МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО УШНИ, НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ

д-р Иглика Петрова Станчева

КЛИНИЧНИ АСПЕКТИ НА НЕСИДРОМНАТА СЛУХОВА ЗАГУБА, СВЪРЗАНА С УВРЕДА НА КОНЕКСИН 26 И КОНЕКСИН 30

ДИСЕРТАЦИЯ

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН “ДОКТОР”

Научна специалност: 03.01.35 оториноларингология

научен ръководител: проф. д-р Диана Петрова Попова, д.м.н.

София
2015

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ 6

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 8

Слухов анализатор – анатомо – физиологични данни 8

Конексини – Cx26 и Cx30 12

Гени, кодиращи конексин 26 и конексин 30 12

Строеж и структура на конексините 14

Разпределение на конексините в кохлеята 16

Синтез и матурация на Cx26 и Cx30 19

Роля на gap junction каналите във вътрешното ухо за слуховата функция 24

Биофизични характеристики на кохлеарните gap junction 27

Молекулна селективност на кохлеарните gap junction канали 28

Несиндромна слухова загуба 29

Исторически данни за наследствената несиндромна слухова загуба 32

Съвременни аспекти на несиндомната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30 32

Епидемиологични данни за несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30 37

Генотип – фенотип корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30 39

Клинично протичане и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30 41

Влияние на други фактори върху клиничната изява на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 46

Състояние на проблема в България 46

Класификации на степента на слухова загуба 47

Неонатален и генетичен слухов скрининг 51

ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА 55

Цел 55

Задачи 55

Материали 57

Клиничен материал 57

Критерии за включване на пациетите в изследването: 57
Биологичен материал 58
Методи на изследванията 58
Клинични методи 58
Аудиологични методи 59
Генетични методи 64
Статистически методи 69
РЕЗУЛТАТИ 71
Създаване на клинична база данни и разширяване на ДНК биобанката на пациенти с несиндромна слухова загуба 71
Генетичен анализ за наличие на мутации и/или полиморфизми в GJB2 и GJB6, кодиращи конексин 26 и конексин 30 80
Генетичен анализ за носителсвто на мутации и полиморфизми в connexin 26 81
Генетичен анализ за носителство на мутации и полиморфизми в connexin 30 92
Корелационен анализ между клиничното протичане на несиндромната слухова загуба и установените мутации в гените, кодиращи конексин 26 и конексин 30 (генотип – фенотип корелации) 92
А. Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 92
Б. Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30 130
Клинична характеристика и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30 131
Пълна клинична характеристика и аудиологичен профил на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 в изследваната популация 131
Пълна клинична характеристика и аудиологичен профил на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30 в изследваната популация 133
Роля на генетичното изследване за мутации в конексин 26 и конексин 30 в семейното планиране 133
Генетична консултация 133
Пренатална диагностика 134

Препоръки за провеждане на генетичен слухов скрининг за GJB2 ..... **134**

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ **136**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ **155**

ИЗВОДИ **156**

ПРИНОСИ **158**

ПРИЛОЖЕНИЕ **160**

БИБЛИОГРАФИЯ **162**

Използвани съкращения

NSHL (Nonsyndromic hearing loss) – несиндромна слухова загуба
СЗ – слухова загуба
Cx/CX – конексин
GJB – gap junction beta protein
ЕР – ендоплазатичен ретикулум
IP_3 – инозитол трифосфат
ТПА – тонална прагова аудиометрия
ССЕП – слухови стволови евокирани потенциали

ВЪВЕДЕНИЕ

Намаленият слух е най – честото сензорно нарушение при хората. По данни на Световната здравна организация от 2014 година 360 милиона души по целия свят имат намаление на слуха в различна степен. (1) Нарушенията на слуха ангажират повече от 10% и от населението на Европа, а половината от тях се дължат на генетични причини. (2)

Дефекти в много гени са отговорни за наследствената несиндромна загуба на слуха. Децата с вродена глухота могат да се научат да комуникират с останалите само ако ранната диагноза е съпътствана от адекватно лечение и рехабилитация.

Въпреки голямата генетична хетерогенност, мутации в един генен локус DFNB1 водят до по – голяма част случаите на генетичната несиндромна слухова загуба, макар и не във всички популации. DFNB1 се намира в 13q11–q12 регион и съдържа GJB2 и GJB6 гените, кодиращи съответно конексин 26 и конексин 30. И двата гена се експресират в кохлеята и двойки рецесивни мутации в един от двата или и в двата едновременно могат да предизвикат слухова увреда.

В литературата има разнородни данни за клиничното протичане и аудиологичния профил на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексините във вътрешното ухо.

Уточнението на етиологията на слуховите увреди има важно значение, тъй като резултатите от изследванията през последните години показват добър функционален ефект от слухопротезирането и кохлеарната имплантация при наследствените форми на несиндромната невросензорна загуба на слуха.

В България през 2009 – 2010 година за пръв път е проведен гентичен скрининг за мутации в GJB2 сред 51 деца с тежка към дълбока слухова загуба.

До момента в нашата страна не са изследвани други гени, отговорни за слухова увреда. Липсват данни за разпространението, клиничното протичане и аудиологичния профил на пациентите с несиндромна слухова загуба.

Целта на настоящата работа е да се разшири броя на изследваните пациенти и да се анализират клиничните аспекти на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30, на фона на резултатите от генетичното изследване за мутации в гените GJB2 и GJB6. Във връзка с поставената цел да се установи честотата и ролята тези мутации за несиндромната слухова загуба, генотип – фенотип корелациите, клиничното протичане, аудиологичният профил, както и да се прецени нуждата от въвеждане на генетичен слухов скриниг.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Слуховата загуба е най – честият сензорен дефект у хората при раждането и в следродилния период. Повече от 5 % от населението на Земята страда от слухова увреда в различна степен. (1) Честота на слуховата загуба (над 35dB) в САЩ при раждането е около 1/500 новородени. (3) С възрастта броят на хората с увреден слух расте, като над 65 годишна възраст те са около 30%. Въпреки, че не е животозастрашаващо състояние, слуховата увреда предизвиква затруднение в социалния и професионалния живот. Тя води до проблеми с интеграцията на пациентите в обществото, особено когато е с прелингвално начало.

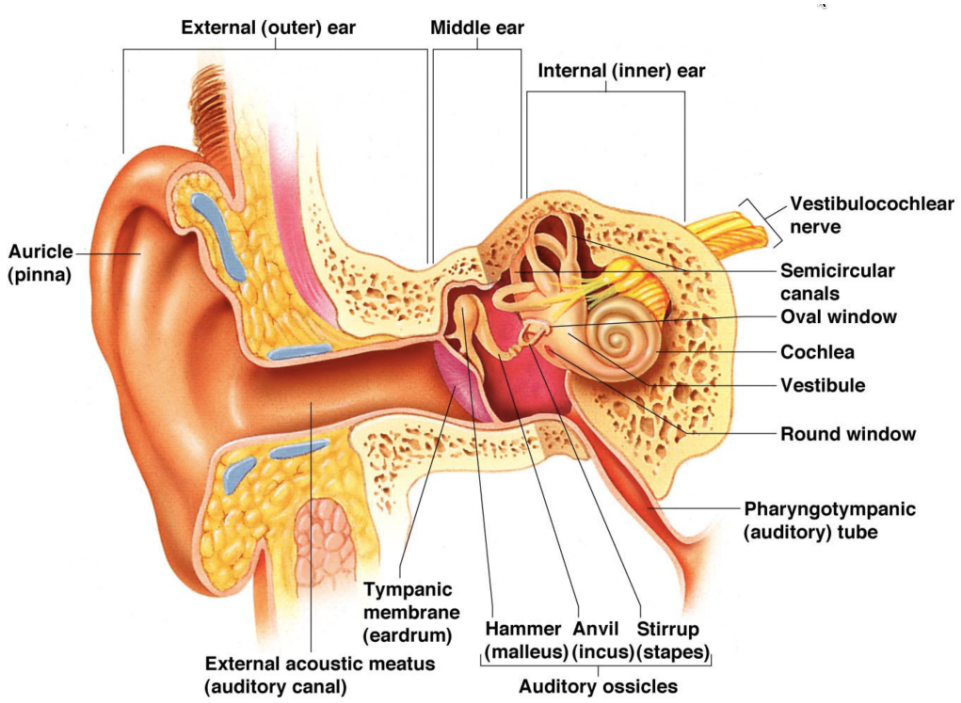
Слухов анализатор – анатомо – физиологични данни

Всеки сетивен орган, чрез разположените в него рецептори, възприема специфично за него дразнене и е в състояние да различава нюансите на дразнителите.

Звуковите вълни действат на органа на слуха – ухото. Чрез сложни приспособления колебанията на въздуха се предават на слуховите рецептори. Слуховият анализатор е изграден от рецептор, (разположен във вътрешното ухо), слухов нерв и слухова зона в слепоочния дял на кората на главния мозък.

Тъпанчевата мембрана, разположена на границата между външното и средното ухо, превръща звуковите вълни в механични трептения и ги предава на костиците в средното ухо. С нарастването на височината на звука нараства и честотата на трептенията на мембраната, а с нарастването на силата на звука трептенията

придобиват по-голям размах.



Фиг. 1 Анатомия на ухото (Pearson Benjamin Cummings, 2009)

Слуховите костици образуват подвижна верига, която провежда и усилва трептенията на тъпанчевата мембрана до вътрешното ухо. То е разположено дълбоко в слепоочната кост.

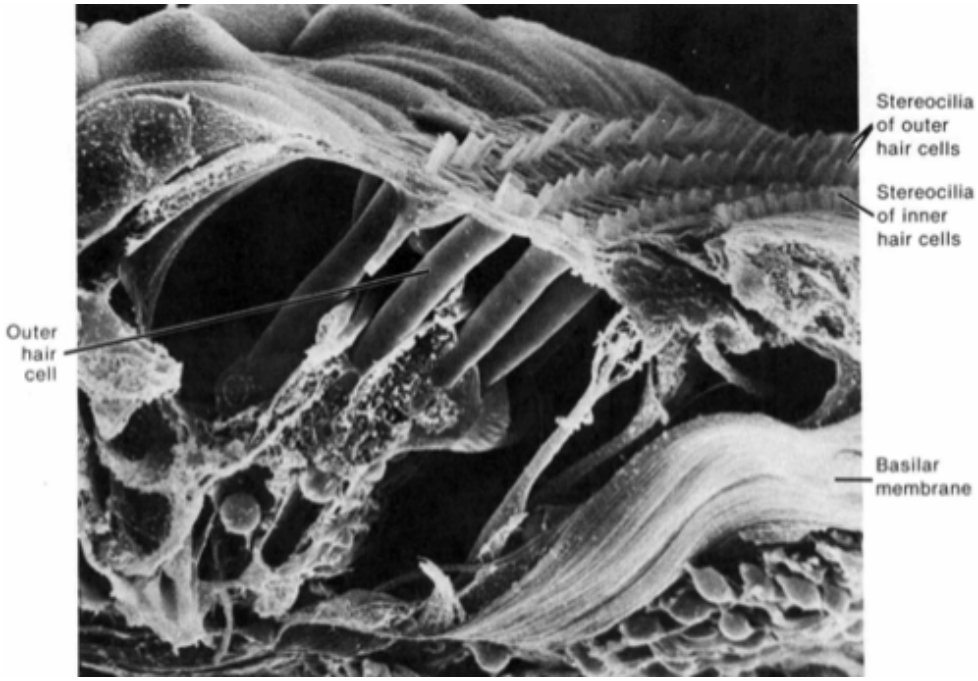
Вътрешното ухо при гръбначните животни се състои от кохлея и полуокръжни канали, където са поместени периферните рецептори на слуховия и вестибуларния анализтори. Функцията на двата анализатора зависи от строго контролираната околна среда, в частност от K^+, отговорни за слуховта трансдукция. Scala media е изпълена с ендолимфа, богата на K^+ (150mmol/l) и бедна на Na^+. Така по състав тя е близка до течностите в интрацелуларното пространство. Scala tympani и scala vestibuli са изпълнени с перилимфа, богата на Na^+ и бедна на K^+, което е типично за екстрацелуларната течност.

Основна движеща сила за сензорната трансдукция в кохлеята при бозайниците е високият положителен потенциал на ендолимфата (+80mV) или ендокохлеарен потенциал. Йонният

състав на ендолимфата и ендокохлеарният потенциал се генерират и поддържат от stria vascularis, изграждаща латералната стена на ductus cochlearis. Съществуването на ендокохлеарен потенциал изисква електрохимична изолация на stria vascularis от ендолимфата и перилимфата. Това се постига от мрежа от плътни контакти между маргиналните клетки, покриващи scala media, и между базалните клетки, отделящи stria vascularis от подлежащия ligamentum spirale, а също и между ендотелните клетки на интрастриалните капиляри. (4)

Ключов елемент са K^+ канали Kir 4.1 в плазената мембрана на интермедиерните клетки и K^+ канали в базалната мембрана на маргиналните клетки на stria vascularis. (5) Ендоплазматичният потенциал се генерира през мембраните на трети тип клетки в стрията, интермедиерните клетки, които са разположени между маргиналните и базалните клетки. (4)

Сензорния епител на вътрешното ухо съдържа рецепторни клетки, наречени ресничести. Те са заобиклени от поддържащи клетки. При всички класове гръбначни животни поддържащите клетки са свързани помежду си от големи ($>10\mu m^2$), стотици хиляди на брой gap junction канали. (4)



Фиг. 2 Кортиев орган

Ендокохлеарният потенциал е критичен по време на активацията на ресничестите клетки. Слуховите клетки, разположени на базиларната мембрана, трансформират механичните стимули в електрични сигнали, достигащи до мозъка. Звуковите вълни предизвикват вибрации на базиларната мембрана, водещи до деформация на цилиите на слуховите клетки с последващо отваряне на механочувствителни, неселективни катйонни канали. Те позволяват на K^+ от ендолимфата да навлезе в слуховите клетки и да предизвика тяхната деполяризация. Ендокохлеарният потенциал директно допринася за високата чувствителност на слуховите клетки към механична стимулация, тъй като създава голяма движеща сила за K^+ инфлукс от около 160 mV – разликата между потенциала на покой на слуховите клетки (-80mV) и ендокохлеарния потенциал (+80mV). След активацията на слуховите клетки K^+ се освобождава в перилимфата. Предполага се, че K^+ циркулира от перилимфата към ендолимфата през латералната кохлеарна стена. (6) Това се подкрепя от предположението, че инхибирането на K^+ поток от перилимфата

потиска ендокохлеарния потенциал. Тази рециркулация включва различни клетъчни компоненти. K^+ се придвижва първо през поддържащите и епителните клетки в membrana basilaris, към фиброцитите в ligamentum spirale (съединителната тъкан на латералната стена) и накрая към епителните клетки на stria vascularis, от които K^+ се отделя в ендолимфата.

