kapsamında 2837. sıra değerlendirilemediği için tespit ettiğimiz mutasyonların biallelik olup olmadığı ortaya konamamıştır. Ancak Rong ve arkadaşlarının çalışmasında da bizim sonuçlarımıza benzer biçimde bu mutasyona sahip olan hastaların kliniğinin USH2 ile uyumlu olduğu ortaya konmuştur.

Bu bölge intron olmasına karşın daha önce yapılmış çalışmalarda genomun bölünme bölgelerinden olduğu ortaya konmuş ve bu bölgede görülen mutasyonların da aminoasit sentezinde patolojiye sebep olduğu gösterilmiştir [160-162].

MYO7A genindeki mutasyonların 1995 yılında ilk defa ortaya konmasının ardından USH1 dışında USH3'ün atipik bir formunda, iki farklı non-sendromik sağırılıkta ve Leber konjenital amaroziste etken olarak bu gendeki mutasyonlar gösterilmiştir [37, 163-166]. Bilinen bu fenotipik varyasyonlara ek olarak USH2 hastalarında daha önce sadece 2 hastada gösterilmiş olan MYO7A mutasyonu çalışmamız kapsamında 7 hastada ortaya konmuştur.

Tez çalışmamızın giriş kısmında detaylarıyla bahsedildiği üzere hayvan deneylerinde bulunan umut verici sonuçların ardından şu an hali hazırda devam etmekte olan ve 2021 yılında sonuçlarının açıklanacağı söylenen Ushstat® gen tedavisi çalışmasında MYO7A geninde mutasyonu olan hastaların tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Bizim de mutasyon tespit ettiğimiz 7 hastamızın önümüzdeki yıllarda bulunabilecek olası tedavilerden faydalanabilecek olma ihtimali bizim açımızdan çalışmamızda bulduğumuz sonuçların daha anlamlı hale gelmesini sağlamıştır.

Fotoreseptör hücrelerde sendrom dolayısıyla ortaya çıkan tahribatın geri dönüşünün sağlanmasındansa henüz hasar görmemiş hücrelerin korunması çok daha fazla önem arz etmektedir. Usher sendromu hastalarıysa çoğunlukla doğumda işitme kaybıyla bulgu verdiği için gen tedavileri açısından oldukça avantajlı durumdadır. Eğer doğuştan sağırılık görülen hastalarda detaylı bir gen taraması yapılabilirse tarama sonucunda Usher sendromuyla uyumlu mutasyonlar izlenen hastaların henüz fotoreseptör hücrelerde fonksiyonel ve anatomik kayıp başlamadan tedaviye alınabilecek olmaları bu sendromun hasta ve dolayısıyla hasta yakınlarında meydana getirdiği dramatik tabloların engellenebilmesi mümkün olacaktır.

Henüz ortaya konmuş net bir tedavi olmadığı için mevcut hastalarımızın palyatif tedavilerden faydalanabilmesi büyük önem arz etmektedir. Kliniğimiz bünyesinde kurulan ergoterapi bölümümüz hastaların yaşam kalitelerini arttırmak için hem göz hekimleriyle hem de psikiyatri kliniğiyle korele biçimde hasta ve yakınlarına hizmet vermektedir. Usher sendromu gibi hem görmenin hem de işitmenin tamamen kaybolduğu bu dramatik tablo hiç kuşku yok ki hasta

yakınlarında da maddi ve manevi olarak büyük yıkımlara sebep olmaktadır. Bu bağlamda hasta yakınlarının da bilinçlendirilmesi ve desteklenmesi oldukça önemlidir.

Daha çok sivil toplum kuruluşları bünyesinde verilen bu hizmetler malesef yeterli değildir. Devlet destekli organizasyonların ivedilikle hayata geçirilmesi yalnızca Usher sendromu hastaları için değil ciddi görme kaybı olan tüm hastalarımız için gereklidir. Hastane içinde göz hekimlerinin, KBB hekimlerinin, psikiyatri hekimlerinin, sosyal hizmet uzmanlarının ve ergoterapistlerin korele çalışması gerekliliğinin yanında bu hastaların sosyal hayatlarında yaşadıkları sıkıntıların ortaya konması ve çözüm üretilmesi için hem devlet hem de sivil toplum kuruluşlarının organize biçimde hizmet vermesi gerekmektedir.

