



Sensörinöral İşitme Kaybında Gen Terapi Yaklaşımları

Gene Therapy Approaches in Sensorineural Hearing Loss

Kübra KELLECI^{1,2}

KK: 0000-0002-9409-2254

¹Beykoz Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İstanbul-Türkiye

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya- Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul-Türkiye

Öz

İşitme kaybı, insanın sosyal ve bilişsel gelişimini ciddi şekilde etkileyen dünya genelinde görülen en yaygın halk sağlık problemlerinden biridir. İleri derece işitme kaybı ile karakterize edilen sensörinöral işitme kaybı (SNİK), yetişkinlerde çok sık görülmesine karşın tedavi yöntemleri harici işitme cihazı ve koklear implant kullanımı ile sınırlıdır.

Moleküler genetik alanında meydana gelen gelişmeler, gen düzenleme, gen susturma ve gen replasmanı gibi yöntemler sayesinde özellikle iç kulak saç hücre rejenerasyonu araştırmalarında büyük bir atılım yaparak, işitme ile ilgili hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yeni ve etkili bir yol sağlamıştır. Bu çalışmada, genetik, ototoksisite, gürültü ve yaşlılığa bağlı sensörinöral işitme kaybı yaşayan bireylerde, işitme kaybını ortadan kaldırmak amacıyla araştırılan gen terapi yaklaşımları derlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Gen terapi, İç kulak, İşitme kaybı

Abstract

Hearing loss is one of the most important public health problems worldwide, which seriously affects human social and cognitive development. Although sensorineural hearing loss (SNHL), characterized by severe hearing loss, is very common in adults, treatment methods are limited to the use of external hearing aids and cochlear implants.

The developments in the field of molecular technology have provided a new and effective way in the prevention and treatment of hearing-related diseases by making a major breakthrough especially in inner ear hair cell regeneration research, thanks to methods such as gene editing, gene silencing and gene replacement. In this study, gene therapy approaches that have been investigated in order to eliminate hearing loss in individuals with sensorineural hearing loss due to genetics, ototoxicity, noise and old age were compiled.

Keywords: Gene therapy, Inner ear, Hearing loss

Giriş

İşitme, dış ortamdaki mekanik titreşimlerle oluşturulan seslerin kulak aracılığıyla algılanıp yorumlanması yetisidir. Dünya geneli yaklaşık yarım milyar insanı etkilediği bilinen ve ciddi bir halk sağlığı problemi haline gelen işitme kaybı (İK), en az bir kulak tarafından 25 desibellik sesin duyulmaması olarak tanımlanır. Dil ve konuşma gelişimini engellemenin yanı sıra sosyal ve mesleki alanlarda da olumsuz etkilere sahip olmaktadır.

Kulak anatomik olarak dış kulak, orta kulak ve iç kulak olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Dış kulak; kulak kepçesi olarak bilinen aurikula ve dış kulak yolundan oluşmakta iken orta kulak; timpanik membran, malleus, inkus, stapes, musculus tensör timpani, musculus stapedius'dan oluşmaktadır. İç kulak ise koklea ve vestibüler organlardan (urtikul, kesecik ve üç semisirküler kanal)

meydana gelmektedir.

İşitme, aurikula tarafından toplanan sesin dış kulak yolunda ilerleyerek timpanik membranı titreştirmesi ile başlar. Titreşen timpanik membran orta kulakta bulunan ve vücudumuzdaki en küçük kemikçiklerinden olan malleus, inkus ve stapesin sırayla hareket etmesini sağlar. Stapes ile oval pencereye iletilen titreşimler kokleaya ulaşır. Kokleaya giren titreşimler perilenfte oval pencereden yuvarlak pencereye doğru bir harekete neden olur. Oval pencere ve yuvarlak pencere arasındaki perilenf hareketi kokleayı uyarır. Bu uyarı sırasındaki mekanik enerji korti organı tarafından işlenerek elektriksel sinyallere dönüştürülür. Korti organı bir dizi iç saç hücresi, üç dizi dış saç hücresi ve her saç hücresinin tabanında farklı morfolojik özelliklere sahip farklı destek hücrelerini (Deiter hücreleri, Pillar hücreleri, Hensen hücreleri, Claudius hücreleri ve Boett-

cher hücreleri) içermektedir. Destek hücreleri saç hücrelerine yapısal ve fizyolojik destek sağlar. Farklı yükseklikteki stereosillerden oluşan saç hücresi, mekanoelektrik iletimin yeridir. İç kulakta perilenf ve endolenf adı verilen önemli sıvılar yer almaktadır. Perilenf, timpanik kanal ve vestibüler kanal içinde dolaşırken, endolenf koklear kanalda yer alır (1). Bu sıvıların temel bileşenlerinde kokleada uygun ses uyarılarının iletimi için gerekli olan sodyum ve potasyum iyonları yer almaktadır. Saç hücreleri aktif olarak titreşir ve iyon kanallarının açılmasına neden olan salınımları gerçekleştirir. Saç hücreleri depolarize olur ve akım, spiral nöronlar olarak bilinen birincil işitsel nöronlara iletilir. Vestibulokoklear sinirdeki elektriksel sinyaller beyin sapına ve işitsel kortekse iletilir. Böylece algılama beyin tarafından gerçekleşir.

Kulaktaki her bir bölümün işitme mekanizmasında kendine özgü önemli bir görevi bulunmaktadır. İşitme problemleri de bu bölümlerde meydana gelen hasarlar/ yaralanmalar nedeniyle açığa çıkar ve adlandırılır. Genel olarak işitme kayıp çeşitlerini iki ana başlık altında incelenebilir. Bunlar iletim tipi İK ve sensörinöral tip İK'dır. İletim tipi işitme kaybı, ses titreşimlerini iletmeye yeteneğini etkileyen dış kulak yolu ve orta kulak (timpanik membran ve işitsel kemikçikler) anomalisidir. Sensörinöral tip işitme kaybı (SNİK) ise iç kulak bozukluğundan kaynaklanır. İletim tipi İK buşon, enfeksiyonlar (bakteriyel, viral vb. kaynaklı), tümör, genetik anomaliler, travma vb. nedenlerden meydana gelmektedir. İşitme kaybı nedenleri arasında en sık görülen ve yetişkin işitme kayıplarının yaklaşık %90 'ından sorumlu olduğu bilinen sensörinöral işitme kaybı, iç kulaktaki duyuşal saç hücrelerinin, vestibulokoklear sinirin veya bunlar arasındaki sinaptik bağlantıların hasar görmesinden kaynaklanır. Sensörinöral işitme kaybının yaygın nedenleri arasında yüksek seslere maruz kalma, ototoksik ilaç kullanımı, travmalar, doğum sırası anomaliler, genetik faktörler, iç kulak malformasyonu veya doğal yaşlanma süreci yer almaktadır. Sensörinöral işitme kaybı hastaları arasında, genetik faktörlerin tüm vakaların %50-60'ına yakınlık oluşturduğu veya doğrudan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (2). Bu yüzde gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı daha yüksektir. Saçlı hücrelerin yüzde 30 ila 50'si zarar görene kadar işitme kaybı yaşanmayabilir. Yani işitme kaybı hasarın derecesine bağlı olarak hafif işitme kaybından tam işitme kaybına kadar değişebilir. Vücudumuzdaki birçok hücre, yaralanma meydana geldiğinde kendini yenileyebilme yetisine sahipken memeli iç kulak saç hücrelerinin ve spiral gangliyon nöronlarının rejeneratif kapasitesinin

olmadığı bilinmektedir. Bu da fonksiyon kaybının kalıcı olduğu anlamına gelmektedir (3).

İletim tip İK medikal ve cerrahi yöntemler ile tedavi edilebilir iken sensörinöral işitme kaybı için yalnızca harici işitme cihazı ve koklear implantların kullanımı söz konusudur. Sensörinöral işitme kaybı tedavi yöntemlerinde, implant kaynaklı enfeksiyon riski taşınması, implantların invaziv cerrahi müdahaleler ile hastaya nakledilmesi, hastayı bağımlı kılan bir tedavi olması ve her birey için kullanılamaması gibi sınırlamalar vardır. Tedavi yöntemlerinin içermiş olduğu bu dezavantajlar nedeniyle mevcut araştırmalar, ilerleyici işitme kaybını iyileştirme ve/veya azaltılmaya yönelik yöntemlere ve bu yöntemlerin geliştirilmesine odaklanmaktadır.

Moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde gen terapisi yöntemi, genetik nedenli hastalıkların tedavisinde büyük önem kazanmıştır. Gen terapisi, bir veya daha fazla terapötik nükleik asidi hastanın hücrelerine aktararak veya kusurlu bir geni düzelterek fonksiyonel bir proteinin üretilmesini sağlamak, doğru hücresel fonksiyonları yenilemek gibi amaçları güder. Gen düzenlemesi, son yıllarda iç kulak saç hücre rejenerasyonu araştırmalarında büyük bir atılım yaparak iç kulak patolojilerinin tedavisinde yeni ve etkili bir yol sağlamıştır. Bu çalışmada sensörinöral işitme kaybı ile ilgili gen terapi yöntemleri ve mevcut genetik yaklaşımlar ele alınmıştır.