Нарушението на този фин механизъм води до слухова увреда.

Конексини – Cx26 и Cx30

Конексините във вътрешното ухо имат огромна роля за поддържането на йонната хомеостаза, а от там и за слуховата функция. Те са група трансмембранни протеини, които позволяват междуклетъчна комуникация чрез формирането на gap junction канали и трансфер на йони и малки молекули между клетките. (7) Gap junction каналите са в основата на много физиологични процеси при гръбначните животни като слуховото възприятие, деполяризацията на сърдечния мускул, правилното ембрионално развитие и други. Ето защо мутации в гените, кодиращи конексините, могат да доведат до аномалии в развитието и функцията на съответните органите, включително и слухова загуба.

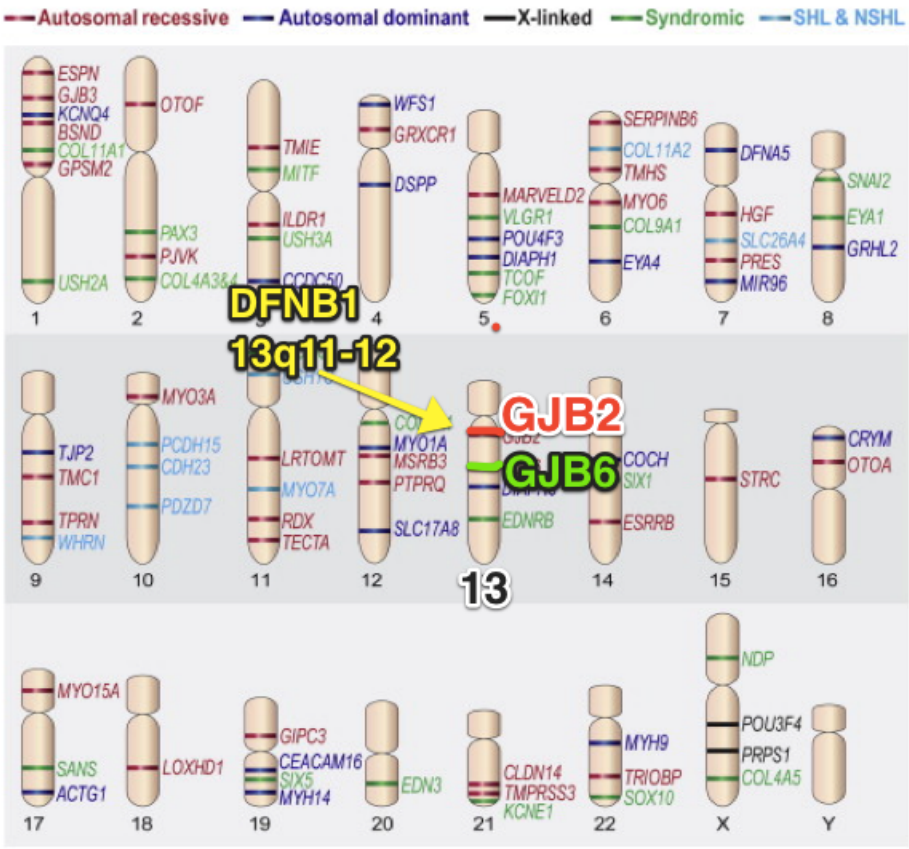
Гени, кодиращи конексин 26 и конексин 30

Установени са 21 гена в човешкия и 20 в мишия геном, кодиращи конексини. (4) Секвенирането на конексиновите гени започва през 1980 година, но повечето са секвенирани през последните няколко години. Установено е, че гените не могат да кодират директно експресията на gap junction каналите, а само експресията на конексините, образуващи тези канали.

Гените, кодиращи Cx26 и Cx30 са съответно GJB2 (gap junction protein, beta – 2) и GJB6 (gap junction protein, beta – 6). (8)

GJB2 е малък ген, локализиран на 13q11 и е с дължина 5.5 kb. Има два екзона, от които само екзон 2 съдържа кодиращи последователности. mRNK е с дължина 2.4 kb и се транслира в протеин с 226 аминокиселинни последователности. (9)

GJB6 се състои се от шест екзона. Екзон 6 съдържа кодираща информация и 3’ UTR. (10)



Фиг. 3 Разположение на GJB2 и GJB6 гените на дългото рамо на 13 хромозома, в локус DFNB1

В определен момент от развитието на човека в почти всички клетки на човешкото тяло се установява някоя от изоформите на конексините. Cx26 се установява в клетките на цялото тяло, но е най – застъпен в кохлеята, кожата, черния дроб и плацентата, докато Cx30 в кохлеята, мозъка, кожата, космените фоликули, нокътното ложе. Освен това конексините показват припокриващи се модели на експресия, като отделна клетка може да използва повече от една

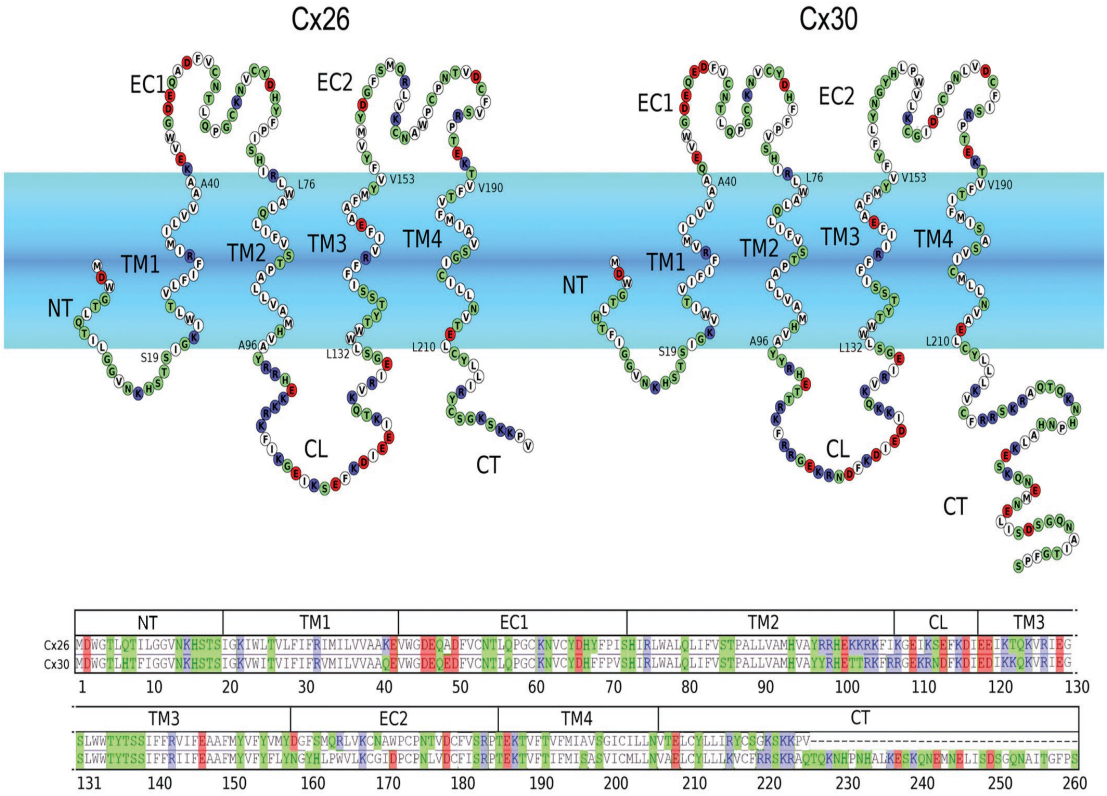
изоформа. Следователно коекспресията на много конексини в една клетка може да окаже влияние на образуването на конексоните и междуклетъчните канали и да обезпечи компенсаторни механизми при загуба на една от изоформите. (11)

Human		Mouse	
Protein name	Gene name	Protein name	Gene name
CX43	*GJA1*	Cx43	*Gja1*
CX46	*GJA3*	Cx46	*Gja3*
CX37	*GJA4*	Cx37	*Gja4*
CX40	*GJA5*	Cx40	*Gja5*
--------	--------	Cx33	*Gja6*
CX50	*GJA8*	Cx50	*Gja8*
CX59	*GJA9 (GJA10)*	--------	--------
CX62	*GJA10*	Cx57	*Gja10*
CX32	*GJB1*	Cx32	*Gjb1*
CX26	*GJB2*	Cx26	*Gjb2*
CX31	*GJB3*	Cx31	*Gjb3*
CX30.3	*GJB4*	Cx30.3	*Gjb4*
CX31.1	*GJB5*	Cx31.1	*Gjb5*
CX30	*GJB6*	Cx30	*Gjb6*
CX25	*GJB7*	--------	--------
CX45	*GJC1* (*GJA7*)	Cx45	*Gjc1*
CX47	*GJC2* (*GJA12*)	Cx47	*Gjc2*
CX30.2/CX31.3	*GJC3* (*GJE1*)	Cx29	*Gjc3*
CX36	*GJD2* (*GJA9*)	Cx36	*Gjd2*
CX31.9	*GJD3* (*GJC1*)	Cx30.2	*Gjd3*
CX40.1	*GJD4*	Cx39	*Gjd4*
CX23	*GJE1*	Cx23	*Gje1*

фиг. 4 Семейство на конексините при хората и мишките (11)

Строеж и структура на конексините

Конексините при човека са група от 21 трансмембранни протеини. Изградени са от девет главни домена: два края, съответно C – край (COOH) и N – край (NH2), една цитоплазмена (CL) и две екстрацитоплазмени примки (EL1) и (EL2), четири трансмембранни домена (TM1, TM2, TM3, TM4). (7) Всеки конексин притежава по три дисулфидни мостове между двете екстрацелуларни примки. Това е съществено при формирането на междуклетъчни канали. (12)



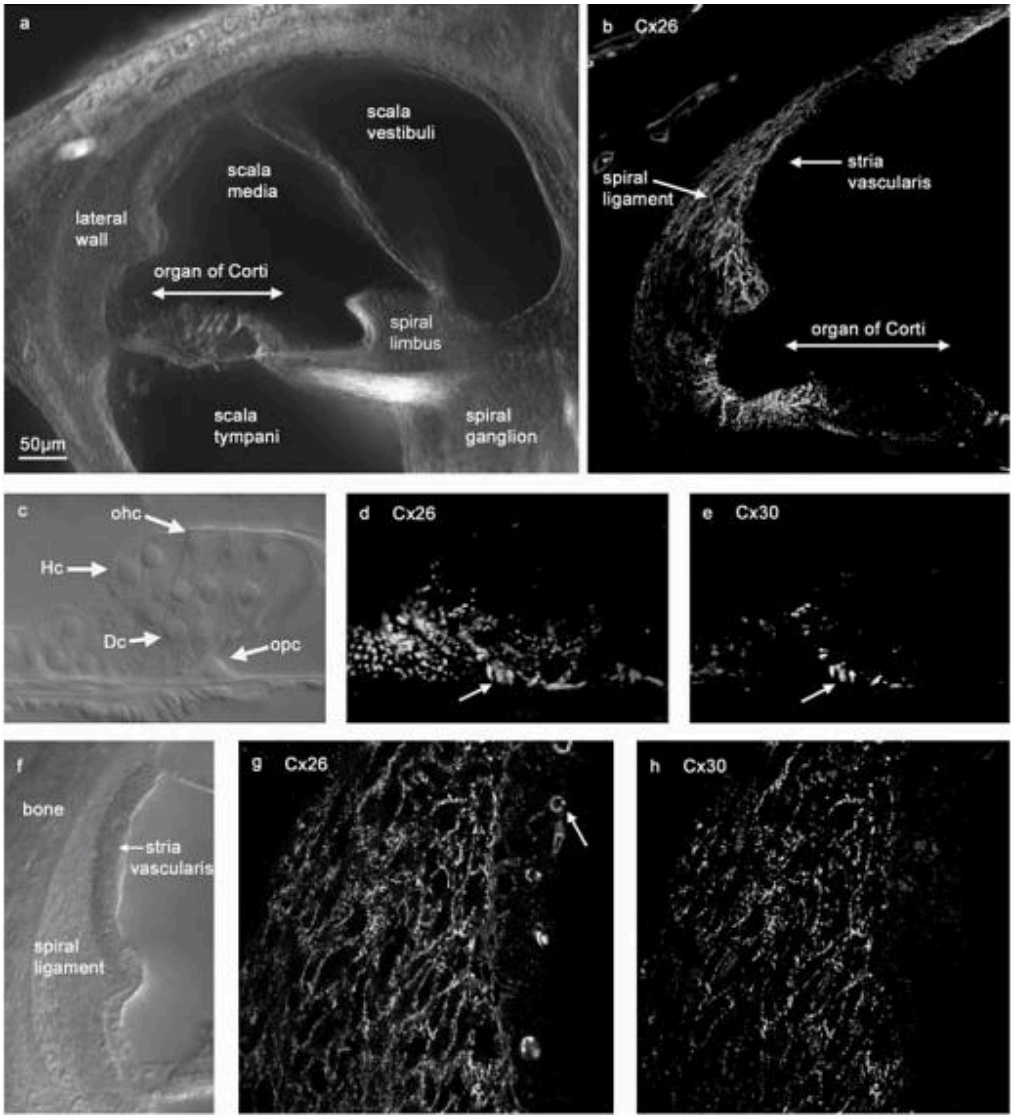
фиг. 5 Топология и подреждане на аминокиселинните и нуклеотидните последователности на човешки Cx26 и Cx30. NT – амино – край; CT – карбокси – край; TM1-TM4 – трансмембранни домени; EC1и EC2 – екстрацелуларни примки, свързващи съответно TM1 с TM2 и TM3 с TM4; CL – цитоплазмена примка, свързваща TM2 и TM3. (13)

Първите 100 аминокиселинни последователности, разположени в N – края, EL1, TM1, TM2, и началото на C – края са строго консервативни за всички конексини. (14) Cx26 и Cx30 показват голяма степен на сходство (около 77%) в аминокиселинните си последователности в сравнение с останалите конексини. (13) Цитоплазмената примка и C – края, за разлика от останалите домени, са различни при различните конексини и варират по отношение на дължината и вида на аминокиселинните последователности. Това позволява функционнални различия сред различните типове конексини и конексони. (7) Така например C – края на Cx26 съдържа 18 последователности и е един от двата най – къси конексини.

Конексините са с молекулна маса между 23 – 64 kDa и имат средна дължина от около 380 аминокиселини. Cx26 и Cx30 са едни от най – късите, изградени съответно от 226 и от 261 аминокиселини. Числото след съкращението конексин (Cx) отразява именно молекулната им маса.