Çalışmamız ülkemizde bu sendromla ilgili bu kadar kapsamlı biçimde yapılmış ilk çalışma olmasından dolayı değerli olmakla beraber belli alanlarda yetersiz kalmıştır. Öncelikle epidemiyolojik olarak sonuçların net olarak ortaya konması için Usher sendromu hastalarının takibinin yapıldığı ülkemizdeki tüm kliniklerle beraber ortak yürütülecek bir çalışma yapılması gerekmektedir. Bunun yanında maddi koşullar sebebiyle yalnızca belirli mutasyonların taranabilmiş olması çalışmamızın en büyük eksiğidir. Önümüzdeki yıllarda bu alanda yapılacak daha kapsamlı çalışmalar hastalığın kökeninin ortaya konması açısından faydalı olacaktır.

Sonuç olarak dünyada yapılmış bir çok çalışma olmasına karşın ülkemizde Usher sendromuyla ilgili hem klinik olarak hem de moleküler düzeyde yapılmış ilk geniş kapsamlı çalışma olduğu için bu tez çalışmamızın oldukça önemli olduğuna inanıyoruz. Çalışmamız kapsamında MYO7A geninde mutasyon tespit ettiğimiz hastalar klinik olarak USH1 ile değil de USH2 ile uyumlu bulunmuştur. Bu bağlamda daha önce dünyada sadece 2 hastada tespit edilmiş olan bu fenotipik varyasyonun ülkemizde de görüldüğünü ortaya koyması açısından dünya literatürüne sağlayacağı katkıdan dolayı ve daha önemlisi MYO7A geninde mutasyon tespit ettiğimiz 7 hastanın 2021 yılında sonuçlanması planlanan Ushstat® gen çalışmasının başarılı sonuçlar vermesi halinde tedavi imkanı bulabilecek olmasından dolayı çalışmamızın klinik olarak da oldukça önemli sonuçlar ortaya koyduğuna inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Boughman, J.A., M. Vernon, and K.A. Shaver, *Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations*. J Chronic Dis, 1983. **36**(8): p. 595-603.
2. Davenport, S. and G. Omenn, *The heterogeneity of Usher syndrome*. Vth Int. Conf. Birth Defects, Montreal, 1977.
3. Sadeghi, M., et al., *Audiological and vestibular features in affected subjects with USH3: a genotype/phenotype correlation*. Int J Audiol, 2005. **44**(5): p. 307-16.
4. Möller, C.G., et al., *Usher syndrome: an otoneurologic study*. The Laryngoscope, 1989. **99**(1): p. 73-79.
5. Smith, R., et al., *Clinical diagnosis of the Usher syndromes*. American journal of medical genetics, 1994. **50**(1): p. 32-38.
6. Petit, C., *Usher syndrome: from genetics to pathogenesis*. Annual review of genomics and human genetics, 2001. **2**(1): p. 271-297.
7. Wagenaar, M., *The Usher syndrome: a clinical and genetic correlation*. 2000: [SI: sn].
8. Arden, G. and B. Fox, *Increased incidence of abnormal nasal cilia in patients with retinitis pigmentosa*. Nature, 1979. **279**(5713): p. 534.
9. Barrong, S.D., et al., *Ultrastructure of connecting cilia in different forms of retinitis pigmentosa*. Archives of Ophthalmology, 1992. **110**(5): p. 706-710.
10. Hunter, D.G., et al., *Abnormal sperm and photoreceptor axonemes in Usher's syndrome*. Archives of ophthalmology, 1986. **104**(3): p. 385-389.
11. Bonneau, D., et al., *Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in two brothers*. Journal of medical genetics, 1993. **30**(3): p. 253-254.
12. Espinos, C., et al., *Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain*. Public Health Genomics, 1998. **1**(4): p. 223-228.
13. Astuto, L.M., et al., *Genetic heterogeneity of Usher syndrome: analysis of 151 families with Usher type I*. The American Journal of Human Genetics, 2000. **67**(6): p. 1569-1574.
14. Ouyang, X.M., et al., *Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population*. Human genetics, 2005. **116**(4): p. 292-299.
15. Bork, J.M., et al., *Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(1): p. 26-37.
16. Ahmed, Z.M., et al., *PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23*. Human molecular genetics, 2003. **12**(24): p. 3215-3223.
17. Astuto, L., et al., *CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness*. The American Journal of Human Genetics, 2002. **71**(2): p. 262-275.
18. Kalay, E., et al., *A novel D458V mutation in the SANS PDZ binding motif causes atypical Usher syndrome*. Journal of molecular medicine, 2005. **83**(12): p. 1025-1032.