1. Gen Terapisinde in vivo Model Seçimi

İnsan işitme anatomisinin doğrudan görselleştirilmesi ne yazık ki mümkün değildir. Mevcut radyolojik ve od-yolojik testler ile işitme kaybının derecesini ve çeşidini belirleyebilmemize rağmen bu yöntemler histopatolojik verileri güvenilir bir şekilde ortaya koymadığı için koklear patolojiyi tespit etmek ve tedavinin uygulanacağı bölgeyi belirleyebilmek çoğu zaman imkansızdır. İşitme sistemindeki nöral dokunun yapısal olarak analiz edilmesi ve korunması için vücuttan çıkarılması gerekir ki bu da canlı insan vücudunda gerçekleştirilemez. Bu amaçla biyopsi ya da ölüm sonrası otopsi gibi invaziv işlemlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Gen transferinin etkinliğini, güvenliğini ve terapötik etkilerini daha iyi anlayabilmek ve değerlendirebilmek için belirli hastalığa sahip uygun bir hayvan modeli oluşturmak gereklidir. Çalışmalarda sıklıkla memeli hayvanların kullanılması, genetik olarak insanlarla benzer olmalarından (iç kulak saç hücrelerinin rejenerasyon yeteneklerinin



benzer olmaları gibi) kaynaklanmaktadır.

Hayvan çalışmaları (Kurbağa, zebra balığı, kuşlar ve memeliler) sayesinde, insan iç kulak fonksiyonu ve hastalığı hakkında edinilen bilgiler artmaktadır. Zebra balığı gibi bazı hayvan modelleri daha erişilebilir saç hücrelerine sahip olsa da memeli olan ve memeli olmayan modeller arasında, saç hücrelerinin rejenerasyon kapasitesi gibi önemli ve doğuştan gelen farklılıklar vardır (3,4). Mevcut hayvan çalışmalarında koklear patolojileri anlayabilmek ve tedavi edebilmek için kolay erişilebilir, laboratuvarında uygulanabilir ve manipüle edilebilir alternatif modellere ihtiyaç duyulmaktadır.

En sık kullanılan memeli hayvan modellerinden biri faredir. Yaşam periyotlarının kısa olması, deneysel manipülasyon kolaylığı, sınırlı fenotipik farklılıklara sahip olması, az miktarda analit ihtiyacı gibi özellikleri nedeniyle insan hastalıklarının temelini araştırmak, tedavi ve tanı yöntemleri geliştirmek amacıyla tercih edilmektedir. Bu avantajların yanı sıra özellikle işitme bozukluklarının anlaşılması ve tedavisinde kullanımını destekleyen birkaç özelliği daha bulunmaktadır. Bu özelliklerden biri, insan ve fare işitsel sistemleri arasında dikkate değer yapısal bir benzerliğin olmasıdır. Bu nedenle işitsel fare mutantları sayesinde insan kulağının ontogenezi, morfogenezi ve işlevi hakkında değerli bilgiler elde edilmiştir (5,6). Ayrıca insanlarda histopatolojik çalışmalar, işitsel nöral dokunun yaşam boyunca ekstraksiyon ve fiksasyon yoluyla çıkarılmaması ve morfolojik olarak incelenememesi, elektrofizyolojik tahlillerin insanlarda kullanımının zor olması, deney hayvanlarına olan ihtiyacı artırmaktadır (7). Son olarak fare genomunun tamamen dizilenmiş olması ve insan genomu ile %80 homoloji göstermesi de önemli bir bilgidir (8).

Tüm bu bilgiler ışığında son yıllarda, genetik kaynaklı işitme kaybı yaşayan hastalardaki mutasyonları taklit eden fare modelleri oluşturulmuştur. Çalışmalar, fare ve insanda genetik kaynaklı işitme kaybından sorumlu olan yeni genlerin keşfine odaklanmıştır (9). Yoshimura ve ekibi (10) Tmc1 mutasyonunun işitme kaybı ile olan ilişkisini yetişkin fare modeli üzerinde yaptıkları deneysel çalışma ile ortaya koymuştur. Tmc1, koklear saç hücrelerinin mekanoelektriksel transdüksiyonu için bileşen olan transmembran proteinini kodlayan bir gendir. AAV (adeno-ilişkili virüs) vektörü aracılığıyla kokleaya mikroRNA enjekte ederek RNAi aracılı gen susturma yöntemi ile işitme kaybının önlenildiği ve iç saç hücrelerinin hayatta kalma olasılığını artırdığı belirtilmiştir. Bu çalışma ile yetişkin fare modellerinde gen tedavisinin uygulanabilir olduğu ispat edilmiştir.

Fare (10,11) dışında çalışma yapılan diğer memeli canlılar arasında kobay (12, 13), rat (14), tavşan (12,15), domuz (12)

ve Rhesus maymunu (12) yer almaktadır. Ototoksik ilaç kullanılarak sağırlaştırılan kobaylara, saç hücre rejenerasyonunu indüklemek amacıyla ATOH1 geni AdV'ler (adenovirüs vektörü) aracılığıyla duyu dışı hücrelerine iletilerek, işitsel fonksiyonda önemli bir gelişme sağlandığı belirtilmiştir (13). Memeli olmayan canlılar genetik olarak insanlardan farklı oldukları için gen terapisi araştırmalarında kullanımları oldukça azdır. Ancak zebra balığı genomu ile insan genomu arasındaki benzerliğin %87 gibi yüksek bir oranda olması, araştırmaların zebra balığına yoğunlaşmasını sağlamıştır. Ayrıca yapılan bir çalışma zebra balığı genomundaki PRPS1a ve PRPS1b'nin insan genomundaki PRPS1'e çok benzer olduğunu bulmuştur. Elde edilen bu veri insan işitme kaybını araştırmak için bir model olarak zebra balığı kullanımını destekler niteliktedir (14).

CRISPR/CAS9 teknolojisinin ortaya çıkması, başta zebra balığı olmak üzere diğer memeli olmayan canlıların da model olarak kullanımını mümkün kılmış, moleküler araştırmaları hızlandırmıştır.

2. Gen Terapisinde Dağıtım Sistemleri

Gen tedavisi için önemli ön koşullarda biri ideal vektörün belirlenmesidir. Etkili ve güvenli hedefleme yeteneğine sahip vektörlerinin geliştirilmesiyle gen terapi yöntemleri, insanlar üzerinde uygulanabilecektir. İdeal vektörün yalnızca in vivo yüksek transfeksiyon verimliliğine sahip olması değil aynı zamanda DNA'yı hedef hücre ve dokulara doğru bir şekilde iletme yeteneğine de sahip olması istenir. Ayrıca vektörün, yan etkilerinin minimum düzeyde olması, vektörün transfeksiyon yoğunluğunun ve süresinin kontrol edilebilir olup olmadığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Gen aktarım vektörleri viral ve non-viral yöntemler olmak üzere iki ayrı kategoride incelenebilir.

2.1. Viral Vektörler

Konak hücre için nonpatojen olan viral vektörlerin gen transferlerinde daha etkili olduğu bilinmekle birlikte sitotoksosite ve bağışıklık sistemi uyarma potansiyelleri olduğu da bilinmektedir. Viral vektörler arasında adenovirüs (13,16,17), adeno-ilişkili virüs (18;19), lentivirüs (20,21) herpes simpleks (22,23,24) virüsü vb. bulunur. Viral vektörler, yüksek transfeksiyon verimlilikleri nedeniyle en yaygın kullanılan vektörlerdir ve genetik kaynaklı işitme kaybı tedavi (gen değiştirme, susturma ve düzenleme) stratejilerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

Yeşil floresan proteini (GFP) ile işaretlenmiş VSV-G-psödotipli lentiviral partiküller ile *in vivo* transdüksiyona tabi tutulan farelerin, koklea ve vestibüler organlarında immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiş ve önemli hiçbir inflamatuvar yanıt gözlenmediği belirtilmiştir. Bu nedenle iç kulakta lentiviral vektörlerin güvenli olduğu bilinmektedir. Farklı Adeno-ilişkili virüs serotipleri, iç saçlı hücrelerde nispeten tekdüze ve verimli transdüksiyon sergilerken, dış saçlı hücrelerde daha düşük verimlilik sergilediği bilinmektedir (25).

2.2. Non-Viral Vektörler

Nonviral vektörler, doğası gereği çok daha düşük biyogüvenlik riskine sahiptir. Viral vektörlere göre hazırlanması kolaydır, düşük toksisiteye sahiptir ve konakçı immün yanıtlarını indüklemeyebilir. Nonviral vektörlerin gen taşıma kapasitesi üzerine herhangi bir kısıtı yoktur ve çeşitli biyolojik özellikler elde etmek için modifiye edilebilirler. Bununla birlikte non-viral vektörlerin transdüksiyon etkinliklerinin düşük olması kullanımlarını sınırlamıştır.

Vektörler hücre içerisine fiziksel ve kimyasal yöntemlerle iletilmektedir. Kimyasal yöntemlerle lipid / polimerik nanopartiküller (19,26,27), altın nanopartikül (28,29) vb. aracılığıyla gen transferi gerçekleştirilirken, fiziksel yöntemlerle herhangi bir taşıyıcı olmaksızın lokal veya sistemik olarak çıplak plazmidin transformasyonu gerçekleştirilir. Mikroenjeksiyon (30,31,32), partikül bombardmanı (33), gen tabancası metodu (28), elektroporasyon (34,35) gibi fiziksel yöntemler ile DNA'nın doğrudan hücre içine gönderilmesini amaçlanır.