Разпределение на конексините в кохлеята

Изучаването на разпределението на конексините във вътрешното ухо при човека се основава на множество животински модели, най – вече при гризачи. При тях са доказани Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 и Cx43. (15-19) Те са разпределени в епителните клетки и в съединителната тъкан на кохлеята, образувайки gap junction мрежи, но не в сензорния епител. (20) С помощта на антитела са доказани Cx26 и Cx30 в тези региони (21) и се установява равномерно разпределение на тези конексини в gap junction плаките.



фиг. 6 Експресия на Cx26 и Cx30 в кохлея на плъх. (a) Напречен срез на кохлеята на нивото на средната витка. (b) Cx26 в епителните клетки и съединителната тъкан на латералната страна на кохлеята. (c) Детайли от вътрешните ресничести клетки (ohc), клетките на Deiters (Dc, непосредствено стоящи до вътрешните ресничести кетки) и клетките на Hensen (Hc, разпложени латерално). Cx26 (d) и Cx30 (e) коекспресия в поддържащите клетки. Със стрелки са отбелязани големи плакообразни струпвания от Cx26 и Cx30 в основата на клетките на Deiters. (f) Съединителната тъкан на латералната стена, генерираща ендокохлеарния потенциал. Коекспресия на Cx26 (g) и Cx30 (h) във фиброцитите на ligamentum spirale и в по-малка степен в stria vascularis. Cx26 е открит самостоятелно в ендотелните клетки на кръвоносните съдове на stria vascularis. (посочен е със стрелка на снимка g) (4)

Според различни проучвания в зряла кохлея при бозайниците са доказани следните четири конексинови изоформи – Cx26, Cx30, Cx31, Cx43, като Cx26 и Cx30 са най – застъпени. (22) Според Ito

обаче, в съвсем скорошна публикация от 2014 година, се установява и Cx29. Увредата им е асоциирана със синдромна или несиндромна слухова загуба при хората. Предходни изследвания доказват, че Cx26 и Cx30 са диференцирано разпределени сред несензорните клетки в органа на Corti, което предполага определена роля на всеки подтип конексин. Cx31 е установен само в limbus spiralis, фиброцитите на ligamentum spirale и супрастриалната зона, в слуховия нерв. Cx29 се експресира в Швановите клетки на нервните влакна на невроните от ganglion spirale. Cx43 е ограничен във вътрешния слой на костната капсула на кохлеята. (23)

Във ветибуларната система са доказани Cx26, Cx30 и Cx43. (24)

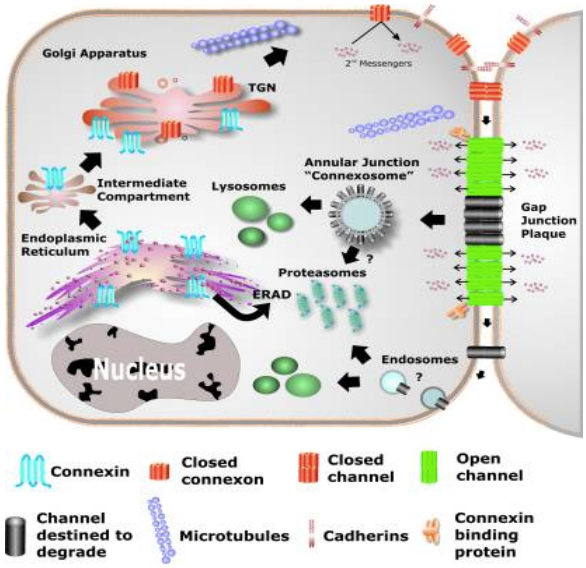
Увредата на Cx26 в органа на Corti не се отразява на нормалното развитие и клетъчната диференциация на тъканите в кохлеята. (25)

Cx26 и Cx30 се срещат в gap junction каналите, свързващи различните клетки в кохлеята. Интересно е да се отбележи, че gap junction комуникации не са установени между сетивните и заобикалящите ги поддържажи клетки. (26) Има две независими системи от клетки в кохлеята, които се свързват помежду си с gap junction канали. Първата – епителна клетъчна gap junction система – е основно съставена от поддържащите клетки в органа на Corti, от интерденталните клетки в limbus spiralis, основните клетки в ligamentum spirale. Втората система, gap junction системата на клетките на съединителната тъкан, включваща стриалните интермедиерни и базални клетки, фиброцитите в ligamentum spirale, мезенхимните клетки, покриващи костната капсула към scala vestibuli, мезенхимните тъмни клетки в супралимбалната зона и фиброцитите в limbus spiralis. Една от функциите на тези gap

junction системи е рециркулацията на K^+ от сетивните клетки към стриалните маргинални клетки. (27) Функционалната значимост на тези gap junction мрежи при човека се определя от факта, че мутации в гените кодиращи тези конексини (GJB2 и GJB6) водят до слухова увреда, но в същото време ролята им кохлеята е слабо изучена. (26)

Синтез и матурация на Cx26 и Cx30

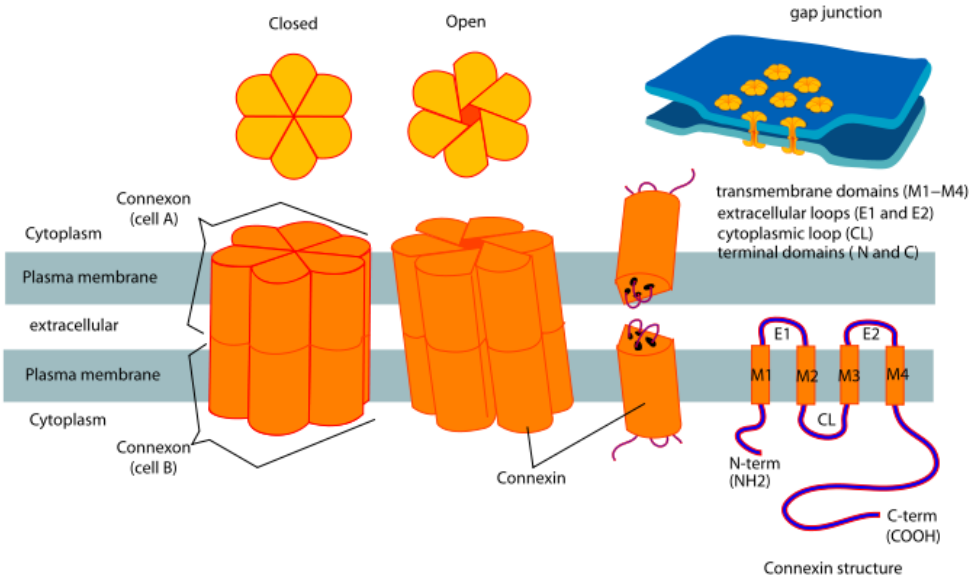
Конексините имат къс полуживот от около няколко часа. (28)



фиг. 7 Жизнен цикъл на конексините (28) (пояснения в текста)

Cx26 и Cx30 се транслират в полипептидни последователности от рибозомите, прикрепени към ендоплазматичния ретикулум (ЕР). Предполага се, че олигомеризацията на конексините в конексони се осъществява последователно при транспортирането им през ЕР и завършва в trans – края на апарата на Golgi. (28) Изключение от това прави Cx26, който може едновременно или след транслацията да се транспортира в ЕР (29), а дори и директно в цитоплазмената мембрана (30), без да минава през апарата на Golgi (31). Шест конексина формират полуканал с централна пора от 2 – 4 nm – конексон. Последните могат да са изградени от идентични субединици конексин – хомомерни или от различни конексини –

хетеромерни. Хетеромерни конексони Cx26/Cx30 са открити в кохлеята (32), Cx26/Cx32 са открити в черния дроб.



фиг. 8 Структура на конексин, конексон и gap junction

Тъй като много клетки експресират множество конексинови изоформи, възможността за хетеромерни полуканали или конексони е от голямо значение за повишаване броя от потенциалните комбинации на 21 вида конексини.

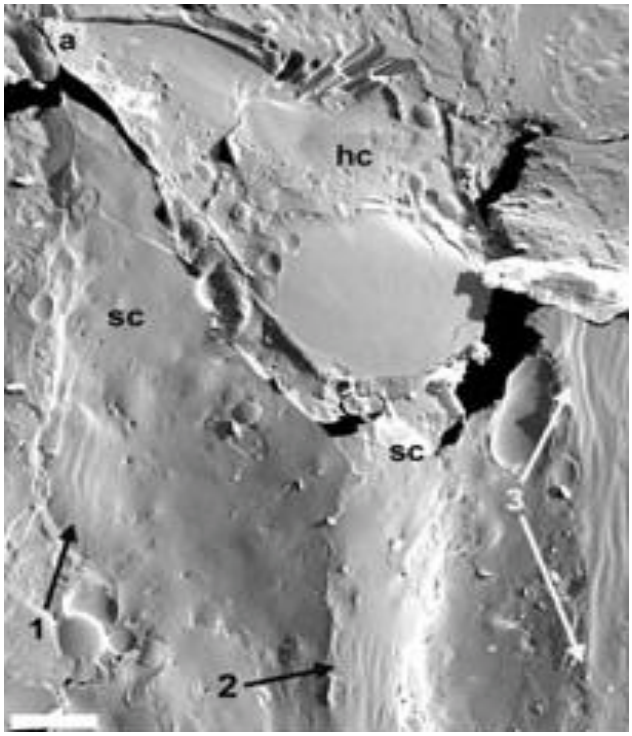
Cx	26	30	30.3	31	31.1	32	33	37	40	43	45	46	50
50	+					+			–	–		+	+
46	+					+			–	+		+	
45	–		–	–	–	–		+	+	+	+		
43	–	–	+	–	–	–	–	+	–	+			
40	–		+	–	–	–		+	+				
37	–		+	–	–	–	–	+					
33						–	–						
32	+	+	–	–	–	+							
31.1	–		–		–								
31	–			+									
30.3	–	–	+										
30	+	+											
26	+												

фиг. 9 Възможности за хетеротипно свързване на конексините (4)

Конексините в хомоложните класове (α и β) се свързват по – често помежду си, отколкото между различните класове. (4)

Каналите, формирани от хетеромерни конексони имат различни свойства от тези на хомомерните канали на съответните конексини. Така свойствата на тези хетеромерни канали могат да бъдат манипулирани чрез регулиране на съотношението на съставните конексини. По този начин се създава възможност за регулация на пропускливостта и проводимостта на gap junction. (7) Според Maeda екстрацелуларните примки EL1 и EL2 посредничат за свързването на хемиканалите чрез плътна "спойка", разделяйки вътрешността на канала от заобикалящата среда. (12)

След приключване на конексиновата олигомеризация, готовите затворени конексони се пакетират във везикули (между ЕР и trans – края на апарата на Golgi) и се доставят до цитоплазмената мембрана. Този транспорт за Cx26 и Cx30 (20) е независим от микротубули. Конексоните по повърхността на две съседни клетки взаимодействат чрез екстрацелуларните си примки, формирайки междуклетъчни канали – gap junction. (7) Те са многобройни и често заемат повече от 25% от плазмената мембрана на поддържащите клетки. Понякога се образуват повече от 100 000 gap junction канали. (24) Формирането на каналите се осъществява от няколко секунди до няколко минути, което предполага съществуването на конексоните в цитоплазмената мембрана. (33) При съединяването на два идентични конексона се получават хомотипни, а при съединяване на различни конексона – хетеротипни канали. Няколко стотици gap junction канали се обединяват в макромолекулен комплекс, наречен gap junction плака.

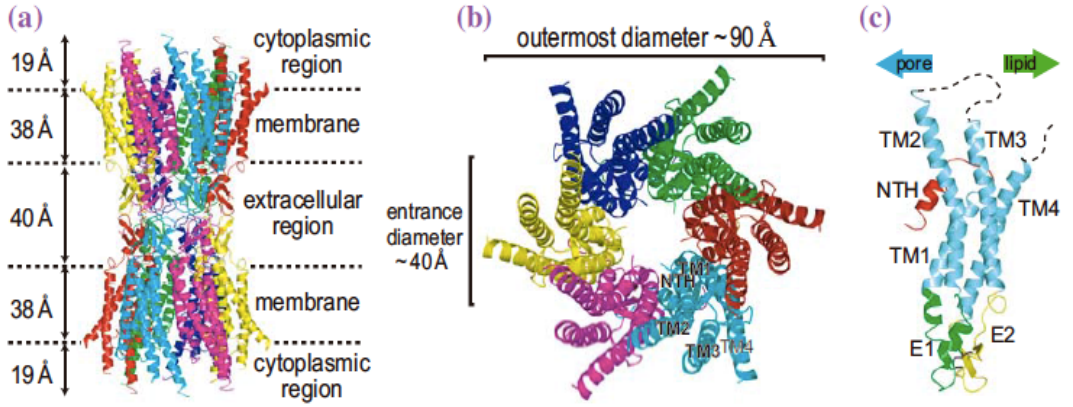


фиг. 10 Gap junction канали в сензорния епител на вътрешно ухо на пиле. (hc-слухови клетки, sc-подържащи клетки) Три големи gap junction плаки са означени със стрелките 1, 2 и 3. (4)

Новосинтезираните конексони се разполагат по периферията на тези плаки, а "остарелите" в центъра им. (34)

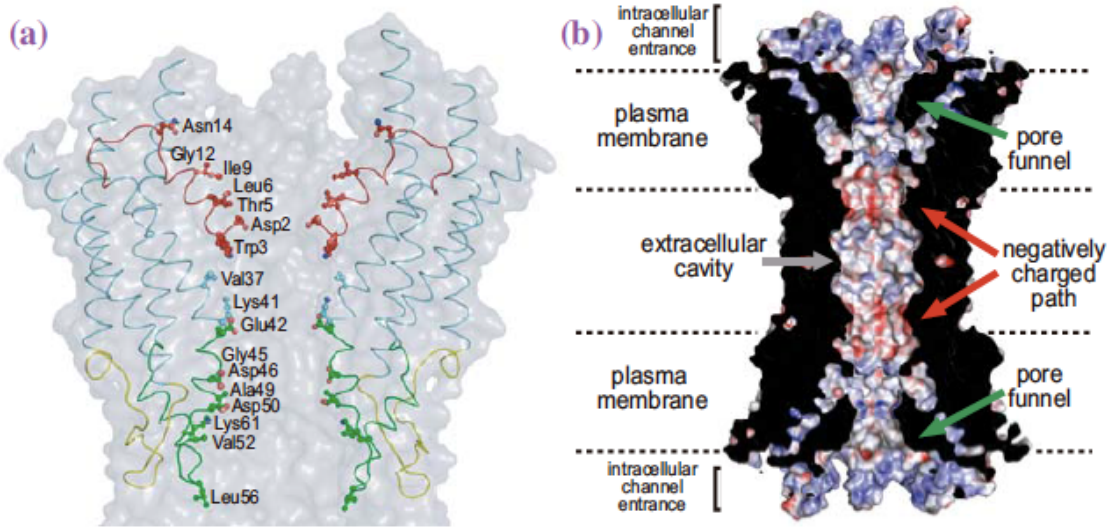
Терминът gap junction или цепковиден контакт е използван още през 1969 година. (35) Изградени са от конексини и представляват една от трите форми на междуклетъчни контакти при гръбначните животни заедно с плътните контакти (thigt junction) и адхерентните връзки (anchoring junction). При безгръбначните gap junction канали се образуват от трансмембранни протеини, наречени инексини.