19. Tsilou, E.T., et al., *Usher syndrome clinical types I and II: could ocular symptoms and signs differentiate between the two types?* Acta Ophthalmologica Scandinavica, 2002. **80**(2): p. 196-201.
20. Seeliger, M., et al., *Comparative study of visual, auditory, and olfactory function in Usher syndrome.* Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 1999. **237**(4): p. 301-307.
21. Weston, M., et al., *Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa.* The American Journal of Human Genetics, 2000. **66**(4): p. 1199-1210.
22. Bernal, S., et al., *Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation.* Journal of medical genetics, 2003. **40**(1): p. e8-e8.
23. Ness, S., et al., *Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III.* Journal of medical genetics, 2003. **40**(10): p. 767-772.
24. Pakarinen, L., et al., *Usher's syndrome type 3 in Finland.* The Laryngoscope, 1995. **105**(6): p. 613-617.
25. Kimberling, W.J., et al., *Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q.* Genomics, 1990. **7**(2): p. 245-249.
26. Kaplan, J., et al., *A gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q.* Genomics, 1992. **14**(4): p. 979-987.
27. Sankila, E.-M., et al., *Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q.* Human Molecular Genetics, 1995. **4**(1): p. 93-98.
28. Chaïb, H., et al., *A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21.* Human molecular genetics, 1997. **6**(1): p. 27-31.
29. Kimberling, W., et al., *Linkage of Usher syndrome type I gene (USH1B) to the long arm of chromosome 11.* Genomics, 1992. **14**(4): p. 988-994.
30. Smith, R.J., et al., *Localization of two genes for Usher syndrome type I to chromosome 11.* Genomics, 1992. **14**(4): p. 995-1002.
31. Wayne, S., et al., *Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D) to chromosome 10.* Human molecular genetics, 1996. **5**(10): p. 1689-1692.
32. Wayne, S., *Localization of the Usher syndrome type 1F gene (Ush1F) to chromosome 10.* Am J Hum Mol Genet, 1997. **61**: p. A300.
33. Hmani, M., et al., *A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2.* European Journal of Human Genetics, 1999. **7**(3): p. 363.
34. Lewis, R.A., et al., *Mapping recessive ophthalmic diseases: linkage of the locus for Usher syndrome type II to a DNA marker on chromosome 1q.* Genomics, 1990. **7**(2): p. 250-256.
35. Johnston, A.M., et al., *Harp (harmonin-interacting, ankyrin repeat-containing protein), a novel protein that interacts with harmonin in epithelial tissues.* Genes to Cells, 2004. **9**(10): p. 967-982.
36. Weston, M.D., et al., *Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II.* The American Journal of Human Genetics, 2004. **74**(2): p. 357-366.
37. Liu, X.-Z., et al., *Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene.* Nature genetics, 1997. **17**(3): p. 268.