Her iki yönteminde avantajları ve dezavantajları göz önünde bulundurularak işitme bozuklukları tedavisinde kullanımları söz konusudur. Bugüne kadar CRISPR-Cas9 teknolojisi ile sadece mikroenjeksiyon (32, 26) ve lipid bazlı nanopartiküller (26,36) 'in kullanıldığı bilinmektedir. Mianne ve ekibinin tek bir *cdh23* mutasyonunu düzeltmek için fare embriyolarına *nCas9* mRNA'yı mikroenjeksiyonda yüksek oranda lokalizasyonun mümkün olduğu fakat embriyolar üzerinde uygulanan fiziksel stres nedeniyle hücrelerin yaklaşık %10'unun parçalandığı belirtilmiştir (32).

3. Gen Terapisinde Stratejik Yaklaşımlar

Prensip, baskın ve resesif kalıtsal işitme kaybını tedavi etmek için kullanılan genetik yaklaşım yöntemleri farklıdır. İşitme kayıplarında gen terapi yöntemleri arasında gen değiştirme, gen susturma, gen düzenleme ve saç hücrelerin

rejenerasyonu yer almaktadır (2,37).

Son yıllarda kullanılan gen terapi yaklaşımlarından biri, spesifik hücre tiplerinde görevini yerine getirmeyen mutant bir genin, yabancı tipine ait olan cDNA'nın iç kulağa iletilmesidir (13,38). Gen replasmanı adı verilen bu terapi esasen mutasyona bağlı fenotipik kaybı olan çekinik kalıtsal hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bu gen terapi yönteminin etkinliği, hedef organların gelişimi sırasında genin verildiği süre ile sınırlıdır. Çoğu genetik işitme kaybı vakasında iç kulağa enjeksiyonun, tek bir yabancı tip geninin eksojen ekspresyonu ile gen replasmanı tedavisinde potansiyel olarak uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (39). Örneğin resesif işitme kaybı durumunda vahşi tip geni doğrudan vererek kusurlu bir genin orijinal işlevinin tamamlanması sağlanır.

Gen susturma, mRNA'nın kopyalanmasını önleyerek transkripsiyonel seviyede gerçekleştirilebilir. Transkripsiyon sonrası seviyede, mRNA translasyonunu önlemek için RNA interferansının (RNAi) kullanılmasıyla gen susturulması meydana gelir (40). Baskın hastalıkların tedavisinde mutant alellerin baskın-negatif etkilerini bastırma, gen susturma yönteminin kullanılmasının daha etkili olduğu bilinmektedir.

Son gelişmeler ışığında tek veya çoklu genleri düzenlemek için CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılmaktadır (41,42). Programlanabilir CRISPR-Cas9 sistemlerinin hedeflenen gen lokuslarını bozma veya onarım yeteneği, genetik kaynaklı işitme kaybı dahil olmak üzere genetik hastalıkların tedavisi için büyük bir potansiyel sunar (43,44). Gen düzenleme, doğrudan genin düzeltilmesi veya hastalığa neden olan mutasyonun tersine çevrilmesi yoluyla hem baskın hem de çekinik İK'yi tedavi etme potansiyeli nedeniyle gen değiştirme ve gen susturma işleminden üstün olabilir. Literatürde yer alan çalışmalarda CRISPR-Cas9 ajanlarının farklı formları (DNA, mRNA ve protein), viral ve viral olmayan vektörler aracılığıyla iç kulak hücrelerine iletilmiştir (18,19).

Son olarak araştırmalar, saç hücrelerinin spesifik genleri modüle ederek yeniden üretileceğini göstermiştir. İşitme ile ilgili hastalıkların çoğunda saç hücrelerinin zarar görmesi nedeniyle, gelecekte saç hücre rejenerasyon yöntemlerinin işitme tedavisinde yaygın olarak kullanılacağı öngörülmektedir.

4. İşitme Hastalıklarında Gen Terapisi

İç kulak, saç hücreleri başta olmak üzere spiral ganglion nöronları ve işitsel merkezi organları içermektedir. Me-



meli işitme sisteminde yaşlanma, ototoksik ilaç kullanımı (aminoglikozidler, neoplasm ilaçlar, diüretikler vb.), enfeksiyonlar, gürültü ve diğer nedenlerden dolayı bu doku ve hücrelerde meydana gelen lezyonlar, sesin algılanmasını ve iletilmesini etkileyebilir ve sonuçta işitme kaybına neden olabilir. İşitmeyi geri kazanmak için yeni fonksiyonel saç hücrelerinin oluşturulması gereklidir. Memeli canlılarda korti organı yetişkin yaşamı boyunca mitotik olarak sessiz bir durumda kalsa da (45), embriyonik süreçte kendiliğinden bir miktar onarılabilir (46) ve sınırlı derecede hücre yenilenmesi (47) gerçekleştirilebilir. Bu yetenek, memeli kokleasında destek hücrelerin olgunlaşmasıyla azalmaktadır (47). Vestibüler saç hücreleri iki alt tipten (tip I ve II) oluşmasına rağmen, histolojik analizler tip II saç hücrelerinin yenilediğini ancak tip I saç hücrelerinin yenilenmediğini göstermektedir (48,49). Rejenerasyon sınırlı olduğu için, vestibüler fonksiyon kaybının şu anda geri döndürülemez olduğu varsayılmaktadır. Memelilerden farklı olarak, memeli olmayan duyu organlarının yenilenmesindeki destek hücreleri, organın tamamı boyunca her iki tip vestibüler saçlı hücreyi neredeyse %100 oranında yenilemekle birlikte vestibüler fizyolojiye uygun olarak işlev kazanmasını sağlar.

Memeli iç kulağındaki saçlı hücreleri değiştirmek için çeşitli hücrel ve moleküler stratejiler düşünülebilir. Stratejilerden biri, destek hücrelerin saç hücrelere farklılaşmasını indüklemek için transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifade edilmesi (hücrel terapi yöntemi) bir diğer strateji ise gen transferi yoluyla sinyal yollarının manipüle edilmesidir. Bununla birlikte, şu anda başta genetik işitme kaybı olmak üzere SNİK'i tedavi etmek için herhangi bir farmakolojik tedavi mevcut değildir. Gen terapisi, bu engellerin üstesinden gelmek ve saçlı hücrelerin rejenerasyonunu indüklemek için olası bir yöntem olarak tanımlanmıştır (50).

Son yıllarda iç kulaktaki farklılaşmayı indüklemeyi amaçlayan pek çok farmakolojik ve genetik yaklaşımlar içeren araştırmalar yayınlanmıştır. Çok sayıda çalışma başarıyla iç kulaktaki saçlı hücrelerin üretildiğini fakat fonksiyonel özelliklerin değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. Bu çalışmalardan birinde, farelerde yapılan rotarod davranış çalışmalarında vestibüler fonksiyonda bir miktar gelişim sağlandığı söylenece de (15), kobaylar üzerinde yapılan başka bir çalışmada saçlı hücrelerin spontan rejenerasyonu için aminoglikozit kullanımı sonrası kobayların vestibüler uyarılmış potansiyel tepkileri ölçülmüş ve fonksiyonel olarak herhangi bir iyileşme saptanmadığı belirtilmiştir (51). Bu nedenle memeli vestibüler saçlı hücre rejenerasyonu ve rejenerasyon sonrası fonksiyonel özelliğin yenilenip yenilenmediği, hasarlı saç hücrelerinin neden kendiliğinden

rejenerere olmadığı henüz net değildir. Bu alanlarda yapılacak çalışmaların artmasına ihtiyaç vardır.

Memelilerde, ATOH1'in (Mat1 olarak da bilinir) merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöroenez (52,53) ve birkaç nöral olmayan hücre tipinin oluşumu (54,55) için gerekli olduğu bilinmektedir. İşitme sisteminde, gelişim sırasında saç hücresi farklılaşması için kritik bir rol oynayan (56) ATOH1, farelerde ve balıklarda saç hücresi gelişimi için gerekli olan bir transkripsiyon faktördür. Bir dizi saç hücresine özgü genin transkripsiyonunu aktive ederek, saç hücresi farklılaşmasını ve olgunlaşmasını yönlendirir (57). Bu nedenle, ATOH1 geninin ekspresyonu, duysal olmayan bölgelerde (58) bir saç hücresi fenotipini indüklemek ya da destekleyici hücreleri saç hücrelerine yeniden programlamak için yeterli olduğu söylenebilir (59,60,61). ATOH1 ayrıca belirli bir noktaya kadar gelişen saç hücrelerinin hayatta kalması için de gereklidir (62,63). Saç hücrelerinin olgunlaşması ile ATOH1 ekspresyonu destekleyici hücre ve saç hücrelerinde aşağı doğru regüle olur. Memelilerdeki birçok destekleyici hücre, hasar sonrası ATOH1'in ekspresyonunu up regüle ederek yeni saç hücrelerinin oluşumunu destekler (64). Bu nedenlerden dolayı hasar görmüş saç hücrelerinin yenilenmesinin, saç hücrelerinin farklılaşması için oldukça kritik bir rol oynayan ATOH1 geninin verilmesi ile sağlanması sıklıkla araştırmalara konu olmuştur (65,66,67,16). ATOH1'in hasardan önce vestibüler destek hücrelerden çıkarılması, saç hücrelerinin kendini yenilemesini önleyecektir (68). Buna karşın destek hücrelerde ATOH1 aşırı ekspresyonu, saç hücrelerinin rejenerasyonun ve hasarlı vestibüler sistemin işlevinin iyileşmesini arttıracaktır. Hicks ve ekibinin (68) yaptığı çalışma, tip II vestibüler saç hücrelerinin rejenerasyonu için yetişkin fare destek hücrelerinde ATOH1'in varlığının gerekli olduğunu ve hasardan önce saç hücresi progenitörü olan destekleyici hücrelerden ATOH1'in silinmesinin, destekleyici hücrelerin ölmesini veya çoğalmasını tetiklemediğini göstermektedir.