През 2009 година Maeda и сътрудници публикуват кристалната структура на gap junction каналите, изградени от Cx26 в 3.5 – Å модел. Те описват четвъртичната структура на канала, чиято дължина без примките е 155 Å и с външен максимален диаметър 92 Å. (12)



фиг. 11 (a)Цялостна структура на човешки Cx26 gap junction канал (страничен изглед) (b)Изглед отгоре (c)Структура на Cx26 мономер (12)

Cx26 gap junction каналът е съставен от интрацелуларен канален вход (канална пора), отрицателно зареден трансмембранен участък и екстрацелуларна кухина. (12)



фиг. 12 (a)Архитектура на пората на Cx26 gap junction канал. (b)Разпределение на повърхностния потенциал по вътрешната повърхност на Cx26 gap junction канал (12)

Интрацелуларният канален вход е съставен от цитоплазмената част на TM2 и TM3. Положително заредените остатъци са концентрирани тук и създават положително заредена микросреда около каналната пора. Каналният вход се образува от шестте N – края и стеснява диаметъра на канала, като по този начин определя рестрикцията в молекулния размер на преминаващите субстрати.

Водородните връзки поддържат канала отворен. Отрицателно зареденият участък е на границата TM1/EL1, където каналът отново се стеснява. Екстрацелуларната кухина се формира от дванадесетте части на EL1 на всяка субединица, образуващи плътната вътрешна стена на канала в екстрацелуларния участък.(12)

Всеки полуканал съдържа 24 α – спирали кореспондиращи с четирите трансмембранни домена на шесте протеинови субединици. Външният диаметър на хемиканала е около 70Å в интрацелуларната част и около 50Å в извънклетъчната.

От централните фрагменти на gap junction – плаките започва деградацията на двойно мембранната структура във везикуларни структури, наречени annular junctions (пръстеновидни връзки). Larid ги нарича още connexosome. (28) Това става чрез ендоцитоза към една от двете клетки, където се поемат от лизозомите или протеозомите. Процесът протича за около 1 – 5 часа. (36)

Роля на gap junction каналите във вътрешното ухо за слуховата функция

Gap junction каналите са пропускливи за йони (K^+ и Ca^{2+}) и малки молекули, като вторични посредници (cAMP, cGMP, ATP, IP_3 и др.) или различни метаболити (захари, аминокиселини, глутатион и др.). (37)

В началото gap junction каналите са се описвали като неспецифични пасивни пори, свободно осигуряващи пасажа на всички йони и метаболити по – малки от 1.2 kDa. (38) Скорошни проучвания в тази област обаче, подчертават избирателната им пропускливост (полупроницаемост) демонстрирайки, че каналите формирани от различни конексини са уникални по отношение на тяхната проводимост и пропускливост на специфични молекули.

Освен това асоциацията на определени болести към специфични конексини също подчертава уникалността на всеки протеин, тъй като загубата на една изоформа не може да се компенсира от наличието на други конексини в една и съща тъкан или клетъчен вид и води до патофизиологични дефекти. (11)

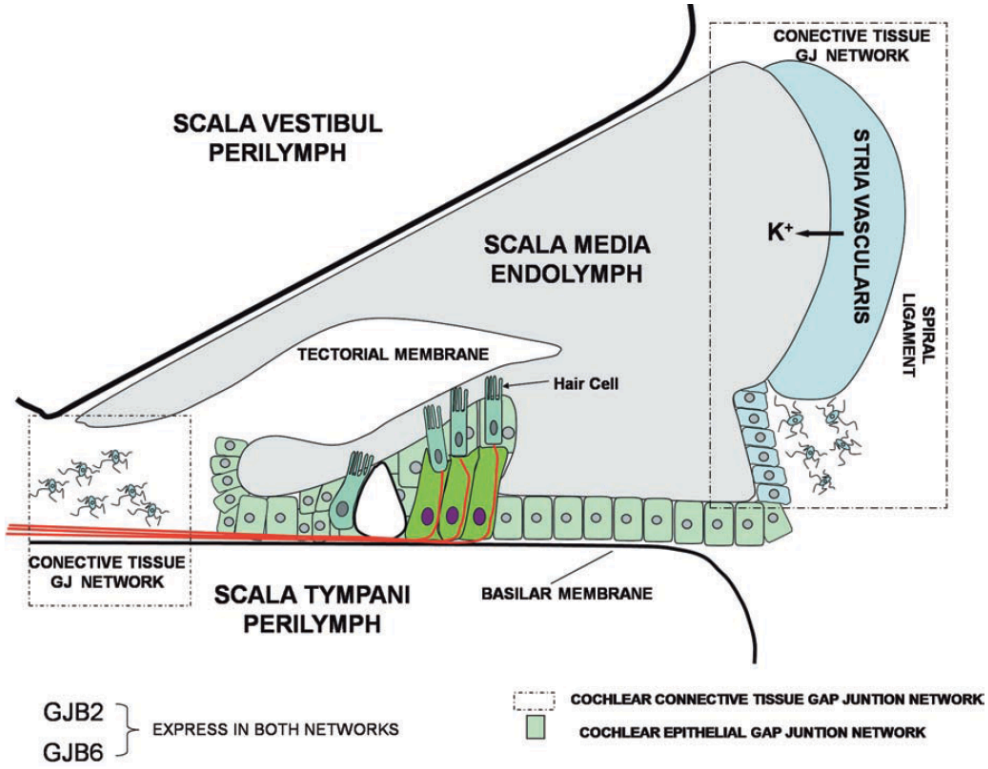
В много тъкани Cx26 често се експресира с други конексинови изоформи. Така се получават хетеротипни канали, съдържащи хомотипни или хетеротипни конексони с Cx30. Слуховата увреда, причинена от недостатъчност на Cx30 при мишките, се преодолява чрез свръхекспресия на Cx26. Това наблюдение демонстрира, че Cx26 може да компенсира недостига на Cx30. Обратно, когато Cx26 липсва в Cx26 – null mice модел, свръхекспресията на Cx30 не може да спре развитието на тежка слухова загуба. Следователно Cx26 играе ключова роля в развитието на слуховия сензорен епител и неговите уникални функции за развитието на нормалния слух не могат да бъдат заменени от Cx30. (36)

Функциониращите канали са основно в отворено състояние, но могат да се затворят при промяна на йонното съдържание в цитозола на клетката.

Gap junction каналите играят роля в слуховъзприятието като предизвикват повече от 50% от наследствената невросензорна слухова загуба, резултат от мутации в гените, кодиращи Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 и Cx43. Те са разпределени в епителните клетки и в съединителната тъкан на кохлеята, образувайки gap junction мрежи, но не и в сензорния епител. (20) Сетивните клетки на кохлеята са изложени чрез ресничките на ендолимфата, която е с висока K^+ концентрация (около 150 mmol/L), докато техните тела са заобиколени от перилимфата, която има йонно съдържание, подобно на екстрацелуларната течност. При звукова стимулация K^+ навлиза в

ресничестите клетки, поради големия електрохимичен градиент, причиняваш деполяризацията на клетките. Този етап е от съществено значение за слуховъзприятието. След това K^+ излиза от ресничестите клетки в перилимфата, където се поема от околните епителни и подържащи клетки и се транспортира до латералната стена на кохлеята чрез епителната gap junction мрежа. По – нататък K^+ се поема от фиброцитите на ligamentum spirale и през съединително – тъканната gap junction мрежа се транспортира в stria vascularis и най – накрая се секретира обратно в ендолимфата. Нарушението на тази рециркулация води до кохлеарна дисфункция и слухова увреда. Важно е да се отбележи, че някои конексинови мутанти причиняващи глухота образуват канали, които провеждат йоните подобно на дивия тип (WT). Това предполага, че междулкетъчният транспорт на други съединения (като IP_3), също може да бъде важен за нормалната слухова функция. (20)

Предполага се, че K^+ циркулация преминава през две независими мрежи на латералната стена: епителна gap junction мрежа (включваща епителните и поддържащите клетки на membrana basilaris) и gap junction мрежата на съединителната тъкан (фиброцитите на ligamentum spirale и епителните клетки на stria vascularis). (37)



фиг. 13 Диаграма на кохлеарна клетъчна система, демонстрираща gap junction мрежите. Клетките на Deiters (ярко зелено), поддържащите и епителните клетки (светло зелено) образуват епителната gap junction мрежа. Фиброцитите (със звездовидна форма) и клетките на stria vascularis (светло синьо) изграждат gap junction мрежата на съединителната тъкан. Клетките от двете мрежи експресират Cx26 и Cx30. Предполага се, че рециркулацията на K^+ обратно в ендолимфата се осъществява през тези мрежи. (37)

Смята се, че тези две мрежи медиират K^+ циркулация от перилимфата към ендолимфата. Загубата на Cx30 в кохлеята у мишки води до значителна загуба на ендокохлеарен потенциал, генериран от stria vascularis, но без промяна в K^+ концентрация и обема на ендолимфата. Мутацията V84L в Cx26 V84L не засяга йонната проводимост, но селективно засяга пропускливостта на IP_3 и води до наследствена глухота. (37)

Биофизични характеристики на кохлеарните gap junction

Свойствата на кохлеарните gap junction са били установени използвайки комбинация от in vivo и ex vivo препарати. Хомотипните Cx26 и хомотипните Cx30 канали са изучени в

клетъчни култури чрез използване на double clamp patch техника. Имайки предвид голямата хомоложност в последователностите на Cx26 и Cx30, свойствата на тези типове канали са изненадващо различни, особено по отношение на проводимостта. (4)

Хетеромерните канали, съставени от Cx26 и Cx30 ще имат различни физиологични свойства, от тези изградени само от Cx26 или само от Cx30 във вътрешното ухо. (39) Имунохистохимично е доказано, че отделни gap junction плаки във вътрешното ухо съдържат и двата конексина Cx26 и Cx30, разпределящи се равномерно от двете страни. (40) Освен това е установено, че при мишките дефицита на Cx30 (41) и увреждането на Cx26 във вътрешното ухо (25) водят до тежко засягане на слуховата функция. Това предполага, че във вътрешното ухо тези два конексина не се допълват взаимно. Въпреки, че в кохлеята са открити и Cx31 (42) и Cx43(43), Cx26 и Cx30 са по-широко застъпени и заедно присъстват в региони, където нито един от другите два конексина не са индентифицирани. По този начин другите конексини не са в състояние да компенсират дефекти в Cx26 и Cx30.

Молекулна селективност на кохлеарните gap junction канали

Молекулната селективност на кохлеарните gap junction канали е също толкова важна, както техните електрофизиологични свойства. Това подкрепя доказателството, че междуклетъчният обмен на вторични посредници като IP_3 и Ca^{2+} регулира кохлеарната физиология. Всъщност увреденият трансфер на Ca^{2+}, мобилизиращ IP_3 се предполага, че води до автозомно – рецесивна слухова загуба, дължаща се на мутация на Cx26. Gap junction каналите в кохлеята, особено съдържащите Cx30, често показват предпочитания за транспорт на положително заредни субстрати пред отрицатено

заредените. Те са и относително рестриктивни за движението на молекули с висока молекулна маса.

В съответствие с клиничния фенотип на конексиновите мутации при човека, при knock out модели на Cx26 и Cx30 от вътрешното ухо на мишки води до тежко увреждане на слуха с ранно начало и без доловими увреди на вестибуларната функция.

Функционалните анализи на пет вида мутации на Cx26 асоциирани с автозомно – рецесивна несиндромна слухова загуба от Mese и сътрудници доказват, че три от мутациите водят до невъзможност за формиране на функционални канали, а при другите две волтажните свойства на формираните канали се различават от тези на дивия тип Cx26. Така Mese предполага, че глухотата свързана с увреда на Cx26 се причинява не само от намаляване на калиевата рециркулация във вътрешното ухо, но и от абнормната обмяна на други метаболити през кохлеарните gap junction канали. (44)

Мутацията c.35deG е рецесивна и глухотата е единствената фенотипна изява. Хомозиготните за c.35delG се очаква да произвеждат Cx30 нормално, но нямат Cx26 във вътрешното ухо. Смята се, че това е недостатъка на хетеромерните канали, което води до нарушена слухова функция, когато е налице мутацията. (45)

Несиндромна слухова загуба

Около 1/1000 новородени деца в САЩ се раждат с глухота, а други 2 – 3/1000 новородени с различна степен на слухова увреда. Повече от половината от тези случаи се дължат на генетични фактори, а повечето генетични слухови увреди (около 70 – 80%) са несиндромни. При възрастните слухът намалява с възрастта. Така в САЩ всеки десети човек е с увреден слух. В България няма единен

регистър на пациентите със слухова загуба, както и информация за разпределението й по нозологични единици.

Множество генетични и фактори на околната среда предизвикват слухова увреда, но повече от 50% от прелингвалната глухота в развитите страни се дължи на генетични фактори. Това налага ранна молекулярна диагностика и генетична консултация.



Фиг. 14 Причини за слухова загуба

Приблизително около 70% от прелингвалната генетична слухова загуба е несиндромна (nonsyndromic hearing loss – NSHL) Нарича се така, тъй като слуховата увреда е изолирано оплакване, без да се диагностицират други увреждания в организма – хетерохромия на ириса, бял кичур коса, бъбречни проблеми и др. (46)

Генните локуси за несиндромната слухова загуба са означени с DFN (от английски DeaFNess – глухота). В зависимост от модела на унаследяване се отбелязват съответно с DFNA (автозомно – доминантни) 20 – 25%, DFNB (автозомно – рецесивни) 75 – 80%, DFNX (свързани с X – хромозомата) 1 – 1.5% и са номерирани в реда, в който са открити – например DFNB1, DFNB2 и т. н.

Митохондриалната несиндромна слухова загуба е <1% и се дължи на промени в митохондриалната ДНК. Предава се от майката и няма специфично обозначение.

Установено е, че повече от 100 локуса са ангажирани с увреда на слуха. Въпреки огромната генетична хетерогенност, мутациите в локус DFNB1, съдържащ гените GJB2 и GJB6, е основната причина (в над 50 – 60%) за автозомно – рецесвина несиндромна слухова загуба. (46)

Автозомно – рецесивните локуси предизвикват по – скоро тежка слухова загуба, докато автозомно – доминантните водят до по – леко, постлингвално и прогресивно засягане на слуха.