38. Gibson, F., et al., *A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1*. Nature, 1995. **374**(6517): p. 62.
39. Well, D., et al., *Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B*. 1995.
40. Chen, Z.-Y., et al., *Molecular cloning and domain structure of human myosin-VIIa, the gene product defective in Usher syndrome 1B*. Genomics, 1996. **36**(3): p. 440-448.
41. Hasson, T., et al., *Effects of shaker-1 mutations on myosin-VIIa protein and mRNA expression*. Cell motility and the cytoskeleton, 1997. **37**(2): p. 127-138.
42. Berg, J.S., B.C. Powell, and R.E. Cheney, *A millennial myosin census*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(4): p. 780-794.
43. Bitner-Glindzicz, M., et al., *A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene*. Nature genetics, 2000. **26**(1): p. 56.
44. Verpy, E., et al., *A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C*. Nature genetics, 2000. **26**(1): p. 51.
45. Zwaenepoel, I., et al., *Identification of three novel mutations in the USH1C gene and detection of thirty-one polymorphisms used for haplotype analysis*. Human mutation, 2001. **17**(1): p. 34-41.
46. Kim, E., et al., *Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 85.
47. Hall, R.A., et al., *The β 2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 626.
48. Bolz, H., et al., *Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D*. Nature genetics, 2001. **27**(1): p. 108.
49. Bork, J.M., et al., *Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23*. The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(1): p. 26-37.
50. Eudy, J.D., et al., *Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type 1Ia*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1753-1757.
51. Hudspeth, A.J., *How the ear's works work*. Nature, 1989. **341**(6241): p. 397.
52. Self, T., et al., *Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells*. Development, 1998. **125**(4): p. 557-566.
53. Ernest, S., et al., *Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness*. Human Molecular Genetics, 2000. **9**(14): p. 2189-2196.
54. Nicolson, T., et al., *Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants*. Neuron, 1998. **20**(2): p. 271-283.

55. Richardson, G., et al., *Myosin VIIA is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells*. Journal of Neuroscience, 1997. **17**(24): p. 9506-9519.
56. Sahly, I., et al., *Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis*. Anatomy and embryology, 1997. **196**(2): p. 159-170.
57. Weil, D., et al., *Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(8): p. 3232-3237.
58. Wolfrum, U., et al., *Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli*. Cell motility and the cytoskeleton, 1998. **40**(3): p. 261-271.
59. Titus, M.A., *A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis*. Current biology, 1999. **9**(22): p. 1297-1303.
60. Tuxworth, R.I., et al., *A role for myosin VII in dynamic cell adhesion*. Current Biology, 2001. **11**(5): p. 318-329.
61. Adams, C.L. and W.J. Nelson, *Cytomechanics of cadherin-mediated cell—cell adhesion*. Current opinion in cell biology, 1998. **10**(5): p. 572-577.
62. Küssel-Andermann, P., et al., *Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(38): p. 29654-29659.
63. Küssel-Andermann, P., et al., *Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin—catenins complex*. The EMBO journal, 2000. **19**(22): p. 6020-6029.
64. Hirokawa, N. and L.G. Tilney, *Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear*. The Journal of Cell Biology, 1982. **95**(1): p. 249-261.
65. Hasson, T., et al., *Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(21): p. 9815-9819.
66. El-Amraoui, A., et al., *Human Usher 1B/mouse shaker-1: the retinal phenotype discrepancy explained by the presence/absence of myosin VIIA in the photoreceptor cells*. Human molecular genetics, 1996. **5**(8): p. 1171-1178.
67. Liu, X., B. Oudek, and D.S. Williams, *Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice*. Nature genetics, 1998. **19**(2): p. 117.
68. Liu, X., et al., *Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(15): p. 6267-6274.
69. Wolfrum, U. and A. Schmitt, *Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells*. Cell motility and the cytoskeleton, 2000. **46**(2): p. 95-107.
70. Rattner, A., H. Sun, and J. Nathans, *Molecular genetics of human retinal disease*. Annual review of genetics, 1999. **33**(1): p. 89-131.
71. Deol, M., *The anatomy and development of the mutants pirouette, shaker-1 and waltzer in the mouse*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 1956. **145**(919): p. 206-213.