ATOH1 geni ya da homologlarından birinin in vivo yöntemlerle nakli ile destek hücrelerin saç hücrelerine farklılaşacağı böylece işitme ve denge sorunlarının önüne geçileceği bildirilmiştir. Baker ve ekibi (66), vestibüler aminoglikozit ototoksisitesi oluşturulan bir fare modeline ATOH1 ekspresyon eden adenovektörün verilmesi ile vestibüler saç hücrelerinin yenilediğini böylece iç kulak hastalıkları için gen tedavilerinin geliştirilmesinde ATOH1'in kullanılabileceği bildirilmiştir. ATOH1'in bir fare homologu olan MATH1, iç kulak duyu epitelinde ekspresyon edilmektedir. Yapılan bir çalışmada MATH1'den yoksun olan farelerin koklear ve vestibüler saç hücresi üretmediği dolayısıyla bu genin saç hücrelerinin oluşumu için önemli olduğu belirtilmiştir (65).

Genetik İşitme Kaybında Gen Terapisi

İnsanlarda en yaygın duyuşsal bozukluk olan işitme kaybının dünya nüfusunun %5'inden fazlasını etkilediği bilinmektedir. Doğuştan (doğumda mevcut) veya edinilmiş (doğumdan sonra ortaya çıkar) olan İK'ya hem genetik hem de çevresel faktörler neden olabilir. Konjenital işitme kaybı vakaları yaklaşık her 500 yenidoğandan 1'ini etkilemekle birlikte vakaların yarıdan fazlasına genetik faktörler neden olmaktadır. Çoğu vaka tek bir monogenik nokta veya küçük indel mutasyon nedeniyle açığa çıkmaktadır (69).

Kalıtsal işitme kaybı, gen veya kromozomlar gibi genetik faktörlerdeki anormallikler nedeniyle işitme organı gelişim bozukluklarını ve işitme bozukluğunu ifade eder. Doğuştan veya çocukluk çağı işitme kayıplarının en az %50'sinin genetik nedenlere bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Genetik işitme kaybının %70'ini oluşturan non-sendromik işitme kaybı vakalarının yaklaşık %80'i otozomal çekinik, %15'i otozomal dominant ve %1-2'si mitokondriyal veya X'e bağlıdır. İşitme kaybının genetik nedenleri oldukça heterojendir. Şimdiye kadar, 140'tan fazla sağırlıkla ilgili gen keşfedilmiştir. Bu genler üzerinde yapılan çalışmalar, moleküler düzeyde iç kulak fonksiyonlarını anlamamızı büyük ölçüde artırmıştır. Genetik kaynaklı işitme kayıpları vakalarının çoğu on gen ile (GJB2, SLC26A4, MYO15A, OTOF, CDH23, TMC1, WFS1, MYO7A, KCNQ4 ve COCH) ilişkilidir (70). GJB2, GJB6, MYO6, MYO7A,TECTA, TMC1, CEACAM16, COL11A2, TBC1D24, PTPRQ ve MYO3A'nın hem baskın hem de çekinik işitme kaybı ile ilişkili genler olduğu belirlenmiştir (2). Otozomal dominant işitme kaybı vakalarında hastalığı tedavi etmek için gen düzeltmesi veya gen susturma stratejileri izlenirken, otozomal çekinik işitme kaybı vakalarında gen değiştirme veya düzeltme stratejileri ön plana çıkar.

Iizuka ve ekibi (71) GJB2'yi, GJB2 delesyonlu bir fare modelinde oval pencere membranından iletimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada önemli ölçüde işitsel tepkilerin ve koklear yapının gelişim sergilediği belirtilmiştir. Takada ve ekibi (72) kokleada nöron sağ kalımını desteklemek için gjb2 nakavt edilmiş farelerin kokleasına, beyin kaynaklı bir nörotrofik faktör (BDNF) geni transfer etmiştir. Bu çalışma sonunda, işitsel sinirin dejenerasyonu ile ilişkili GJB2 eksikliği olan fareler için dolaylı bir gen tedavi stratejisini desteklediği bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada fare hücre hattında SLC26A4 lokusunu düzenlemek için plazmit bazlı bir CRISPR-Cas9 viral olmayan dağıtım sistemi tasarlanmıştır (73). Aynı ekip tarafından yapılan diğer bir çalışmada CRISPR-Cas9'un

viral vektör aracılığıyla iletimini gerçekleştirerek c.919-2A>G mutasyonu içeren fare modelini tedavi ettiklerini ve mutasyonun yabanıl tip genotipine geri düzeltilmesini sağladıklarını belirtmiştir (17). Fare otokistine (iç kulağa gelişen embriyonik yapı) adeno-ilişkili virüs (AAV) aracılı SLC26A4 cDNA transferinin işitme ve pendrin ekspresyonunu kısmen restore ettiği belirtilmiştir (74).

2017 tarihli bir çalışmada tmc1 genindeki mutasyonun CRISPR-Cas9 teknolojisi ile düzeltilerek, fare modellerinde işitme eşiklerinin iyileştirildiği gösterilmiştir (26). Literatürde fare modellerinde farklı tmc1 mutasyonlarından kaynaklanan genetik işitme kayıplarını önlemek veya tedavi etmek için gen değiştirme (75) gen susturma (10,76) ve gen düzenleme (18, 26) yöntemleri kullanılmıştır.

Ototoksisite Kaynaklı İşitme Kaybında Gen Terapisi

Çeşitli farmakolojik ajanlar ototoksiktir, yani işitsel ve vestibüler duyarlılıkta geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz kayıplara yol açabilirler. Bu tür ajanlar arasında aminoglikozid antibiyotikler (gentamisin, amikasin, kanamisin, neomisin gibi), kemoterapi ajanlar (sisplatin vb), diüretikler, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (aspirin gibi) ve ağır metaller yer alır (77). Ototoksisite belirtileri arasında geçici veya kalıcı işitme kaybı, kulak çınlaması ve/veya baş dönmesi bulunur (78). Yaşlı bireylerin, çocukların, kronik böbrek hastalığı olan hastaların ototoksisite açısından büyük risk altında olduğunu söyleyebiliriz.

Kanıtlar aminoglikozitlerin tercihen iç kulak hücre dışı sıvısına (79) taşındığını ve daha sonra mekanik transduksiyon kanallarından (80) saç hücrelerine girdiğini göstermektedir. Hücre içi etki alanı kesin olarak belirlenmemiş olsa da mitokondriyal genomdaki mutasyonlar, aminoglikozid kaynaklı işitme kaybına yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir (81).

Çeşitli malignitlere karşı etkili olduğu bilinen sisplatin ve karboplatin gibi platin bileşikler özellikle çocuklar için ototoksiktir. Apoptoza neden olarak hem saç hücrelerinin hem de kanser hücrelerinin ölümünü gerçekleştiren platin bileşikler, kan-labirent bariyerini geçerek kulağın hücre dışı sıvılarına ve daha sonra saç hücrelerine taşınır (82).

İlaça bağlı işitme kayıplarının tedavisi için henüz optimize edilmiş bir yöntem literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle ototoksik ilaç kullanımına bağlı işitme kaybıyla mücadelede en önemli adım, oluşmasını engellemek ya da minimize etmektir. Şu anda en etkili ve uygun koruma, bilinen ototoksik ilaçlara maruz kalmaktan kaçınmaktır. Herhangi bir işitme kaybı veya tinnitus gibi ototoksik



belirtiler görüldüğü andan itibaren ilaç kullanımının bırakılması ile hasarın önüne geçileceği ya da azaltılacağı düşünülmektedir.

Aminoglikozit ya da antineoplastiklerin kullanımı ile iç kulak dokularındaki hangi molekülleri hedeflediği bugüne kadar net olmamakla birlikte saç hücrelerine, spiral ganglion hücrelerine, işitsel sinire veya stria vaskularise hasar verdiği bilinmektedir (83,84,77). Çoğu durumda, saç hücreleri ototoksik ilaçların birincil hedefidir (85,86). Ototoksik ilaçların uygulanmasının oksidatif stresi ve ROS üretimini artırdığı bilinmekle birlikte (87) bu değişiklik, apoptoz ve inflamatuvar yol ile hücre ölümünün aktivasyonuna neden olmaktadır (88). İç kulak saç hücreleri üzerindeki stereosil demetin ses veya kafa hareketi tarafından üretilen nanometre altı sapmalara yanıt verdiği bilinmektedir. Stereosillerin kendi kendini tamir edememesi, saç hücresi ölümüne ve kalıcı işitme kaybına yol açabilir. Yetişkin koklear saç hücreleri, gürültü veya ototoksik ilaçlara maruz kalma nedeniyle stereosilya kaybından sonra birkaç gün hayatta kalabilir bu süreç içerisinde gen terapileri ya da kimyasal müdahaleler ile saç hücrelerinin potansiyel olarak kurtarılması ve onarılması mümkün olabilir.