Повечето форми на несиндромна слухова загуба са асоциирани с увреда на структурите на вътрешното ухо – невросензорна загуба на слуха. Слухова загуба, дължаща се на увреда на външното и/или средното ухо се означава като звукопроводна. Някои форми на несидромна слухова загуба, специално DFN3 се асоциира с промени едновременно в средното и вътрешното ухо. Този тип слухова увреда се означава като комбинирана.

Тежестта на слуховата увреда може да се промени с течение на времето. Може да засегне едното (унилатерална) или и двете уши (билатерална) и да варира от лека степен до пълна глухота. Слуховата загуба може да е стабилна, с флуктуации или да прогресира с годините. Освен това може да засегне ниските, средните или високите честоти. Несиндромната слухова увреда може да се прояви във всяка възраст. В зависимост от развитието на говора тя бива прелингвална и постлингвална. (46)

С годините генетичното изследване на GJB2 се превръща в стандарт за пациентите с несиндромна слухова загуба с неясна етиология, поради високата честота на мутации в този ген.

Исторически данни за наследствената несиндромна слухова загуба

Първи сведения за наследственост на слуховата увреда се откриват още от 16 век. Godstein през 1933 година докладва, че Johannes Schenck (1531 – 1598) е първият автор, установил че някои форми на слуховата увреда са наследствени. Той описва семейства, в които няколко деца са родени глухи. През 1985 година Stephens представя родословното дърво на испанско семейсво от 16 век с глухи членове в над три от поколенията. (47) През 1621 година Paolus Zacchias препоръчва на глухи хора да се въздържат от създаване на поколения поради доказателства, че техните деца също ще са глухи. Това показва увереността му, че наследствеността е важна при глухотата. (48)

През 1990 година Reardon описва как Sir William Wilde (1815 – 1876) установява значимостта на близкородствените бракове за глухотата и представя различни модели на унаследяване. (49) През 1881 година Hartmann потвърждава тези заключения на базата на своите обширни проучвания в училища за глухи в Германия. През 1976 година Konigsmark и Gorlin, както и Faser провеждат сравнителни проучвания върху наследствените слухови увреди и подчертават изразената й хетерогенност.

Съвременни аспекти на несиндомната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30

В последното десетилетие на XX век, с развитието на генетиката и молекулярната биология, се провежат многобройни

изследвания на различните слухови увреди и се установява огромен напредък в разбирането на наследствената несиндромна слухова загуба.

През 1994 година Guilford и сътрудници изследват две близкородствени тунизийски семейства с рецесивна форма на несиндромна слухова загуба. Пациентите са били с прелингвална глухота с пълна пенетрантност. Авторите за пръв път представят свързващ анализ, използвайки полиморфни микросателитни маркери и описват връзката на D13S115 и D13S143 на 13q11 с рецесивната несинромна невросензорна глухота. Открит е първият локус (DFNB1) свързан с рецесивната слухова загуба. (50) Този перицентромерен регион на дългото рамо на 13 хромозома е отговорен и за автозомно – рецесивната мускулна дистрофия. (51)

През 1995 година Maw и сътрудници установяват връзката на D13S175, D13S143 и D13S115 с 13 хромозома, изследвайки 19 семейства от келтски произход. Откритието предполага, че локусът DFNB1 може да е отговорен за автозомно – рецесивната невросензорна глухота при Кавказката популация. (52)

В проучване на 48 италиански и испански семейства с автозомно – рецесивна несиндромна слухова загуба, се установява важността на локуса DFNB1 за средиземноморските народи, а авторите го локализират между D13S175 и D13S115. (53)

За първи път през 1997 година Kelsell и колектив проучват деца с глухота и описват мутации в гена, кодиращ Cx26. Тези мутации водят до преждевременен стоп кодон и са установени и при три деца с автозомно – рецесивна глухота. Свързани са с хромозома 13q11 – 12 (локус DFNB1), където е локализиран GJB2. Имунохистохимично Kellsel доказва високо ниво на Cx26 в човешка кохлея. За пъви път е установен генът, кодидащ Cx26, като причина

за несиндромната слухова загуба и се доказава голямата роля на Cx26 за слуховъзприятието. (54)

През 1997 година Zelante и сътрудници анализират PCR продукти от ДНК на пациенти с несиндромна слухова загуба и откриват две мутации и четири полиморфизми в гена, кодиращ Cx26. Делецията на един гуанин в поредицата от шест гуанина между 30 и 35 позиция на cDNA в ген GJB2 (означена като мутация c.35delG) се открива в 34 от 54 пациенти от Италия (63%). Тя води до изместване рамката на четене и до терминация на транслацията до тринадесета аминокиселина. Другата открита от авторския колектив мутация е c.167delT. Представлява делеция на тиамин на 167 позиция в кодиращата последователност на GJB2 и води до стоп кодон на 81 аминокиселинна позиция в генния продукт. (55) Това са и първите открити мутации при човека, предизвикващи несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26.

Впоследствие, анализирайки реузлтатите от различни проучвания се установява, че описаната от Zelante и колектив мутация c.35delG е най – често срещаната в GJB2 за Кавказката популация (бялата раса), особено за Средиземноморския регион. (45, 56-58)

Мутацията c.167delC е била доказана при пациенти с еврейски произход (56, 59), а c.235delC е най – често срещана сред Азиатската популация – японци (60, 61), а в последствие при китайци (62) и тайванци (63).

Повече от половината от пациентите с автозомно – рецесивна прелингвална несиндромна слухова загуба в различните популации имат мутации в гена, кодиращ Cx26 и локализиран в локус DFNB1 13q12. Впоследствие, различни проучвания установяват, че 10–42% от пациентите с мутации в GJB2 имат само един мутантен алел (57,

58, 64), а за някои семейни случаи има доказателства за връзка с локус DFNB1, но липса на мутации в GJB2. Това навежда на мисълта, че друг близък до GJB2 ген може би е отговорен за това.

Изследвайки 33 пациента с несиндромна прелингвална глухота и само един мутантен GJB2 алел, Del Castillo и сътрудници идентифицират през 2002 година делеция от 324 kb del(GJB6-D13S1830) в GJB6 гена, кодиращ протеина Cx30. Било установено, че Cx30 се експресира в същите структури на вътрешното ухо както и Cx26, като двата конексина са функционално свързани. Установената делеция се разполага дистално от гена GJB2, който остава интактен. Мястото на делецията е било изолирано и секвенирано и са разработени специфични диагностични тестове за тази мутация. 22 – ма от общо 33 изследвани пациенти са били комплексни хетерозиготни за GJB2 (c.35delG) и с делеция в GJB6. Или делецията в GJB6 гена е втората по честота мутация, водеща до прелингвална глухота в Испанската популация. Така през 2002 година Del Castillo и сътрудници доказват, че локусът DFNB1 е комплексен и съдържа два гена – GJB2 и GJB6, и може да доведе до моногенно или дигенно унаследяване на прелингвалната глухота. Мутации в два от общо четирите алели на тези гени водят до слухова увреда. (65)

В последващи проучвания е доказано, че del(GJB6-D13S1830) е с дължина 309kb и е често срещана в Испания, Франция, Великобритания, Израел и Бразилия (5.9 – 9.7% от всички DFNB1 алели) и е рядко срещана в САЩ, Белгия и Австралия (1.3 – 4.5% от всички DFNB1 алели). (66) Делецията не е открита при пациенти от Австрия (67), Турция (68) и Китай (62).

Seeman идентифицира del(GJB6-D13S1830) при 1 от 13 чешки пациенти с прелингвална слухова загуба, носители само на един

мутантен алел в GJB2. Той заключва, че del(GJB6-D13S1830) е много рядка за Централна Европа за разлика от Испания, Италия и Израел. (69)

През 2005 година Del Castillo и сътрудници откриват при 12 от 47 хетерозиготни за GJB2 испанци нова делеция в Cx30 – del(GJB6-D13S1854). Тя е с дължина от 232kb. Пациентите са били с лека до дълбока слухова загуба. Делецията del(GJB6-D13S1854) се среща при 22.2% от хетерозиготните носители на GJB2, при които не е открита del(GJB6-D13S1830) във Великобритания, 6.3% в Бразилия и 1.9% в Северна Италия. (66)

Мултицентрово проучване, проведено от Del Castillo и сътрудници, установява значителна разлика в честотата на двете делции в GJB6. Делецията del(GJB6-D13S1830) се установява в много популации по света и е по – честа от del(GJB6-D13S1845), която се доказва само в някои страни. Двата мутантни алела са често срещани в Испания и Великобритания, съответно по 10.6% и 9.8% сред мутантните DFNB1 алели. Във Франция del(GJB6-D13S1830) е често срещана, докато del(GJB6-D13S1854) не е установена до момента на това проучване. В Белгия del(GJB6-D13S1830) не е честа, а del(GJB6-D13S1854) също не е установена до момента на изследването. Ситуацията в Италия е малко изненадваща, защото del(GJB6-D13S1830) е често срещана в северните райони и много рядка в южните. Тези различия между съседните държави и дори между регионите на една и съща държава, илюстрират комплексността на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30. (66)

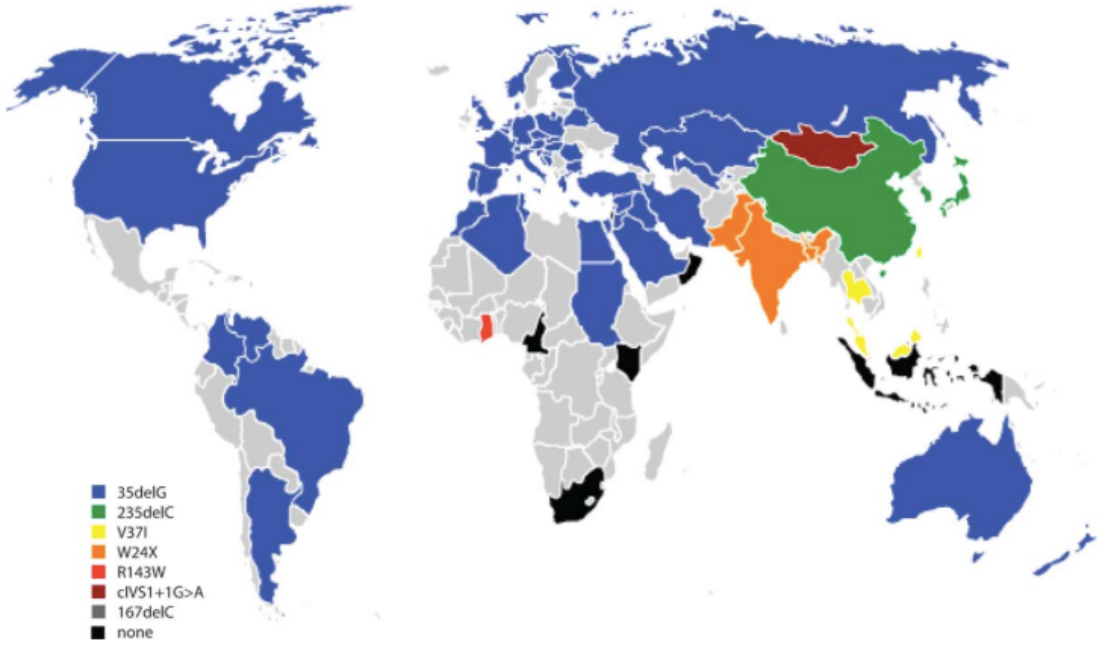
Делецията del(GJB6-D13S1830) не е установена и от Najmabadi и сътрудници при изследване на 664 семейства от Иран. (70)

GJB6 генът, кодиращ Cx30 е уникален, тъй като се намира на около 50kb от GJB2. Делецията del(GJB6-D13S1830) оставя кориращия регион на GJB2 интактен, но изтрива голям регион близо до GJB2 и разкъсва GJB6. Тази делеция е често срещана при комплексните хетерозиготи с Cx26 мутации и свързаната с това слухова загуба се предполага, че е причинена или от изтриването на предполагаем GJB2 регулаторен елемент или от дигенно унаследяване. (65) Чистото дигенно унаследяване изглежда малко вероятно, тъй като комплексни хетерозиготи с GJB2 мутации не са установени при други GJB6 мутации.

GJB2 и GJB6 са два съседни гена, кодиращи съответно gap junction протеините Cx26 и Cx30, коекспресиращи се в кохлеята. И двата гена са свързани с най – честата моногенна слухова увреда – изолираната рецесивна слухова загуба с локус DFNB1. Въпреки, че има много доказателства за прякото участие на Cx26 в кохлеарната функция, приносът на Cx30 е неясен, тъй като делецията на Cx30 силно потиска Cx26 и при човека и при миши модели.

Епидемиологични данни за несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30

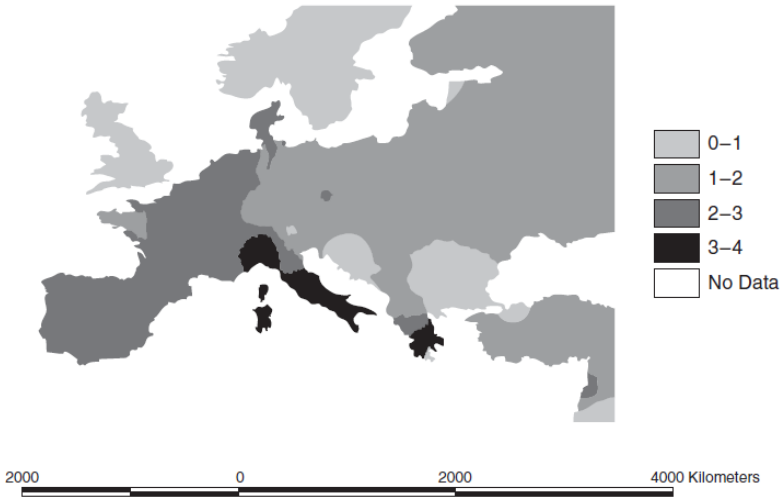
Много слухови увреди, причинени от мутации в гените на Cx26 и Cx30, са докладвани до момента. (71) Някои от тях са много чести, а други значително рядко срещащи се. Спектърът от мутации значително се различава сред популациите и се определя от етническата принадлежност.



Фиг. 15 Разпределение на най – честите GJB2 мутации в световен мащаб. Страните, в които не са установени биалелни GJB2 мутации асоциирани със слухова загуба, са отбелязани в черно. Страните, за които няма налична информация, са отбелязани в сиво. (72)

Най – честата за бялата раса мутация в GJB2 е c.35delG и е с честота на носителство 2 – 4%. (55, 73, 74). По данни на Chan от 2014 година тя се среща обичайно в Европа, Близкия Изток, Северна Африка и Южна Америка. (72)

c.235delC е най – често срещана при японците (носителство 1 – 2%) (75, 76) и китайците (62), c.167delT при Ешкеназните Евреи (честота на носителство 7.5%) (59), p.V37I в Тайван (77) и p.R143W в Гана.