72. Di Palma, F., et al., *Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D*. *Nature genetics*, 2001. **27**(1): p. 103.
73. Legan, P. and G. Richardson. *Extracellular matrix and cell adhesion molecules in the developing inner ear*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 1997. Elsevier.
74. Goodyear, R. and G. Richardson, *The ankle-link antigen: an epitope sensitive to calcium chelation associated with the hair-cell surface and the calycal processes of photoreceptors*. *Journal of Neuroscience*, 1999. **19**(10): p. 3761-3772.
75. Bhattacharya, G., et al., *Localization and expression of usherin: a novel basement membrane protein defective in people with Usher's syndrome type IIa*. *Hearing research*, 2002. **163**(1-2): p. 1-11.
76. Dalkara, D., et al., *Let there be light: gene and cell therapy for blindness*. *Human gene therapy*, 2016. **27**(2): p. 134-147.
77. N Sahni, J., et al., *Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy*. *Current genomics*, 2011. **12**(4): p. 276-284.
78. Brennan, T.A. and J.M. Wilson, *The special case of gene therapy pricing*. *Nature Biotechnology*, 2014. **32**: p. 874.
79. Sahel, J.-A. and B. Roska, *Gene therapy for blindness*. *Annual review of neuroscience*, 2013. **36**: p. 467-488.
80. Cuenca, N., et al., *Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases*. *Progress in retinal and eye research*, 2014. **43**: p. 17-75.
81. Doonan, F., et al., *Enhancing survival of photoreceptor cells in vivo using the synthetic progestin Norgestrel*. *Journal of neurochemistry*, 2011. **118**(5): p. 915-927.
82. Eigeldinger-Berthou, S., et al., *Rasagiline interferes with neurodegeneration in the Prph2/rds mouse*. *Retina*, 2012. **32**(3): p. 617-628.
83. Fernández-Sánchez, L., et al., *Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa*. *Human gene therapy*, 2012. **23**(12): p. 1290-1300.
84. Guadagni, V., et al., *Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective*. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2015. **48**: p. 62-81.
85. Lee, S.Y., et al., *N-acetylcysteine promotes long-term survival of cones in a model of retinitis pigmentosa*. *Journal of Cellular Physiology*, 2011. **226**(7): p. 1843-1849.
86. Thomson, L.R., et al., *Elevated retinal zeaxanthin and prevention of light-induced photoreceptor cell death in quail*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2002. **43**(11): p. 3538-3549.
87. Mansour, A.M., et al., *Intravitreal Dexamethasone Implant In Retinitis Pigmentosa-Related Cystoid Macular Edema*. *Retina*, 2018. **38**(2): p. 416-423.
88. Yuzbasioglu, E., et al., *Intravitreal bevacizumab (Avastin) injection in retinitis pigmentosa*. *Current eye research*, 2009. **34**(3): p. 231-237.

89. Jones, M.K., et al., *Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases*. Progress in Retinal and Eye Research, 2017. **58**: p. 1-27.
90. Jayakody, S.A., et al., *Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement*. Progress in Retinal and Eye Research, 2015. **46**: p. 31-66.
91. Mead, B., et al., *Stem cell treatment of degenerative eye disease*. Stem Cell Research, 2015. **14**(3): p. 243-257.
92. <https://clinicaltrials.gov>. 2018 [cited 2018 May15]; Available from: <https://clinicaltrials.gov>.
93. Dalkara, D. and J.-A. Sahel, *Gene therapy for inherited retinal degenerations*. Comptes rendus biologiques, 2014. **337**(3): p. 185-192.
94. Petrs-Silva, H. and R. Linden, *Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa*. Clinical ophthalmology (Auckland, NZ), 2014. **8**: p. 127.
95. Bainbridge, J.W., et al., *Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(21): p. 2231-2239.
96. Maguire, A.M., et al., *Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(21): p. 2240-2248.
97. Bennett, J., et al., *Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial*. The Lancet, 2016. **388**(10045): p. 661-672.
98. Hashimoto, T., et al., *Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B*. Gene therapy, 2007. **14**(7): p. 584.
99. Allocca, M., et al., *Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice*. The Journal of clinical investigation, 2008. **118**(5): p. 1955-1964.
100. Lopes, V.S., et al., *Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus*. Gene therapy, 2013. **20**(8): p. 824.
101. Andrieu-Soler, C., et al., *Ocular gene therapy: a review of nonviral strategies*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1334-1347.
102. Han, Z., et al., *Comparative analysis of DNA nanoparticles and AAVs for ocular gene delivery*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52189.
103. Adjianto, J. and M.I. Naash, *Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **95**: p. 353-367.
104. Han, Z., et al., *Genomic DNA nanoparticles rescue rhodopsin-associated retinitis pigmentosa phenotype*. The FASEB Journal, 2015. **29**(6): p. 2535-2544.
105. Trapani, I., A. Puppo, and A. Auricchio, *Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies*. Progress in Retinal and Eye Research, 2014. **43**: p. 108-128.
106. Appaiahgari, M.B. and S. Vrati, *Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls*. Expert opinion on biological therapy, 2015. **15**(3): p. 337-351.