Ektopik ATOH1'in farklılaşmamış dokularda aşırı ekspresyonu, in vitro ve in vivo olarak korti organındaki destek hücrelerin farklılaşmasına neden olduğu bilinmektedir (89, 33).

Yapılan bir çalışmada, deri altı kanamisin ve intraperitoneal furosemid kombinasyonu kullanarak C57Bl/6 farelerinde koklear saç hücreleri ablate edilerek ATOH1 (Ad28.gfap.ATOH1) ile saç hücrelerin rejenerasyonu ve işitme iyileşmesini destekleme yeteneği araştırılmıştır. Sonuç olarak Ad28.gfap.ATOH1 ile tedavinin saç hücresi yenilenmesini desteklediği ve orta düzeyde işitme iyileşmesi sağladığı belirtilmiştir (90). Izumikawa ve ekibi (13), ATOH1'in ototoksik ilaçlarla işitme kaybı olan kokleada saç hücresi rejenerasyonunu indükleyebildiğini göstermiştir. Çalışmalarında yeni üretilen saç hücrelerinin muhtemelen sağır kokleada kalan destekleyici hücrelerin fenotipik dönüşümü ile oluşturulduğu belirtilmiştir. Koenzim Q10 (91) D- ve L metiyonin (92), tiyöüre (93) ve vitamin B, C ve E dahil olmak üzere çeşitli antioksidanların in vitro ve in vivo olarak ilaca bağlı ototoksisiteyi önlemede etkili olduğu bilinmektedir.

Gürültüye Bağlı İşitme Kaybında Gen Terapisi

Gürültüye bağlı işitme kaybı akustik travma, patlamalar, silah sesleri ve havai fişekler gibi yüksek yoğunluklu seslere maruz kalmaktan kaynaklanan kalıcı koklear hasar nedeniyle açığa çıkmaktadır. Genellikle koklear saç hücrelerinin yıkımından ve/veya saç demetlerinin hasar görmesinden kaynaklandığı

bilinmektedir. Hassas saç hücreleri ototoksik ilaç kullanımının yanı sıra akustik travmalara karşı da oldukça hassastır. Bu nedenle, işitme ile ilgili hücrelerin (saç hücreleri, destek hücreler vb) korunması ve yenilenmesi, gürültüye bağlı işitme kaybına yönelik tedavilerde kilit bir faktördür.

Saç hücresi farklılaşması için kritik bir gen olan ATOH1'i taşıyan bir viral vektörün kokleaya iletilmesiyle stereosil hücrelerin rejenerasyon yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada 60-70dB'lik işitme kaybına neden olacak silahlı sesi simüle edilerek hem iç hem de dış saç hücrelerin stereosil hücrelerinde hasar ve kayıp yaratılmıştır. Hasar gören saç hücrelerinin çoğu, travmadan sonra 10 güne kadar korti organında kaldığı görülmüştür. EGFP etiketli ATOH1 geni taşıyan viral vektör, gürültüye maruz kaldıktan sonraki yedinci günde yuvarlak pencereden kokleaya aşılandığı, aşılardan bir ay sonra ölçülen işitsel beyin sapı yanıtı ve işitme eşiklerinin önemli ölçüde iyileştiği, TEM analizlerinde stereosil demetlerinin onarıldığı ve yenilediği bildirilmiştir. Bu çalışma sonunda ATOH1 tabanlı gen tedavisinin, saç hücreleri ölmeden önce gerçekleştirilmesi durumunda, gürültüye bağlı işitme kaybını tedavi etme potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (94).

Çalışmalar, bireylerin gürültüye bağlı işitme kaybına duyarlılığının genetik faktörlerle ilişkili olduğunu da göstermiştir. CAT, GSTM1, PON2 ve SOD2, oksidatif stres yolunun aktivasyonu ile önemli ölçüde ilişkili olup HSP70-1 ve HSP70-2 aracılı ısı şok proteinler ise akustik hasar anında işitmenin korunmasını sağlamaktadır (95).

Gürültüye bağlı işitme kaybına yönelik yapılan gen terapi uygulamaları hala araştırma aşamasında olmasına rağmen, işitme kaybına yakınlıkla ilgili genleri inhibe edip, saç hücrelerin korunması ve rejenerasyonu ile ilgili genlerin düzenlenerek işitmenin korunmasına yönelik anlamlı etkiler elde edilmiştir.

Yaşa Bağlı İşitme Kaybında Gen Terapisi

Yaşa bağlı işitme kaybı olarak da bilinen yaşlılık sağırılığı, yaşa bağlı işitme sisteminde kümülatif patolojik ve fizyolojik bir değişikliktir. Dünya Sağlık Örgütüne göre yaşlılık sağırılığı, yaşlılar arasında en yaygın ikinci, dünyada ise en yaygın üçüncü hastalık olarak rapor edilmiştir. Yetmiş yaşlarındaki bireylerin yaklaşık yarısı ve 85 yaş ve üzerindekiilerin %80'i günlük iletişimi etkileyecek kadar şiddetli işitme kaybına sahiptir (96). Gelişmiş ülkelerdeki yaşlanan nüfus nedeniyle, işitme kaybının giderek yaygınlaşan bir engellilik haline gelmesi muhtemeldir.

İşitme kaybının doğal yaşlanma sürecinin bir parçası oldu-

ğu düşünülse de tüm insanlar yaşlanmaya bağlı işitme kaybından muzdarip değildir. Kalıtım çalışmaları, değişkenliğin kaynağının hem genetik hem de çevresel olduğunu ileri sürmektedir (97). Yapılan bir çalışmada, metabolik yaşlılığa bağlı işitme kaybında kalıtsallığın kız kardeşler arasında %53 olduğunu göstermiştir (98).

NAT2 (arilamin N-asetiltransferaz 2) ve GST gibi genler (99), Grainyhead -Like protein 2 homologu (GRHL2) gibi transkripsiyon faktörler (100), KCNQ4 gibi potasyum homeostaz molekülleri (101); vazoaaktif peptid endoteli (EDN1) (102); mitokondriyal ayrıştırıcı protein 2 (UCP2) (103); ve mitokondriyal DNA mutasyonları gibi oksidatif stresle bağlantılı olan çeşitli genler ile yaşlılığa bağlı işitme kaybı arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur. Çok sayıda çalışma, GRM7 (104,105), IQGAP2 (106), NAT2 (107,108), CDH23 (109) GİPC3 (110) gibi bazı genlerdeki mutasyonların yaşlılık kaynaklı işitme kaybına yatkınlığı artırabileceğini göstermiştir. Diğer sensörinöral işitme kayıp nedenlerinde olduğu gibi yaşa bağlı işitme kaybında da saç hücrelerin korunması ve yenilenmesine yönelik çalışmalar araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Yapılan bir çalışmada SİRT1 ekspresyonunun saç hücrelerinin ölümünü ve işitme kaybını azalttığı ve buna bağlı sağırılık gelişimini engellediği bulunmuştur (111).

Ayrıca yaşlılık kaynaklı işitme kaybı ile ilişkili olduğu düşünülen; NKCC1 (112), GİLZ (113), MUCOLİPİN 1 ve 3 (114), WFS1 (115), COX3, GJB2 (116), NEUROPİLİN-1 (117), P2RX2 (118), BAK1 (119), ŞCNQ5 (118), ERBB3 (118), CCR3 (113), SOCS3 (118) genlere yönelik çalışmaların gelecekte artması beklenmektedir.

Tartışma

Dünya geneli yarım milyar insanı etkileyen ve önümüzdeki yıllarda insidansı daha da artacağı düşünülen işitme kaybı ciddi bir halk sağlığı problemidir. İşitme kayıp nedenlerinin %90'ı sensörinöral işitme kayıpları oluşturmakta birlikte konjenital işitme kaybının %50'si de genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

İşitme kaybında gen terapi yöntemleri son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı bir alandır. Gen terapi yöntemleri kapsamında, gen replasmanı, gen susturma ve son yıllarda oldukça popüler olan CRISPR/Cas9 teknolojisi sayesinde gen modifikasyonlarının kullanıldığı çok sayıda çalışma, sensörinöral işitme kaybı tedavisine odaklanmıştır. Literatür incelendiğinde çoğu çalışmanın hala hücresel düzeyde veya hayvan modelleriyle sınırlı olduğu görülmüştür. Kemirgen ve yetişkin memelilerin (insan dahil), hasarlı saç hücrelerini rejenere

etmede sınırlı yeteneğe sahip olduğu bilinmektedir (120,121,122).

Gen terapi yöntemleri saç hücreleri, destek hücreleri ve spiral ganglion nöronları çeşitli hasarlardan korumanın yanı sıra saç hücre rejenereasyonunu indükleyerek potansiyel klinik uygulama beklentilerini artırmaktadır. Gen terapi yöntemlerinin kullanıldığı 2'si işitme kaybı ile ilgili olmak üzere 38 ülkede tamamlanmış, onaylanmış ve devam etmekte olan 2500'den fazla klinik çalışma bulunmaktadır (123).