Фиг. 16 Разпределение на честотата на носителство на 35delG в Европа (78)

По данни на Lucotte в Европа и Средния Изток средната честота на носителство на c.35delG е 1.9%, като най – висока е в Южна Европа 1/31 индивида или 3.26%. Авторите смятат, че тази мутация е възникнала в древна Гърция и след това се е разпространила и в други Средиземноморски страни, особено в Италия. (78)

Въпреки тази вариабилност, общата честота на GJB2 мутациите е значително висока в повечето популации, което прави генетичният анализ на този ген клинично полезен и широко достъпен.

Делециите, засягащи Cx30 са чести за някои популации (79), но в други много редки.(80)

Генотип – фенотип корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30

Видът мутации има определящо значение за клиничните аспекти на несиндромната слухова загуба. Според Ogurchi фенотиповете, дължащи се на nonsense мутации в GJB2 гена, са по – тежки от тези, причинени от missense мутации. (81) Nonsense мутация е точкова мутация в нуклеотидната последователност на

ДНК, водеща до преждевременен стоп кодон или nonsense кодон в транскрибираната мРНК и прекъснат, непълен или нефункционален протеин (truncating protein). Такава е например мутацята p.W24X. Докато missense мутация е точкова мутация, при която един нуклеотид е замен с друг, което води до кодон, кодиращ различна аминокиселина. Missense мутации са p.R127H, p.Leu90Pro и др.

Frameshift мутациите, водещи до изместване на рамката на четене, също водят до по – тежка клинична изява. Такава е мутацията c.35delG.

Наличието на една missense мутация в комплексните хетерозиготи води до по – леко засягане на слуховата функция в сравнение с биалелните и дигенните GJB2 и GJB6 мутации. (82)

Според Marlin няма разлика в тежестта на слухова увреда между хомозиготните за GJB2 и пациентите с делеции в GJB6. (79) Feldman установява в свое проучване, че тези генотипове са свързани по – често с дълбока слухова загуба. (83) Stinckens докладва дори, че няма значителна разлика в слуховата увреда между хомозиготните пациенти за c.35delG и комплексните хетерозиготи за c.35delG и делеции в GJB6. (84)

Според Snoeckx del(GJB6-D13S1830) е асоциирана със значително по – тежка слухова загуба от хомозиготните c.35delG. (21)

При хората комплексните хетерозиготи с del(GJB6-D13S1830) и хетерозиготни за GJB2 имат тежка към дълбока слухова загуба.

Резултати от скорошно проучване от 2013 година на Boulay и сътрудници показва, че координираната експресия на Cx26 и Cx30 зависи от големината на заобикалящия ги на хромозомата регион. В Cx30 knock out миши модели, но с наполовина запазена експресия на Cx26, се установява нормален слух. По този начин при глухи

пациенти с делеция в Cx30, както и в предишни Cx30 knock out миши модели, дефектната експресия на Cx26 е най – вероятната причина за глухотата и в противоречие със сегашното мнение се доказва, че Cx30 не е задължителен елемент за кохлеарната функция. (85)

Клинично протичане и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30

Клиничното протичане на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30 е доста вариабилно. Тежестта на слуховата увреда при хора с биалелни GJB2 мутации според различните проучвания варира от лека до дълбока и най – често е без прогресия. Най – често фенотипната вариабилност се свързва с непознати модифициращи гени или фактори на околната среда. (86, 87) (88)

Редица предходни проучвания са се опитали да направят генотип – фенотип корелации, но само някои асоциации са установени. Причината за това е големият брой генотипове и малкият брой засегнати индивиди в повечето изследвания.

Denoyelle и колектив проучват 140 деца от 104 семейства с различна степен на невросензорна загуба на слуха. Мутации в Cx26 са били установени при 43 деца (49%) от 88 семейства с прелингвална глухота в сравнение с нито еднин случай от 16 семейства с постлингвални форми на глухота. Според него несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 варира от лека до дълбока. Тя е асоциирана с полегата, за сметка на високите честоти или плоска аудиометрична крива и нормален образ на вътрешното ухо от образните изследвания. При 11 от 16 случая

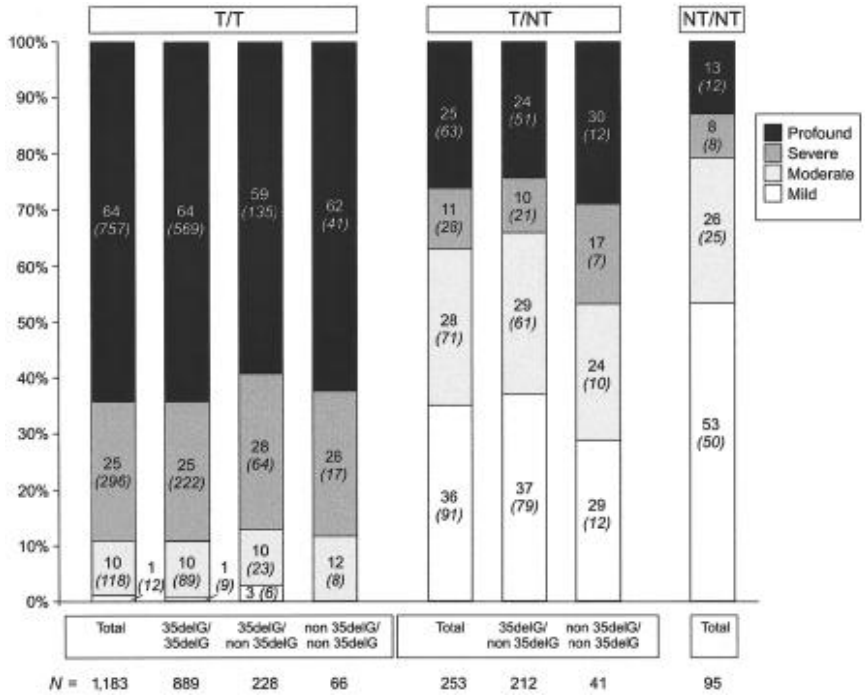
слуховата увреда е непрогресивна, като са налице вариации в тежестта на слуховата загуба между отделните роднини. Denoyelle обаче предполага, че тежестта на слуховата загуба в DFNB1 е извънредно вариабилна и непредсказуема, дори сред членовете на едно семейство. (87)

Вариабилността в нивото на слухова увреда се доказва и при изследването на бразилско семейство с три деца. И при трите слуховата загуба е резултат от увреда на Cx26 – c.35delG/c.35delG. Две от тях са с дълбока слухова загуба датираща от раждането. Третото дете е с лека слухова увреда, с прогресивен характер и начало в детството. (89)

Cryns и сътрудници установяват, че хомозиготните носители на c.35delG имат по – тежко увреждане на слуха от c.35delG/non – c.35delG комплексни хетерозиготи, а хората с non – c.35delG/non – c.35delG имат дори още по – леко намаление на слуха. Те наблюдавали подобно ниво на слухова увреда при категоризирането на мутациите на инактивиращи (стоп мутации, водещи до образуване на стоп кодон и frameshift, водещи до изместване на рамката на четене) и неинактивиращи (missense муатции, водещи до замяна на една аминокиселина с друга в протеина). Авторският колектив демонстрира, че някои комбинации на мутации (включително комбинацията от c.35delG с missense мутации p.L90P, p.V37I или splice – site мутация c.IVS1+1G>A, както и генотип p.V37I/p.V37I) са асоциирани със значително по – лека увреда на слуха в сравнение с c.35delG хомозиготните генотипове. Това ретроспективно изследване, обхващащо 277 пациенти с намаление на слуха, дължащо се на биалелни GJB2 мутации от Белгия, Испания и САЩ, се оказва най – големият за времето си систематичен анализ

показващ, че GJB2 генотипът има съществено влияние върху степентта на слухова загуба. (90)

На следващата година Snoeckx и съавтори правят мащабно проучване на GJB2 генотиповете и аудиометричните данни на 1531 пациенти от 16 различни държави с несиндромна автозомно – рецесивна, лека до дълбока слухова загуба. Доказани са 83 различни мутации, като 47 са били класифицирани като nontruncating (NT) и 36 като truncating (T). Резултатите за тежестта на слуховата загуба са близки до тези на Cryns. Установени са 153 генотипа, като степентта на слухова загуба, асоциирана с биалелна truncating мутация е била значително по – тежка от степентта на слухова загуба от биалелна nontruncating мутация ($p<0.0001$). 84 – 92% от пациентите в гупата T/T имат тежка към дълбока слухова увреда, в групата T/NT те са по – малко 34 – 47%, а в NT/NT повече от 53% имат лека слухова загуба.



Фиг. 17 Резултати от проучването на Snoeckx. (Обяснения в текста) (88)

В същото проучване Snoeckx установява, че мутациите p.M34T, p.V37I и p.L90P са асоциирани с лека до умерена слухова увреда (медиана 26 – 40dB). Освен това авторите забелязали, че два генотипа имали значително по – тежка слухова увреда от тази на хомозиготните за c.35delG – c.35delG/p.R143W и c.35delG/del(GJB6-D13S1830). (88)

Hilgert също отбелязва, че слуховата загуба дължаща се на c.35delG, показва значителна фенотина вариабилност от лека до дълбока. (91)

По данни на Maheshwari и Mani най – честата мутация в GJB2, водеща до несиндромна слухова загуба сред индийците е p.W24X. (92, 93)

p.W24X се установява в 79% от всички DFNB1 алели при изследване на испански роми с автозомно – рецесивна несиндромна слухова загуба. Носителството на този алел при андалуските роми е 4%. Данните от проучванията на Minarik (94) и Seeman (95) еднозначно показват, че мутацията p.W24X се среща с голяма честота сред ромската популация.

В проучване на Marlin хомозиготните на p.W24X са с дълбока слухова загуба, но мутацията е рядко срещана (1/256). (79)

Dahl и сътрудници идентифицират хомозиготната мутация p.V37I в GJB2 гена при 4 (8.3%) от 48 австралийски деца с лека или умерена невросензорна загуба на слуха. И четирите деца са с азиатски произход, с двустранна вискочестотна невросензорна слухова загуба, като три имат и нискочестотна слухова загуба. Две други деца, хетерозиготни за p.V37I, имат лека към умерена високочестотна слухова увреда и умерена нискочестотна слухова загуба. Авторите доказват, че алелът p.V37I води до по – леко засягане на слуха. (96)

Iossa и сътрудници докладват за италианско семейство, в което незасегната майка и един от двата й глухи сина са хетерозиготни носители на две GJB2 мутации в cis: доминантна p.R75Q и рецесивна c.35delG, въпреки че другият глух син не е носител на нито една от тези мутации. Резултатите предполагат, че рецесивната мутация анулира ефекта на доминантната мутация, причинявайки разкъсване на протеина преди да се достигне 75 аминокиселинна последователност. Iossa смята, че глухотата при двамата сина се дължи на друга генетична причина и подчертава важността на генетичната консултация. (8, 97)

При изследване на 255 французи със слухова загуба Feldman установява, че 32% имат биалелни GJB2 мутации, а 6% са комплексни хетерозиготи за GJB2 и del(GJB6-D13S1830). Децата с дълбока слухова загуба са или биалелни носители на мутации за GJB2 или комплексни хетерозиготи GJB2/GJB6. (83)

Snoeckx в свое изследване констатирал, че del(GJB6-D13S1830) е една от двете мутации, асоциирана със значително по – тежка слухова загуба от хомозиготните c.35delG (другата е c.35delG/p.R143W). Установено било, че 33 комплексни хетерозиготни пациенти с c.35delG/del(GJB6-D13S1830) са с най – тежко засягане на слуховата функция (медиана от тоналната прагова аудиометрия 108dB). Хипотезата за регулаторен елемент може да обясни това, докато делецията на този регулаторен елемент би премахнала и GJB2 експресията и инактивирала единия от двата GJB6 алела. Ако Cx30 частично замества функцията на Cx26 във вътрешното ухо, както се предполага (21), тази замяна ще е по – малко ефективна и ще резултира в по – тежка слухова увреда. (88)
При хората комплексните хетерозиготи с del(GJB6-D13S1830) и хетерозиготни за GJB2 имат тежка към дълбока слухова загуба.

Влияние на други фактори върху клиничната изява на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26

Abe и съавтори през 2001 година изследват 23 японски семейства с 1555A – G мутации в митохондриалната 12S rRNA, при които засегнатите индивиди имат слухова увреда с късно начало и прогресиращ характер. От тези семейства осем са с GJB2 мутации (4 са с frameshift, 2 са с nonsense и 2 са с missense). Честотата на GJB2 мутациите е била статистически по – висока в сравнение с общата популация. Авторите предполагат, че GJB2 мутациите могат да бъдат понякога аграваращ фактор при аминогликозидна експозиция и фенотипната изява на несиндромната слухова увреда асоциирана с 1555A – G митохондриална мутация. (8, 75)

От 149 деца с вродена цитомегаловирусна инфекция Ross и сътрудници наблюдават сигнификантно висока честота на GJB2 мутациите сред 19 деца с увреден слух, в сравнение с останалите 130 с CMV инфекция и нормален слух (21% срещу 3%), а също и сравнени с 380 неинфектирани с CMV новородени (3.9%). Всички установени мутации са били в хетерозиготно състояние. Авторите предполагат, че GJB2 мутациите могат да увеличат риска от слухова увреда при деца с вродена CMV инфекция. (8, 98)

Генотипът може да определи тежестта на слуховата загуба, но обкръжаващата ни среда и други генетични фактори също модулират тежестта и еволюцията на Cx26 и Cx30 свързаната несиндромна слухова увреда.

Състояние на проблема в България

В България генетични изследвания при пациенти с неустановеяна етиология на суховата загуба се правят само спорадично. За първи път през 2009 – 2010 година под

ръководството на проф. Д. Попова се провежда генетично изследване на 51 деца с несидромна слухова загуба и 8 техни родственици с нормален слух. Болните са изследвани за мутации в гена GJB2, кодиращ Cx26. При 39% (20/51) е доказана мутацията c.35delG е в хомозиготно състояние, а при 15% (9/51) в хетерозиготно. Открита е и мутацията p.Ile121Asn. (99) Установени са някои зависимости, но по – малкият брой пациенти не води до статистически значими корелации. Няма данни за клиничното протичане. Ето защо разширяване на извадката и изследването и на други гени водещи до слухови увреди, би представило по – пълна характеристика на генетичната несиндромна слухова загуба за България.

Класификации на степента на слухова загуба

В България се използва следната класификация на слуховите увреди.