107. Bennett, J., et al., *Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy*. Nature medicine, 1996. **2**(6): p. 649.
108. Yang, Y., et al., *Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Gene therapy, 1996. **3**(2): p. 137-144.
109. Hoffman, L.M., A.M. Maguire, and J. Bennett, *Cell-mediated immune response and stability of intraocular transgene expression after adenovirus-mediated delivery*. Investigative ophthalmology & visual science, 1997. **38**(11): p. 2224-2233.
110. Ueyama, K., et al., *Ocular localization and transduction by adenoviral vectors are serotype-dependent and can be modified by inclusion of RGD fiber modifications*. PloS one, 2014. **9**(9): p. e108071.
111. Bainbridge, J., et al., *Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1*. Gene therapy, 2002. **9**(5): p. 320.
112. Wang, H., et al., *Combination of oncolytic adenovirus and endostatin inhibits human retinoblastoma in an in vivo mouse model*. International journal of molecular medicine, 2013. **31**(2): p. 377-385.
113. Bainbridge, J.W., et al., *Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(20): p. 1887-1897.
114. Walsh, C.P., J.R. Chaillet, and T.H. Bestor, *Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation*. Nature genetics, 1998. **20**(2): p. 116.
115. DiCarlo, J.E., V.B. Mahajan, and S.H. Tsang, *Gene therapy and genome surgery in the retina*. The Journal of clinical investigation, 2018. **128**(6): p. 2177-2188.
116. Williams, D.S. and V.S. Lopes, *The many different cellular functions of MYO7A in the retina*. 2011, Portland Press Limited.
117. Williams, D.S. and V.S. Lopes, *Gene therapy strategies for Usher syndrome type 1B*, in *Retinal Degenerative Diseases*. 2012, Springer. p. 235-242.
118. Orten, D., et al., *Erratum: Analysis of DNA elements that modulate myosin VIIa expression in humans*. Human mutation, 2000. **15**(1): p. 114-115.
119. Tolmachova, T., et al., *CHM/REPI cDNA delivery by lentiviral vectors provides functional expression of the transgene in the retinal pigment epithelium of choroideremia mice*. The journal of gene medicine, 2012. **14**(3): p. 158-168.
120. Papayannakos, C. and R. Daniel, *Understanding lentiviral vector chromatin targeting: working to reduce insertional mutagenic potential for gene therapy*. Gene therapy, 2013. **20**(6): p. 581.
121. Balaggan, K., et al., *Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors*. The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications, 2006. **8**(3): p. 275-285.
122. Kong, J., et al., *Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy*. Gene therapy, 2008. **15**(19): p. 1311.

123. Themis, M., et al., *Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice*. *Molecular Therapy*, 2005. **12**(4): p. 763-771.
124. Zhang, Y. and D. Duan, *Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma*. *Human gene therapy*, 2011. **23**(1): p. 98-103.
125. Duan, D., Y. Yue, and J.F. Engelhardt, *Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison*. *Molecular therapy*, 2001. **4**(4): p. 383-391.
126. Ghosh, A., et al., *A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene-independent manner*. *Molecular therapy*, 2008. **16**(1): p. 124-130.
127. Lopes, V.S. and D.S. Williams, *Gene therapy for the retinal degeneration of Usher syndrome caused by mutations in MYO7A*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2015. **5**(6): p. a017319.
128. Mahadevappa, M., et al. *Cortical response after chronic electrical stimulation of canine retina*. in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2003. Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE*. 2003. IEEE.
129. Güven, D., J.D. Weiland, And M.S. Humayun, *Retinal protezler*. *Journal of Retina-Vitreous*, 2005. **13**(4): p. 247-256.
130. Humayun, M.S., et al., *Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis*. *Ophthalmology*, 2012. **119**(4): p. 779-788.
131. Guven, D., et al., *Multimodal Imaging Including Optical Coherence Tomography Angiography of a Patient With Argus II Retinal Prosthesis One Year After Implantation*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 2018. **49**(1): p. 55-59.
132. Stingl, K., et al., *Subretinal Visual Implant Alpha IMS – Clinical trial interim report*. *Vision Research*, 2015. **111**: p. 149-160.
133. Nadal, J. and M. Iglesias, *Long-term visual outcomes and rehabilitation in Usher syndrome type II after retinal implant Argus II*. *BMC ophthalmology*, 2018. **18**(1): p. 205.
134. Cehajic-Kapetanovic, J., et al., *Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin*. *Current Biology*, 2015. **25**(16): p. 2111-2122.
135. Doroudchi, M.M., et al., *Virally delivered Channelrhodopsin-2 Safely and Effectively Restores Visual Function in Multiple Mouse Models of Blindness*. *Molecular Therapy*, 2011. **19**(7): p. 1220-1229.
136. Ivanova, E., et al., *Evaluation of AAV-Mediated Expression of Chop2-GFP in the Marmoset Retina*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2010. **51**(10): p. 5288-5296.
137. Hope, C., et al., *Usher syndrome in the city of Birmingham—prevalence and clinical classification*. *British Journal of Ophthalmology*, 1997. **81**(1): p. 46-53.
138. Piazza, L., et al., *Visual acuity loss in patients with Usher's syndrome*. *Archives of Ophthalmology*, 1986. **104**(9): p. 1336-1339.
139. Rosenberg, T., et al., *The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations*. *Clinical genetics*, 1997. **51**(5): p. 314-321.