Klinik çalışmaların yaygınlaşması için hala anlaşılması gereken birçok mekanizmaların olduğunu, hayvan modellerinin, gen vektörlerinin ve dağıtım yollarının optimize edilmesi gerektiğini söyleyebiliriz (124,125). Dolayısıyla optimizasyon çalışmalarının yapılması, giderek daha fazla işitme ile ilgili genin tanımlanması ve gen terapi teknolojisinin gelişmesiyle birlikte işitme ile ilgili daha fazla klinik araştırmanın yapılması beklenmektedir. Sensörinöral işitme kaybı için gen tedavisi, birkaç klinik denemenin onaylanmasından sonra klinik tedavi olmaya bir adım daha yaklaşacak, gelecekte işitme engelli hastalar için oldukça etkili ve güvenli bir tedavi olacaktır.

Received Date/Geliş Tarihi: 06.10.2021

Accepted Date/Kabul Tarihi: 07.12.2021

Kaynaklar

1. Alberti, P. W. (2001). The anatomy and physiology of the ear and hearing. Occupational exposure to noise: Evaluation, prevention, and control, 53-62.
2. Ding, N., Lee, S., Lieber-Kotz, M., Yang, J., & Gao, X. (2021). Advances in genome editing for genetic hearing loss. Advanced drug delivery reviews, 168, 118-133.
3. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. Journal of Neuroscience, 29(45), 14077-14085.
4. Kniss, J. S., Jiang, L., & Piotrowski, T. (2016). Insights into sensory hair cell regeneration from the zebrafish lateral line. Current opinion in genetics & development, 40, 32-40.
5. Anagnostopoulos, A.V. 2002. A compendium of Mouse knockouts with inner ear defects. Trends Genet. 18: S21- S38
6. Parkinson, N., and Brown, S.D. 2002. Focusing on the genetics of hearing: you ain't heard nothin' yet. Genome Biol. 3: comment2006.1-2006.6
7. Noben-Trauth, K. and Johnson, K.R. 2009. Inheritance patterns of progressive hearing loss in laboratory strains of mice. Brain Res. 1277: 42-51



8. Pennacchio, L. A. (2003). Insights from human/mouse genome comparisons. *Mammalian genome*, 14(7), 429-436.
9. Ingham, N. J., Pearson, S. A., Vancollie, V. E., Rook, V., Lewis, M. A., Chen, J., ... & Steel, K. P. (2019). Mouse screen reveals multiple new genes underlying mouse and human hearing loss. *PLoS biology*, 17(4), e3000194.
10. Yoshimura, H., Shibata, S. B., Ranum, P. T., Moteki, H., & Smith, R. J. (2019). Targeted allele suppression prevents progressive hearing loss in the mature murine model of human TMC1 deafness. *Molecular Therapy*, 27(3), 681-690.
11. Ohlemiller, K. K. (2006). Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain research*, 1091(1), 89-102.
12. Reis, A. D., Dalmolin, S. P., & Dallegre, E. (2017). Animal models for hearing evaluations: a literature review. *Revista Cefac*, 19, 417-428.
13. Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K. A., Swiderski, D. L., Dolan, D. F., ... & Raphael, Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by ATOH1 gene therapy in deaf mammals. *Nature medicine*, 11(3), 271-276.
14. DeSmidt, A. A., Zou, B., Grati, M. H., Yan, D., Mittal, R., Yao, Q., ... & Lu, Z. (2020). Zebrafish Model for Nonsyndromic X-Linked Sensorineural Deafness, DFNX1. *The Anatomical Record*, 303(3), 544-555.
15. Zhang, W., Zhang, Y., Sood, R., Ranjan, S., Surovtseva, E., Ahmad, A., ... & Zou, J. (2011b). Visualization of intracellular trafficking of MATH1 protein in different cell types with a newly-constructed nonviral gene delivery plasmid. *The journal of gene medicine*, 13(2), 134-144.
16. Schlecker, C., Praetorius, M., Brough, D. E., Presler, R. G., Hsu, C., Plinkert, P. K., & Staecker, H. (2011). Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene therapy*, 18(9), 884-890.
17. Guan, M., Zhang, J., Jia, Y., Cao, X., Lou, X., Li, Y., & Gao, X. (2019). Middle ear structure and transcanal approach appropriate for middle ear surgery in rabbits. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(2), 1248-1255.
18. György, B., Nist-Lund, C., Pan, B., Asai, Y., Karaviti, K. D., Kleinstiver, B. P., ... & Corey, D. P. (2019). Allele-specific gene editing prevents deafness in a model of dominant progressive hearing loss. *Nature medicine*, 25(7), 1123-1130.
19. Ryu, N., Kim, M. A., Choi, D. G., Kim, Y. R., Sonn, J. K., Lee, K. Y., & Kim, U. K. (2019). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of splicing mutation causing congenital hearing loss. *Gene*, 703, 83-90.
20. Han, M., Yu, D., Song, Q., Wang, J., Dong, P., & He, J. (2015). Polybrene: Observations on cochlear hair cell necrosis and minimal lentiviral transduction of cochlear hair cells. *Neuroscience letters*, 600, 164-170.
21. Pietola, L., Aarnisalo, A. A., Joensuu, J., Pellinen, R., Wahlfors, J., & Jero, J. (2008). HOX-GFP and WOX-GFP lentivirus vectors for inner ear gene transfer. *Acta oto-laryngologica*, 128(6), 613-620.
22. Derby, M. L., Sena-Esteves, M., Breakefield, X. O., & Corey, D. P. (1999). Gene transfer into the mammalian inner ear using HSV-1 and vaccinia virus vectors. *Hearing research*, 134(1-2), 1-8.
23. Staecker, H., Liu, W., Malgrange, B., Lefebvre, P. P., & Van De Water, T. R. (2007). Vector-mediated delivery of bcl-2 prevents degeneration of auditory hair cells and neurons after injury. *ORL*, 69(1), 43-50.
24. Maguire, C. A., & Corey, D. P. (2020). Viral vectors for gene delivery to the inner ear. *Hearing research*, 394, 107927.
25. Tao, Y., Huang, M., Shu, Y., Ruprecht, A., Wang, H., Tang, Y., ... & Chen, Z. Y. (2018). Delivery of adeno-associated virus vectors in adult mammalian inner-ear cell subtypes without auditory dysfunction. *Human gene therapy*, 29(4), 492-506.
26. Gao, X., Tao, Y., Lamas, V., Huang, M., Yeh, W. H., Pan, B., et al. (2018). Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature* 553, 217-221. doi: 10.1038/nature25164.
27. Zhang, W., Zhang, Y., Löbler, M., Schmitz, K. P., Ahmad, A., Pyykkö, I., & Zou, J. (2011a). Nuclear entry of hyperbranched polylysine nanoparticles into cochlear cells. *International journal of nanomedicine*, 6, 535.
28. Belyantseva, I. A., Boger, E. T., Naz, S., Frolenkov, G. I., Sellers, J. R., Ahmed, Z. M., & Friedman, T. B. (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nature cell biology*, 7(2), 148-156.
29. Belyantseva, I. A., Boger, E. T., & Friedman, T. B. (2003). Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13958-13963.
30. Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., ... & Chen, Z. Y. (2016). Identification of adeno-associated viral vectors that target neonatal and adult mammalian inner ear cell subtypes. *Human gene therapy*, 27(9), 687-699.
31. Johnson, K. R., Tian, C., Gagnon, L. H., Jiang, H., Ding, D., & Salvi, R. (2017). Effects of Cdh23 single nucleotide substitutions on age-related hearing loss in C57BL/6 and 129S1/Sv mice and comparisons with congenic strains. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
32. Mianné, J., Chessum, L., Kumar, S., Aguilar, C., Codner, G., Hutchison, M., ... & Bowl, M. R. (2016). Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair. *Genome medicine*, 8(1), 1-12.
33. Belyantseva, I. A. (2009). Helios® Gene Gun-Mediated Transfection of the Inner Ear Sensory Epithelium. In *Auditory and Vestibular Research* (pp. 103-124). Humana Press.
34. Brigande, J. V., Gubbels, S. P., Woessner, D. W., Jungwirth, J. J., & Bresser, C. S. (2009). Electroporation-mediated gene transfer to the developing mouse inner ear. In *Auditory and Vestibular Research* (pp. 125-139). Humana Press.
35. Gubbels, S. P., Woessner, D. W., Mitchell, J. C., Ricci, A. J., & Brigande, J. V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature*, 455(7212), 537-541.
36. Yeh, W. H., Chiang, H., Rees, H. A., Edge, A. S., & Liu, D. R. (2018). In vivo base editing of post-mitotic sensory cells. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
37. Hastings, M. L., & Jones, T. A. (2019). Antisense oligonucleotides for the treatment of inner ear dysfunction. *Neurotherapeutics*, 16(2), 348-359.
38. Ahmed, H., Shubina-Oleik, O., & Holt, J. R. (2017). Emerging gene therapies for genetic hearing loss. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 18(5), 649-670.