Табл. 1 Степени на слуховата увреда според Българската класификация

Степен на слухова загуба	*Слухов праг в децибели (dB)*
Социално адекватен слух	0-30 dB
Тежко чуване	30-60 dB
Практическа глухота	60-90 dB
Глухота	>90 dB

Многобройните генетични варианти и голямата фенотипна хетерогенност на наследствената слухова загуба затрудняват корелационния анализ. Използването на различни класификации на слуховите увреждания, както и липсата на дефиниции на сравняваните показатели, водят до значително разминаване при съпоставяне на получените резултати, представени в докладите.

Табл. 2 Степени на слуховата увреда според:
1) Clark, J. G. (1981); American Speech – Language – Hearing Association (ASHA guidelines); Canadian Academy of Audiology; Joint Committee on Infant Hearing 2007
2) European Group on genetics of hearing impairment. Martini A (Ed.), European Commission Directorate, Biomedical and Health Research Programme (HEAR) Infoletter 2, November 1996, 8
3) http://www.who.int/pbd/deafness/hearing_impairment_grades/en/

	Слухов праг в децибели (dB)		
Степен на слухова загуба	***ASHA*** [1]	***EU*** [2]	***WHO*** [3]
Normal	– 10 – 15 dB	< 20 dB	<25 dB
Slight/незначителна	16 – 25 dB		26 – 40 dB
Mild/лека	26 – 40 dB	21 – 40 dB	
Moderate/умерена	41 – 55 dB	41 – 70 dB	41 – 60 dB
Moderately severe/ умерена към тежка	56 – 70 dB		
Severe/тежка	71 – 90 dB	71 – 94 dB	61 – 80 dB
Profound/дълбока	>91 dB	>95 dB	>81 dB

Ето защо, за да се избегне това несъответствие, през 1996 година е създадена European Working Group on genetic hearing impairments с цел стандартизиране на терминологията и създаване на протоколи за събиране на семейства с генетични слухови увреди за европейски базирани епидемиологични, клинични и генетични анализи. (100)

❖ Видове слухова загуба:

- Невросензорна – свързана с увреда на вътрешното ухо/слуховия нерв с разлика между костната и въздушната проводимост <15dB осреднена за 0.5, 1, и 2kHz.
- Звукопроводна – свързана със заболявания на външното или средното ухо. Тоналната прагова аудиометрия (ТПА) е с нормална костна проводимост (<20dB) и разлика между минималните праговете на костната и

въздушната проводимост >15dB осреднена за 0.5, 1, и 2 kHz.

- Смесена – свързана с комбинирано увреждане на външното/средното ухо и вътрешното ухо/слуховия нерв. От ТПА >20 dB намаление на прага на костната проводимост едновременно с >15dB разлика между костната и въздушната проводимост осреднена за 0.5, 1 и 2 kHz.
- Сензорна – подвид на невросензорната слухова загуба, свързана с увреда в кохлеята.
- Неврална – подвид на невросензорната слухова загуба, свързана с увреда в слуховия нерв.
- Централна – невросензорна слухова загуба, свързана с увреда на централната нервна система.

❖ Тежест на слуховата увреда – изчислена на базата на средно аритметично за 0.5, 1, 2 и 4kHz на по – добре чуващото ухо

- Normal/Норма $\leq$ 20dB
- Mild/Лека 21 – 40dB HL
- Moderate/Умерена 41 – 70 dB HL
- Severe/Тежка 71 – 94 dB HL
- Profound/Дълбока $\geq$ 95dB

❖ Вид аудиометрична крива:

- Нискочестотна, възходяща (ascending): >15dB разлика между прага за ниските и високи честоти.
- Средночестотна, U – образна: >15dB разлика между най – лошите нива на слуховия праг в средните честоти и тези във високите и ниските честоти.

- Високочестотна:
  - ✓ Плавно спускаща се (gently sloping): 15 – 29dB разлика между средната стойност за 0.5 и 1kHz и средната за 4 и 8kHz
  - ✓ Бързо спускаща се (sharply sloping): >30dB разлика между посочените по – горе честоти
- Плоска (Flat): <15dB разлика между средната стойност на прага на слуха за 0.25, 0.5 kHz, средната стойност за 1 и 2kHz и средната стойност за 4 и 8kHz.

❖ Честотно разпределение на увреждането на слуха:

- Нискочестотно $\leq$ 0.5 kHz
- Средночестотно >0.5 kHz $\leq$ 2 kHz
- Високочестотно >2 kHz $\leq$ 8 kHz
- Разширено високочестотно > 8 kHz

❖ Симетрия на слуховата увреда

Асиметричност: разлика >10dB между прага на слуха на двете уши най – малко за две честоти. (Средната стойност за 0.5, 1 и 2kHz на по – добре чуващото ухо трябва да е >20dB).

❖ Прогресия на слуховта увреда

Прогресивно протичане: ако влошаването е >15dB на средната стойност за 0.5, 1 и 2kHz през последните 10 години. Резултатите при пациентие над 50 годишна възраст се интерпретират с повишено внимание, тъй като прогресията в тази група може да се дължи по – скоро на възрастово намаление на слуха, отколкото на генетични фактори.

❖ Едностранна слухова увреда

Едното ухо е със средна слухова загуба >20dB или слухов праг за една честота над 50dB, а другото ухо е със слухов праг $\leq$20dB.

- ❖ Предполагаема възраст на поява на слуховата увреда:
  - Вродено
  - От раждането до 10 годишна възраст
  - 11 – 30 годишна възраст
  - 31 – 50 годишна възраст
  - над 50 годишна възраст
- ❖ Шум в ушите – липса или наличие (описание на шума)
- ❖ Вестибуларни симптоми и функция – нормална/абнормна

Обединените усилия за стандартизиране на дефиниции и протоколи, както и колаборцията между генетици и клиницисти в последните години води до значителен прогрес в тази област.

Тези данни ще са полезни при разпределение на медицинските разходи за диагностика, обслужване и рехабилитация.

Неонатален и генетичен слухов скрининг

Въз основа на тези констатации, генетични тестове за мутации в GJB2 и GJB6 се препоръчват при пациенти с несиндромна слухова загуба, тъй като те са диагностичен инструмент и ще спомогнат за бъдеща терапевтична интервенция и генетична консултация. (22)

Установяването на наследствената глухота в първите месеци на новороденото се явява показание за най – ефективното до момента лечение в световен мащаб – кохлеарната имплантация. Оперативната интервенция в болшинството от случаите позволява усвояване на речеви навици и развитие на глухото дете като останалите деца. Бързината, високата чувствителност и специфичност на молекулно – генетичното изследване позволява в кратки срокове да се установи точната диагноза, дори и в неонаталния период. Ранната диагноза на слуховите увреди е залог за успешната рехабилитация, не само чрез кохлеарна имплантация,

но и с помощта на употребата на слухови апарати и сурдопедагогически корекции. (101)

Неонаталните слухови скринингови програми позволяват установяването на намалението на слуха още от раждането. Страните, въвели тези скринингови програми (Канада, някои щати в САЩ, определени страни от Европейския съюз, Русия, Беларус и други), съобщават за честота на вродената глухота около 1 – 1.5/1000 новородени.

У нас честотата на слуховите увреждания се движи в международно приетите граници. Така в България ежегодно се раждат около 65 глухи деца при раждаемост около 60 000 – 65 000 годишно (близо 8 % от децата са с рискови фактори за увреда на слуха). Националният център по здравна информация не разполага с данни относно честотата на слуховите увреждания в България и разпределението им по нозологични единици. Не е известен и броят на рехабилитираните деца, както и на децата със слухови увреждания, които посещават училищата, обучаващи деца без подобни увреждания. (102)

Молекулярното изследване позволява да се определи етиологията на увредения слух и риска от заболяване в семейството и родствениците. На определени места от Европейския съюз, в някои щати на САЩ, Китай и др. се правят опити едновременно с неонаталния слухов скриниг да се провежда и генетичен такъв. (103)

Генетичната консултация

Установяването на генетична несиндромна слухова увреда изисква генетична консултация. Последната осигурява информация на лицата и семействата им за характера, наследствеността, както и последствията от генетичните заболявания, с цел да им се помогне да направят информирани медицински и персонални решения.

Използвайки фамилната анамнеза и резултатите от генетичните изследвания се определя генетичния статус и генетичня риск за членовете на семейството. (104)

Риск за членовете на семейството при автозомно – рецесивно унаследяване

Автозомна – рецесивна DFNB1 слухова увреда е налице при индивиди, които са:

Хомозиготни или комплексни хетерозиготни за GJB2 мутации

Хомозиготни или комплексни хетерозиготни за GJB6 делеции, които включват част от GJB6

Родителите на пробанда (засегнатият пациент) са облигатни хетерозиготи и са носители на един патогенен мутантен алел. Те са асимптомни.

Братята и сестрите на пробанда имат 25% вероятност да са с увреден слух, 50% да са носители и 25% да са здрави.

Ако един пациент е с тежка към дълбока слухова загуба, неговите братя и сестри със същия GJB2 патогенен алел имат 91% вероятност да са с тежка към дълбока слухова загуба (severe to profound) и 9% вероятност да с лека към умерена (mild to moderate).

Ако един пациент е с лека към умерена слухова загуба (mild to moderate), неговите братя и сестри със същия GJB2 патогенен алел имат 66% вероятност да са с лека до умерена слухова загуба и 34% с тежка към дълбока.

Потомство на пробанда. Всички потомци са облигатни носители. (104)

Риск за членовете на семейството при дигенно унаследяване

Индивиди, които са хетерозиготни за GJB2 патогенен мутантен алел и имат една от двете GJB6 делеции-ΔGJB6-D13S1830 или ΔGJB6-

D13S1854 (те са комплексни хетерозиготи). Възможно е двете делеции да засягат регулаторния регион на GJB2.

Родителите на пробанда (засегнатият пациент) са облигатни хетерозиготи. Единият е носител на GJB2 мутантен алел, а другият е носител на една от двете GJB6 делеции ΔGJB6-D13S1830 или Δ GJB6-D13S1854. Хетерозиготните са асимптомни.

Братята и сестрите на пробанда имат 25% вероятност да са с увреден слух, 25% вероятност да са асимптомни носители на GJB2 мутантел алел, 25% вероятност да са асимптомни носители на една от двете GJB6 делеции ΔGJB6-D13S1830 или ΔGJB6-D13S1854 и 25% да за здрави и да не носят нито една мутация.

Потомство на пробанда всички потомци са носители на GJB2 мутация или на голяма делеция, включваща част от GJB6. (104)

Изясняването на клиничните аспекти на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30, както и ранната й детекция би помогнало за навременно лечение и социализиране на глухите пациенти.

ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Цел

Да се анализират клиничните аспекти на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30, на фона на резултатите от генетичното изследване за мутации в гените GJB2 и GJB6.

Задачи

1. Клиничен подбор на пациенти с несидромна слухова загуба с неустановена етиология с цел създаване на клинична база данни и разширяване на ДНК биобанката за генетични изследвания.

2. Да се установи разпространението и разпределението на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30, чрез генетичен анализ на GJB2 и GJB6. Определяне вида и честотата на мутациите за изследваната популация.

3. Да се направи корелационен анализ между клиничното протичане на несиндромната слухова загуба и установените мутации в гените, кодиращи конексин 26 и конексин 30.

4. Да се изгради пълна клинична характеристика и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30.

5. Да се установи дали при пациенти с несиндромна слухова загуба с неясна етиология изследването на гените GJB2 и GJB6, кодиращи съответно конексин 26 и 30, ще допринесе за уточняване на диагнозата и навременно лечение.

6. Да се оцени необходимостта от въвеждане на генетичен слухов скрининг в България.

Материали

Клиничен материал

В настоящето изследване са включени 146 пациенти с несиндромна слухова загуба, преминали през поликлиничните кабинети или УНГ клиниката на УМБАЛ «Царица Йоанна – ИСУЛ» от декември 2009 година до април 2014 година. (51 пациенти от предходното изследване в България през 2009/2010 и 95 новосъбрани пациенти).

След получаване на подробна информация за изследването, съгласилите се да се включат подписаха информирано съгласие. При децата под 18 години информираното съгласие беше подписано от родителите или юридическия настойник на детето. Информирано съгласие се изработваше за пациента и за Центъра по молекулна медицина към МУ – София, където се проведоха генетичните изследвания.

Събирането и съхранението на данните за болестта и фамилната обремененост е извършвано в съответствие с приетите норми за съхранение на лична информация и конфиденциалност. Документацията от изследването се съхранява в Клиниката по УНГ болести към УМБАЛ «Царица Йоанна – ИСУЛ» и Центъра по молекулна медицина – МУ София.

Критерии за включване на пациентите в изследването:

- Деца и възрастни, независимо възрастта, пола и етническата им принадлежност
- Двустранно звукоприемно намаление на слуха, незвисимо от степента и началото на слуховата увреда
- Нормално съпротивление в средно ухо
- Отсъствие на други сензорни дефекти

- Отсъствие на синдромна слухова загуба – слухова увреда съчетана с други аномалии в организма
- Пре-, пери- и постнатален период протекъл без отклонения, липса на черепно – мозъчни и остри звукови травми, излагане на силен шум, употреба на ототоксични медикаменти и др. (по анамнестични данни)

Биологичен материал

От всеки пациент беше взета венозна кръв, която по международни изисквания се транспортира в пластмасова епруветка (с обем от 3–10 ml), съдържаща K_3EDTA като антикогулант. Кръвта се взема от 30 мин. до 1 час след хранене и се съхранява при + 4^{o}C в продължение на максимум 48 часа.

Методи на изследванията

Клинични методи

Анамнеза

Анамнезата е снета от самите пациенти и/или от родителя или юридическия настойник при децата под 18 години. Получена е информация за началото на слуховата увреда и начина на протичане – прогресивно или не. Протичане на пре–, пери– и постнатален период – инфекции, жълтеница, асфиксия, недоносеност и др.; прекарани инфекциозни заболявания – CMV, менингит, грип и др.; лечение с ототоксични медикаменти – атибиотици, диуретици, салицилати др.; придружаващи заболявания, минали заболявания, рискови фактори и др. Подбрани са пациенти родени без усложнения, без перинатални инфекции. Никой от включените пациенти не е съобщил за черепно – мозъчна травма.

Снета е и подробна фамилна анамнеза. Получена е информация за родственици с проблемен слух и причини за увреждането му.

За нуждите на изследването и старателно систематизиране на клиничната база данни, беше изработена предварително анкетна карта за всички пациенти.

Общ клиничен и УНГ статус

На всички пациенти са изследвани общият и локалният УНГ статуси. От прегледа не са установени аномалии или други заболявания, водещи до намаление на слуха. Подбраните пациенти са без преаурикуларни цепки, кисти, фистули, телекант, ирисна хетерохромия, бял кичур коса, краниофациални аномалии, миопия, пигментна ретинопатия, гуша, бъбречни аномалии, атрезия на външния слухов проход, външен отит, среден гноен отит, серозен отит и др.