140. Tamayo, M.L., et al., *Usher syndrome: results of a screening program in Colombia*. Clinical genetics, 1991. **40**(4): p. 304-311.
141. Uskun, E., *Akraba evlilikleri*. Sted: Sürekli tıp Eğitimi Dergisi, 2001. **10**(2): p. 54-56.
142. Spandau, U.H. and K. Rohrschneider, *Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany*. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 2002. **240**(6): p. 495-498.
143. Daiger, S., L. Sullivan, and S. Bowne, *Genes and mutations causing retinitis pigmentosa*. Clinical genetics, 2013. **84**(2): p. 132-141.
144. van Huet, R.A., et al., *The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice*. Molecular vision, 2015. **21**: p. 461.
145. Liu, L., et al., *Comparison of next-generation sequencing systems*. BioMed Research International, 2012. **2012**.
146. González-del Pozo, M., et al., *Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical significance in inherited retinal dystrophies*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e116176.
147. Nishiguchi, K.M., et al., *Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(40): p. 16139-16144.
148. Rehm, H.L., *Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic*. Nature Reviews Genetics, 2013. **14**(4): p. 295.
149. Neveling, K., et al., *Next generation genetic testing for retinitis pigmentosa*. Human Mutation, 2013. **34**(8): p. 1181-1181.
150. Bonnet, C., et al., *Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis*. Orphanet journal of rare diseases, 2011. **6**(1): p. 21.
151. Kimberling, W.J., et al., *Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children*. Genetics in Medicine, 2010. **12**(8): p. 512.
152. Jaijo, T., et al., *Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome*. Investigative ophthalmology & visual science, 2010. **51**(3): p. 1311-1317.
153. Cremers, F.P., et al., *Development of a genotyping microarray for Usher syndrome*. Journal of medical genetics, 2007. **44**(2): p. 153-160.
154. Roux, A.-F., et al., *Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%*. Journal of medical genetics, 2006. **43**(9): p. 763-768.
155. Bujakowska, K.M., et al., *Targeted exon sequencing in Usher syndrome type I*. Investigative ophthalmology & visual science, 2014. **55**(12): p. 8488-8496.
156. Duzkale, H., et al., *A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants*. Clinical genetics, 2013. **84**(5): p. 453-463.
157. Vozzi, D., et al., *Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy*. Molecular vision, 2011. **17**: p. 1662.