39. Yoshimura, H., Shibata, S. B., Ranum, P. T., & Smith, R. J. (2018). Enhanced viral-mediated cochlear gene delivery in adult mice by combining canal fenestration with round window membrane inoculation. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
40. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature*, 411(6836), 494-498.
41. Karimian, A., Azizian, K., Parsian, H., Rafeian, S., Shafiei-Irannejad, V., Kheyrolah, M., ... & Yousefi, B. (2019). CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *Journal of cellular physiology*, 234(8), 12267-12277.
42. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
43. Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, 21(2), 121-131.
44. Lustig, L., & Akil, O. (2019). Cochlear gene therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(9), a033191.
45. Roberson, D. W., & Rubel, E. W. (1994). Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *American Journal of Otolaryngology*, 15(1), 28-34.
46. Sobkowicz, H. M., August, B. K., & Slapnick, S. M. (1996). Post-traumatic survival and recovery of the auditory sensory cells in culture. *Acta oto-laryngologica*, 116(2), 257-262.
47. Cox, B. C., Chai, R., Lenoir, A., Liu, Z., Zhang, L., Nguyen, D. H., ... & Zuo, J. (2014). Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo. *Development*, 141(4), 816-829.
48. Golub, J. S., Tong, L., Ngyuen, T. B., Hume, C. R., Palmiter, R. D., Rubel, E. W., & Stone, J. S. (2012). Hair cell replacement in adult mouse utricles after targeted ablation of hair cells with diphtheria toxin. *Journal of Neuroscience*, 32(43), 15093-15105.
49. Bucks, S. A., Cox, B. C., Vlosich, B. A., Manning, J. P., Nguyen, T. B., & Stone, J. S. (2017). Supporting cells remove and replace sensory receptor hair cells in a balance organ of adult mice. *Elife*, 6, e18128.
50. Fukui, H., & Raphael, Y. (2013). Gene therapy for the inner ear. *Hearing research*, 297, 99-105.
51. Bremer, H. G., Versnel, H., Hendriksen, F. G., Topsakal, V., Grolman, W., & Klis, S. F. (2014). Does vestibular end-organ function recover after gentamicin-induced trauma in Guinea pigs?. *Audiology and Neurotology*, 19(2), 135-150.
52. Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Wang, V. Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen, H. J., ... & Zoghbi, H. Y. (2001). Proprioceptor pathway development is dependent on MATH1. *Neuron*, 30(2), 411-422.
53. Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S., & Kageyama, R. (1995). A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15), 8730-8738.
54. Van Keymeulen, A., Mascre, G., Youseff, K. K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N., ... & Blanpain, C. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *Journal of cell biology*, 187(1), 91-100.
55. Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., & Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of MATH1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 294(5549), 2155-2158.
56. Woods, C., Montcouquiol, M., & Kelley, M. W. (2004). MATH1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nature neuroscience*, 7(12), 1310-1318.
57. Cai, T., Jen, H. I., Kang, H., Klisch, T. J., Zoghbi, H. Y., & Groves, A. K. (2015). Characterization of the transcriptome of nascent hair cells and identification of direct targets of the ATOH1 transcription factor. *Journal of Neuroscience*, 35(14), 5870-5883.
58. Kawamoto, K., Ishimoto, S. I., Minoda, R., Brough, D. E., & Raphael, Y. (2003). MATH1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *Journal of Neuroscience*, 23(11), 4395-4400.
59. Walters, B. J., Coak, E., Dearman, J., Bailey, G., Yamashita, T., Kuo, B., & Zuo, J. (2017). In vivo interplay between p27Kip1, GATA3, ATOH1, and POU4F3 converts non-sensory cells to hair cells in adult mice. *Cell reports*, 19(2), 307-320.
60. Kelly, M. C., Chang, Q., Pan, A., Lin, X., & Chen, P. (2012). ATOH1 directs the formation of sensory mosaics and induces cell proliferation in the postnatal mammalian cochlea in vivo. *Journal of Neuroscience*, 32(19), 6699-6710.
61. Kuo, B. R., Baldwin, E. M., Layman, W. S., Taketo, M. M., & Zuo, J. (2015). In vivo cochlear hair cell generation and survival by coactivation of β -catenin and ATOH1. *Journal of Neuroscience*, 35(30), 10786-10798.
62. Maass, J. C., Berndt, F. A., Cánovas, J., & Kukuljan, M. (2013). p27Kip1 knockdown induces proliferation in the organ of Corti in culture after efficient shRNA lentiviral transduction. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 14(4), 495-508.
63. Cai, T., Seymour, M. L., Zhang, H., Pereira, F. A., & Groves, A. K. (2013). Conditional deletion of ATOH1 reveals distinct critical periods for survival and function of hair cells in the organ of Corti. *Journal of Neuroscience*, 33(24), 10110-10122.
64. Atkinson, P. J., Dong, Y., Gu, S., Liu, W., Najjarro, E. H., Udagawa, T., & Cheng, A. G. (2018). Sox2 haploinsufficiency primes regeneration and Wnt responsiveness in the mouse cochlea. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1641-1656.
65. Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., ... & Zoghbi, H. Y. (1999). MATH1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, 284(5421), 1837-1841.
66. Baker, K., Brough, D. E., & Sacken, H. (2009). Repair of the vestibular system via adenovector delivery of ATOH1: a potential treatment for balance disorders. *Gene Therapy of Cochlear Deafness*, 66, 52-63.
67. He, L., Guo, J. Y., Qu, T. F., Wei, W., Liu, K., Peng, Z., ... & Gong, S. S. (2020). Cellular origin and response of flat epithelium in the vestibular end organs of mice to ATOH1 overexpression. *Hearing research*, 391, 107953.
68. Hicks, K. L., Wisner, S. R., Cox, B. C., & Stone, J. S. (2020). ATOH1 is



- required in supporting cells for regeneration of vestibular hair cells in adult mice. *Hearing research*, 385, 107838.
69. Zhang, W., Kim, S. M., Wang, W., Cai, C., Feng, Y., Kong, W., & Lin, X. (2018). Cochlear gene therapy for sensorineural hearing loss: current status and major remaining hurdles for translational success. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 221.
70. Hilgert, N., Smith, R. J., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2-3), 189-196.
71. Iizuka, T., Kamiya, K., Gotoh, S., Sugitani, Y., Suzuki, M., Noda, T., ... & Ikeda, K. (2015). Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Human molecular genetics*, 24(13), 3651-3661.
72. Takada, Y., Beyer, L. A., Swiderski, D. L., O'Neal, A. L., Prieskorn, D. M., Shivatzki, S., ... & Raphael, Y. (2014). Connexin 26 null mice exhibit spiral ganglion degeneration that can be blocked by BDNF gene therapy. *Hearing research*, 309, 124-135.
73. Ryu, N., Kim, M. A., Park, D., Lee, B., Kim, Y. R., Kim, K. H., ... & Kim, U. K. (2018). Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2095-2102.
74. Kim, M. A., Kim, S. H., Ryu, N., Ma, J. H., Kim, Y. R., Jung, J., ... & Kim, U. K. (2019). Gene therapy for hereditary hearing loss by SLC26A4 mutations in mice reveals distinct functional roles of pendrin in normal hearing. *Theranostics*, 9(24), 7184.
75. Nist-Lund, C. A., Pan, B., Patterson, A., Asai, Y., Chen, T., Zhou, W., ... & Holt, J. R. (2019). Improved TMCI gene therapy restores hearing and balance in mice with genetic inner ear disorders. *Nature communications*, 10(1), 1-14.
76. Shibata, S. B., Ranum, P. T., Moteki, H., Pan, B., Goodwin, A. T., Goodman, S. S., ... & Smith, R. J. (2016). RNA interference prevents autosomal-dominant hearing loss. *The American Journal of Human Genetics*, 98(6), 1101-1113.
77. Wu, P., Wu, X., Zhang, C., Chen, X., Huang, Y., & Li, H. (2021). Hair Cell Protection from Ototoxic Drugs. *Neural Plasticity*, 2021.
78. Kalyanam, B., Sarala, N., Mohiyuddin, S. A., & Diwakar, R. (2018). Auditory function and quality of life in patients receiving cisplatin chemotherapy in head and neck cancer: a case series follow-up study. *Journal of cancer research and therapeutics*, 14(5), 1099.
79. Li, H., & Steyger, P. S. (2011). Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells. *Scientific reports*, 1(1), 1-5.
80. Marcotti, W., Van Netten, S. M., & Kros, C. J. (2005). The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *The Journal of physiology*, 567(2), 505-521.
81. Ding, Y., Leng, J., Fan, F., Xia, B., & Xu, P. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations in hearing loss. *Biochemical genetics*, 51(7), 588-602.
82. Langer, T., am Zehnhoff-Dinnesen, A., Radtke, S., Meitert, J., & Zolk, O. (2013). Understanding platinum-induced ototoxicity. *Trends in pharmacological sciences*, 34(8), 458-469.
83. Fetoni, A. R., Quaranta, N., Marchese, R., Cadoni, G., Paludetti, G., & Sergi, B. (2004). The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. *International journal of audiology*, 43(8), 465-470.
84. Cai, J., Wu, X., Li, X., Ma, C., Xu, L., Guo, X., ... & Han, Y. (2019). Allicin protects against cisplatin-induced stria vascularis damage: Possible relation to inhibition of caspase-3 and PARP-1-AIF-mediated apoptotic pathways. *ORL*, 81(4), 202-214.
85. Zhang, Y., Li, W., He, Z., Wang, Y., Shao, B., Cheng, C., ... & Gao, X. (2019). Pre-treatment with fasudil prevents neomycin-induced hair cell damage by reducing the accumulation of reactive oxygen species. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 264.
86. Yu, X., Liu, W., Fan, Z., Qian, F., Zhang, D., Han, Y., ... & Wang, H. (2017). c-Myb knockdown increases the neomycin-induced damage to hair-cell-like HEI-OCI cells in vitro. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.
87. Garcia-Berrocal, J. R., Nevado, J., Ramirez-Camacho, R., Sanz, R., González-García, J. A., Sánchez-Rodríguez, C., ... & Trinidad Cabezas, A. (2007). The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *British journal of pharmacology*, 152(7), 1012-1020.
88. Gentilin, E., Simoni, E., Candito, M., Cazzador, D., & Astolfi, L. (2019). Cisplatin-induced ototoxicity: updates on molecular targets. *Trends in molecular medicine*, 25(12), 1123-1132.
89. Zheng, J. L., & Gao, W. Q. (2000). Overexpression of MATH1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nature neuroscience*, 3(6), 580-586.
90. Kraft, S., Hsu, C., Brough, D. E., & Staecker, H. (2013). ATOH1 induces auditory hair cell recovery in mice after ototoxic injury. *The Laryngoscope*, 123(4), 992-999.
91. Fetoni, A. R., Eramo, S. L. M., Rolesi, R., Troiani, D., & Paludetti, G. (2012). Antioxidant treatment with coenzyme Q-ter in prevention of gentamycin ototoxicity in an animal model. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 32(2), 103.
92. Campbell, K. C., Martin, S. M., Meech, R. P., Hargrove, T. L., Verhulst, S. J., & Fox, D. J. (2016). D-methionine (D-met) significantly reduces kanamycin-induced ototoxicity in pigmented guinea pigs. *International journal of audiology*, 55(5), 273-278.
93. Ekborn, A., Laurell, G., Ehrsson, H., & Miller, J. (2003). Intracochlear administration of thiourea protects against cisplatin-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hearing research*, 181(1-2), 109-115.
94. Yang, S. M., Chen, W., Guo, W. W., Jia, S., Sun, J. H., Liu, H. Z., ... & He, D. Z. (2012). Regeneration of stereocilia of hair cells by forced ATOH1 expression in the adult mammalian cochlea.
95. Clifford, R. E., Hoffer, M., & Rogers, R. (2016). The genomic basis of noise-induced hearing loss: A literature review organized by cellular pathways. *Otology & Neurotology*, 37(8), e309-e316.
96. Cunningham, L. L., & Tucci, D. L. (2017). Hearing loss in adults. *New England Journal of Medicine*, 377(25), 2465-2473.
97. Huang, Q., & Tang, J. (2010). Age-related hearing loss or presbycusis. *European Archives of Oto-rhino-laryngology*, 267(8), 1179-1191.
98. Gates, G. A., Couropmitree, N. N., & Myers, R. H. (1999). Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 125(6), 654-659.



99. Bared, A., Ouyang, X., Angeli, S., Du, L. L., Hoang, K., Yan, D., & Liu, X. Z. (2010). Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 143(2), 263-268.
100. Van Laer, L., Van Eyken, E., Fransen, E., Huyghe, J. R., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., ... & Van Camp, G. (2008). The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCEP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Human molecular genetics*, 17(2), 159-169.
101. Arnett, J., Emery, S. B., Kim, T. B., Boerst, A. K., Lee, K., Leal, S. M., & Lesperance, M. M. (2011). Autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss due to a novel mutation in the KCNQ4 gene. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*, 137(1), 54-59.
102. Uchida, Y., Sugiura, S., Nakashima, T., Ando, F., & Shimokata, H. (2009). Endothelin-1 gene polymorphism and hearing impairment in elderly Japanese. *The Laryngoscope*, 119(5), 938-943.
103. Sugiura, S., Uchida, Y., Nakashima, T., Ando, F., & Shimokata, H. (2010). The association between gene polymorphisms in uncoupling proteins and hearing impairment in Japanese elderly. *Acta oto-laryngologica*, 130(4), 487-492.
104. Newman, D. L., Fisher, L. M., Ohmen, J., Parody, R., Fong, C. T., Frisina, S. T., ... & Friedman, R. A. (2012). GRM7 variants associated with age-related hearing loss based on auditory perception. *Hearing research*, 294(1-2), 125-132.
105. Friedman, R. A., Van Laer, L., Huentelman, M. J., Sheth, S. S., Van Eyken, E., Corneveaux, J. J., ... & Van Camp, G. (2009). GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Human molecular genetics*, 18(4), 785-796.
106. Van Laer, L., Huyghe, J. R., Hannula, S., Van Eyken, E., Stephan, D. A., Mäki-Torkko, E., ... & Van Camp, G. (2010). A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *European Journal of Human Genetics*, 18(6), 685-693.
107. Van Eyken, E., Van Camp, G., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., Demeester, K., ... & Van Laer, L. (2007). Contribution of the N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2* 6A to age-related hearing impairment. *Journal of medical genetics*, 44(9), 570-578.
108. Ünal, M., Tamer, L., Doğruer, Z. N., Yildirim, H., Vayisoğlu, Y., & Çamdeviren, H. (2005). N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *The Laryngoscope*, 115(12), 2238-2241.
109. Noben-Trauth, K., Zheng, Q. Y., & Johnson, K. R. (2003). Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nature genetics*, 35(1), 21-23.
110. Charizopoulou, N., Lelli, A., Schraders, M., Ray, K., Hildebrand, M. S., Ramesh, A., ... & Noben-Trauth, K. (2011). Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nature communications*, 2(1), 1-12.
111. Pang, J., Xiong, H., Ou, Y., Yang, H., Xu, Y., Chen, S., ... & Zheng, Y. (2019). SIRT1 protects cochlear hair cell and delays age-related hearing loss via autophagy. *Neurobiology of aging*, 80, 127-137.
112. Liu Y, Chu H, Chen J, Zhou L, Chen Q, Yu Y, et al. Agerelated change in the expression of NKCC1 in the cochlear lateral wall of C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol*. 2014;134(10):1047-51.
113. Dong, Y., Li, M., Liu, P., Song, H., Zhao, Y., & Shi, J. (2014). Genes involved in immunity and apoptosis are associated with human presbycusis based on microarray analysis. *Acta oto-laryngologica*, 134(6), 601-608.
114. Wiwatpanit, T., Remis, N. N., Ahmad, A., Zhou, Y., Clancy, J. C., Cheatham, M. A., & García-Añoveros, J. (2018). Codeficiency of lysosomal mucopolipins 3 and 1 in cochlear hair cells diminishes outer hair cell longevity and accelerates age-related hearing loss. *Journal of Neuroscience*, 38(13), 3177-3189.
115. Kytövuori, L., Hannula, S., Mäki-Torkko, E., Sorri, M., & Majamaa, K. (2017). A nonsynonymous mutation in the WFS1 gene in a Finnish family with age-related hearing impairment. *Hearing research*, 355, 97-101.
116. Lin, X., Li, G., Zhang, Y., Zhao, J., Lu, J., Gao, Y., ... & Wu, H. (2019). Hearing consequences in Gjb2 knock-in mice: implications for human p. V37I mutation. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7416.
117. Salehi, P., Ge, M. X., Gundimeda, U., Michelle Baum, L., Lael Cantu, H., Lavinsky, J., ... & Friedman, R. A. (2017). Role of Neuropilin-1/Semaphorin-3A signaling in the functional and morphological integrity of the cochlea. *PLoS genetics*, 13(10), e1007048.
118. Bouzid, A., Smeti, I., Dhoubil, L., Roche, M., Achour, I., Khalfallah, A., ... & Masmoudi, S. (2018). Down-expression of P2RX2, KCNQ5, ERBB3 and SOCS3 through DNA hypermethylation in elderly women with presbycusis. *Biomarkers*, 23(4), 347-356.
119. Falah, M., Najafi, M., Houshmand, M., & Farhadi, M. (2016). Expression levels of the BAK1 and BCL2 genes highlight the role of apoptosis in age-related hearing impairment. *Clinical interventions in aging*, 11, 1003
120. Taylor, R. R., Filia, A., Paredes, U., Asai, Y., Holt, J. R., Lovett, M., & Forge, A. (2018). Regenerating hair cells in vestibular sensory epithelia from humans. *Elife*, 7, e34817.
121. Wang, T., Chai, R., Kim, G. S., Pham, N., Jansson, L., Nguyen, D. H., ... & Cheng, A. G. (2015). Lgr5+ cells regenerate hair cells via proliferation and direct transdifferentiation in damaged neonatal mouse utricle. *Nature communications*, 6(1), 1-15.
122. Wu, J., Li, W., Lin, C., Chen, Y., Cheng, C., Sun, S., ... & Li, H. (2016). Co-regulation of the Notch and Wnt signaling pathways promotes supporting cell proliferation and hair cell regeneration in mouse utricles. *Scientific reports*, 6(1), 1-16.
123. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M., & Abedi, M. R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The journal of gene medicine*, 20(5), e3015.
124. Chen, H., Xing, Y., Xia, L., Chen, Z., Yin, S., & Wang, J. (2018). AAV-mediated NT-3 overexpression protects cochlea against noise-induced synaptopathy. *Gene therapy*, 25(4), 251-259.
125. Kikkawa, Y., Seki, Y., Okumura, K., Ohshiba, Y., Miyasaka, Y., Suzuki, S., ... & Yonekawa, H. (2012). Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Experimental animals*, 61(2), 85-98.