158. Ellingford, J.M., et al., *Whole genome sequencing increases molecular diagnostic yield compared with current diagnostic testing for inherited retinal disease*. *Ophthalmology*, 2016. **123**(5): p. 1143-1150.
159. Rong, W., et al., *Novel and recurrent MYO7A mutations in Usher syndrome type 1 and type 2*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97808.
160. Liu, F., et al., *Novel compound heterozygous mutations in MYO7A in a Chinese family with Usher syndrome type 1*. *Molecular vision*, 2013. **19**: p. 695.
161. Yoshimura, H., et al., *Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90688.
162. Jaijo, T., et al., *Functional analysis of splicing mutations in MYO7A and USH2A genes*. *Clinical genetics*, 2011. **79**(3): p. 282-288.
163. Liu, X.-Z., et al., *Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome*. *The American Journal of Human Genetics*, 1998. **63**(3): p. 909-912.
164. Liu, X.-Z., et al., *Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness*. *Nature genetics*, 1997. **16**(2): p. 188.
165. Weil, D., et al., *The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene*. *Nature genetics*, 1997. **16**(2): p. 191.
166. Wang, X., et al., *Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with leber congenital amaurosis*. *Human mutation*, 2011. **32**(12): p. 1450-1459.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Abdurrahman Alpaslan Alkan

Doğum yeri ve tarihi : 01.01.1991 / Kayseri

Uyruğu : TC

Medeni durumu : Bekar

Askerlik durumu : Bedelli

İletişim adresi ve telefonu : Ortaköy mah. Mehmetçik sk. Bina no : 9-1 Daire no : 8 Beşiktaş / İstanbul ; 0541 938 38 38

Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Şişli Hamidiye Etfal EAH Göz Hastalıkları Kliniği Asistan Dr. (09.07.15 – Halen)

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (2007-2014)

Ankara Fen Lisesi (2004-2007)

III- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Oftalmoloji Derneği (TOD)

IV- Yayınları

1)Uluslararası dergilerde yayınlanmış makaleler :

Arslan, G. D., Guven, D., Alkan, A. A., Kacar, H., & Demir, M. (2019). Short term effects of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor agents on cornea, anterior chamber, and intraocular pressure. *Cutaneous and ocular toxicology*, 1-5.

Genc, A., Dalkıran, M., Pirdoğan Aydın, E., Türkyılmaz Uyar, E., Alkan, A., Guven, D., ... & Karamustafalıoğlu, O. (2019). The alteration of retinal nerve fibre layer thickness with repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with treatment resistant major depression. *International journal of psychiatry in clinical practice*, 23(1), 57-61.

2)Ulusal dergilerde yayınlanmış makaleler:

Atılğan, C. Ü., Şendül, S. Y., Kösekahya, P., Çağlayan, M., Alkan, A., Güven, D., & Yılmazbaş, P. (2018). Evaluation of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Mean Platelet Volume in Patients with Active and Inactive Thyroid Orbitopathy. *Şişli Etfal Hastanesi Tip Bülteni*, 52(1), 26-30.

Sendul, S. Y., Dirim, B., Alkan, A., Atılğan, C. U., Yılmaz, A., Olgun, A., ... & Guven, D. Intraorbital space-occupying lesions: the evaluation of clinical, radiological and pathological results. *Şişli Etfal Hastanesi Tip Bülteni*, 51(4).

3)Uluslararası dergilerde yayınlanmış olgu sunumları:

Alkan, A. A., Duzgun, E., Olgun, A., Zeydanli, E. O., & Karapapak, M. (2019). Infezonasal XEN gel stent implantation in a refractory glaucoma patient with failed multiple glaucoma filtration surgeries: Case report. *Medicine Science International Medical Journal* ; 2019

4)Bilimsel kongrede yayınlanmış poster sunumları

KOAH Olan Hastalarda Retinal Vaskülarizasyonun Optik Koherens Tomografi Anjiyografi Cihazı Yardımıyla Değerlendirilmesi ; Abdurrahman Alpaslan Alkan, Eyüp Düzgün, Murat Karapapak, Gürcan Doğukan Arslan, Dilek Güven (Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongre, 2018)

Diabetik Makula Ödemi Tedavisinde İntravitreal Aflibercept Enjeksiyonunun Etkinliğinin Araştırılması ; Abdurrahman Alpaslan Alkan, Mehmet Demir, Gürcan Doğukan Arslan (Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongre, 2018)

V- Bilimsel Etkinlikleri

Başarılı olduğu uluslararası sınavlar

International Council of Ophthalmology The Basic Science Examination (2018)

International Council of Ophthalmology The Optics & Refraction Examination (2018)

International Council of Ophthalmology Clinical Ophthalmology Examination (2019)

EKLER