Подбраните пациенти са без отклонения в локалния УНГ статус.

Аудиологични методи

За определяне на аудиологичния профил на пациентите (нивото, вида, началото, протичането на слуховата увреда и др.) са използвани препоръките на European Working Group on genetic hearing impairments (2), описани подробно в литературния обзор.

Тонална прагова аудиометрия по костен и въздушен път (ТПА)

Направена е при всички възрастни пациенти. При децата се използва детска игрова аудиометрия.

При ТПА се измерват минималните слухови прагове по костен и въздушен път за чисти тонове. Резултатите показват нивото на минималното звуково налягане (dB SPL), предизвикващо минимално слухово усещане в честотния диапазон между 125 и 8000Hz. Международни стандарти определят минималното звуково налягане (SPL) за нормален слух. При значителна разлика в минималния праг на слуха на двете уши се налага заглушаване на по – добре чуващото ухо, поради възможност от латерализация.

Средната слухова загуба се установи чрез изчисляване средно аритметично от нивото на минималния праг на слуха по въздушен път за 0.5, 1, 2, 4 кHz. Взеха се предвид стойностите на по – добре чуващото ухо.

Използвани са аудиометри Siemens SD25, SD50.

В настоящето изложение получените резултати са изчислени и изложени спрямо Българската класификация на слухови увреди, тези на ASHA и СЗО, както и на Европейската работна група по генетични слухови увреди. За да се сравнят получените резултати с проучвания на чужди автори обаче, е използвана последната класификацията, поради поради естеството на проучването.

Табл. 3 Степени на слуховата увреда според European Group on genetics of hearing impairment. Martini A (Ed.), European Commission Directorate, Biomedical and Health Research Programme (HEAR) Infoletter 2, November 1996, 8

Степен на слухова загуба	***Слухов праг в децибели (dB)***
Normal	<20 dB
Mild/лека	21 – 40 dB
Moderate/умерена	41 – 70 dB
Severe/тежка	71 – 94 dB
Profound/дълбока	>95 dB

Тези данни са най – общи и могат да се използват като предварителна оценка на клиничното състояние на пациента.

Необходимо е тоналната прагова аудиометрия да бъде проследвана от допълнителни изследвания на слуховата функция. Това се налага поради големия процент на слухова невропатия (диссинхрония) – между 10 и 40 % при новооткритите форми на слухови увреди.

Тимпанометрия и акустична рефлексометрия

Акустичният имитанс е общ термин, описващ проводимостта (admittance) или съпротивата (impedance) след прилагане на звуково налягане върху дадена система. (105)

Импедансът на слуховия анализатор се определя не само от това на средното ухо, но значение имат и импедансът на външния слухов проход и на течностите и мембранозните структури във вътрешното ухо. Съпротивлението на външното ухо е минимално, а определянето на стойностите на вътрешното ухо е трудно. Поради тази причина реално се измерва само импедансът на средното ухо. В него са включени следните компоненти: тъпанчева мембрана, слухова верига, сухожилия и мускулни влакна, мембрани, обем на пневматизираните клетки на processus mastoideus и налягането в тях.

Автоматичният импедансметър измерва абсолютните стойности на импеданса, използвани за фина диагностика, без да са необходими големи акустични преизчисления. Звук с 226 Hz, достигнал до кухината на средното ухо, продуцира различни стойности SPL (sound pressure level) в зависимост от обема на кухината. Импедансът е най – нисък, когато звуковото налягане от двете страни на тъпанчевата мембрана е еднакво и провеждането е максимално. (105)

Динамичното измерване на тимпаналната проводимост е от голямо значение за патологията на средното ухо. В частност, реактивната компонента на проводимостта е чувствителна на

промени в тъпанчевата мембрана, осикуларната верига, съдържанието на средното ухо, функцията на Евстахиевата тръба. (106). Изискване за изследването е тъпанчевата мембрана да е със запазена цялост.

Чрез измерване съпротивлението в средното ухо се изключват различни заболявания в него и наличие на звукопроводна слухова загуба.

Отчитането на акустичния рефлекс, посредством акустичния мост, е обективно изследване на слуховата функция на нивото на кохлеята и ствола и реакциите на лицевия нерв. Като праг на акустичния рефлекс се определя най – ниската интензивност, предизвикваща контракция на m. stapedius. Акустичната стимулация на едното ухо предизвиква мускулни контракции и последващи импедансни промени и в двете уши. В ухо с нормална функция контракцията на мускулите се проявява след прилагане на чист тон с интензитет 65 – 95dB. (105)

Използвани са импедансметри Siemens SD30, Interacoustics AT 235h.

Отоакустични емисии

Въведени са като диагностичен тест в практиката през 1987 година от David Kemp. Използвани са транзиентни (случайни) евокирани отоакустични емисии (TEOAE). Те са отговор на външните слухови клетки в кохлеята. При това изследване могат да се определят интензитетните и честотни характеристики на външните слухови клетки. Външните слухови клетки са усилвателят на истинските (вътрешни) слухови клетки и определят тяхното физиологично състояние.

Отоакустичните емисии са индикатор на състоянието на външните слухови клетки. Наличието им при звукоприемно намаление на слуха е показател за наличие на слухова невропатия. По международни данни минимум 10 % от децата с вродена слухова загуба са с положителни TEOAE и следователно със слухова невропатия.

Слухови стволови евокирани потенциали (ССЕП)

Чрез звуково дразнене click се предизвикват електрофизиологични отговори, които отговарят за провеждането на сигнал през слуховия нерв и последващите слухови пътища. Осъществява се чрез използване на повърностни електроди и откриването на пето отвеждане е корелативно със слухова перцепция от 1500 – 4000 Hz. ССЕП не отразяват нивата на слуховата перцепция за честотите по – ниски от 1500 Hz.

Използвана е апаратура Interacustics EP15/EP25, ABR diagnostic systmes Corona.

Изследването със ССЕП е абсолютно необходимо и е от изключително голямо значение при интерпретацията и диагностиката на слуха на малки деца, както и такива с комбинирани увреждания. Основните предимства са:

- ✓ Отговорите са много стабилни, достоверни и притежават точна реакция при ниски интензитети на стимулация.
- ✓ Отговорите не зависят от активното участие на пациента, т. е. те са напълно обективни.
- ✓ Получените резултати определят прага на слуха по въздушен път.

За точната и пълна характеристика на състоянието на слуховия анализатор е необходимо да се приложат определен минимум от

тестове и в последствие те взаимно да се интерпретират. ССЕП са най – точният метод за определение на прага на слуха и позволяват да се слухопротезират деца под три годишна възраст и да се започне слухова рехабилитация.

Auditory Steady-State Response testing (ASSR)

Представлява електрофизиологично изследване на слуха. Повърностните електроди измерват фазовия слухов отговор при постоянен непрекъснат тонален сигнал. Стимулът е с усреднени нива на звуковото налягане, по-високи от използваните нива при ССЕП. При ASSR се определят очакваните нива на чуствителност.
С тези изследвания се постига точно и ясно определяне състоянието на слуха, както и очакваните резултати от последващо лечение. Така са открити и изключени функционални или неорганични слухови загуби, звукопроводно и комбинирано намаление на слуха.

Образни методи на изследване – компютърна томография

Използвана е за изключване на аномалии на вътрешното ухо като аплазия/хипоплазия и малформации като разширен вестибуларен акведукт. Компютърна томография е направена на пациенти, на които впоследствие е поставен кохлеарен имплант.

Генетични методи

За да се извърши генетичният анализ беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки.

Генетичните изследвания се осъществиха в Центъра по молекулна медицина към МУ – София. Първоначално пациентите бяха изследвани за мутации в GJB2, кодиращ Cx26. Хетерозиготните за GJB2 или без установени мутации в GJB2 бяха изследвани и за делеции в GJB6 гена, кодиращ Cx30.

Преданалитична обработка на биологичния материал:

Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв. Целта е да се получи високомолекулна ДНК с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини. Клетките и ядрата се разрушават с хипотонични буфери. Белтъците се обработват с протеинази в присъствието на ЕДТА и детергенти, а ДНК молекулите се екстрахират с органични разтворители, като фенол и хлороформ или се изсолват. Нова насока в методите за изолиране на високомолекулна ДНК е чрез автоматизирана магнититна сепарация, която беше използвана в това изследване. ДНК беше изолирана с помощта на Chemagen® magnetic separation station.

Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК. Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено чрез агарозна гел електрофореза, при използване на 0.8% агарозен гел и 1xTBE (трисборатен буфер).

Концентрацията на изолираната ДНК беше определена спектрофотометрично чрез апарат NANODROP.

Аналитична обработка:

Изследване за носителство на мутации в connexin 26

За намножаването на гена, кодиращ конексин 26 бяха използвани следните двойки праймери:

Cx 26 1F: TCTTTTCCAGAGCAAACCGCC

Cx 26 1R: TGAGCACGGGTTGCCTCATC

Cx 26 2F: CCAGGCTGCAAGAACGTGTG

Cx 26 2R: GACACGAAGATCAGCTGCAG

Изследването за носителство на мутации в Cx26 бе осъществено чрез използване на следните методи:

- Полимеразна верижна реакция (Polimerase Chain Reaction – PCR). Започва с първоначална продължителна денатурация,

която цели разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК. Амплифицирането на желания участък се осъществява при многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура, всеки от които включва следните три стъпки:

- ✓ Термична денатурация
- ✓ Хибридизация на праймерите и комплементарните им участъци
- ✓ Нарастване (елонгация) – синтез на нова, комплементарна на матричната ДНК верига

За PCR амплификацията се използва 1 µl от предварително приготвените 50 ng/µl разредки и двойка праймери (Cx 26 1F и Cx 26 1R), които позволяват амплификацията на цялата кодираща последователност на Cx26 гена, състоящ се от един кодиращ екзон.

Получените PCR продукти се използваха за матрици при секвенционната реакция.

- Хоризонтална агарозна електрофореза. Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза позволява ДНК–фрагментите да се разделят в зависимост от тяхната молекулна маса. Тази техника се използва за определяне на качеството и количеството на амплифицираните продукти.
- Директно секвениране. Секвенирането на PCR продуктите е референтен метод за директен ДНК анализ. При него определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на

определена нуклеотидна база. Получените PCR продукти се разделят чрез денатуриращa полиакриламидна електрофореза и се визуализират.

Етапи на директното секвениране:

- ✓ Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR. PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните маркери.
- ✓ Пречистване на продукта с ExoSAP. Целта е премахване на dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по – нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – Екзонуклеаза I и алкална фосфатаза.

  Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди.

  Сместта се инкубира с програма ExoSAP на PCR апарат, при следните условия: 30 минути на 37ºC и 15 минути на 80ºC за инактивиране на двата ензима. Пречистените проби могат да се съхраняват на -80 ºC или -20 ºC.
- ✓ Секвенционна реакция. Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1 (Appilied Biosystems) включва ДНК – полимераза, небелязани нуклеотиди и флуресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация и се провежда при следните температурни условия:

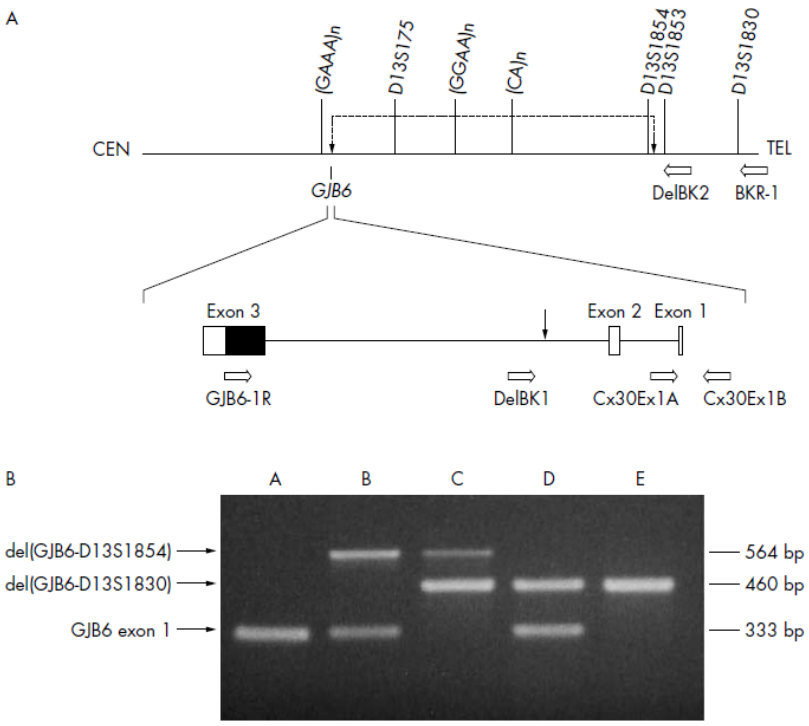
95°C – 3 мин.
95°C – 20 сек.
55°C – 20 сек.
72°C – 3 мин.
72°C – 3 мин.

} 25 цикъла

- ✓ Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя 3M натриев ацетат, 125mM ЕДТА и 95% етанол. Така приготвените проби остават да се инкубират за 15 минути. След това се прави допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол. Така приготвените утайки се разтварят с 12 μl формамид.

Изследване за носителство на мутации в connexin 30

За скринирането за носителство на мутации в Cx30 del(GJB6-D13S1830) и del(GJB6-D13S1854) е използван мултиплексен PCR. В основата на метода лежи амплификация на сегментите, съдържащи местата на скъсване и свързване (breakpoint junction) на всяка делеция, а така също и сегмент, съдържащ екзон 1 на GJB6, който се използва като контрола за проверка на ефикасността на полимеразната верижна реакция и за разграничаване на хетерозиготността и хомозиготността на всяка една делеция. (66)



Фиг. 18 Генетичен тест за детекция на del(GJB6-D13S1830) и del(GJB6-D13S1854). (66)

Статистически методи

Данните от изследванията са обработени със софтуерни статистически пакети SPSS version 21 и EXCEL for Windows.

Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови показатели за структура, честота, средни стойности, корелационни коефициенти и др.

При анализа на резултатите са приложени следните параметрични тестове за проверка на хипотези при нормално и близко до нормалното разпределение на случаите: Indipendent Samples T – test, One – Way ANOVA с post hoc tests, Duncan и непараметричните тестове при различно от нормалното разпределение: тест на Kolmogorov – Smirnov, Pearson′ χ^2 - test, тест на Mann – Whitney, тест на Kruscal – Wallis.

Значимостта на изводите и заключенията се определи чрез корелационният коефициент на Pearson (PPMCC) при сигнификантност на $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

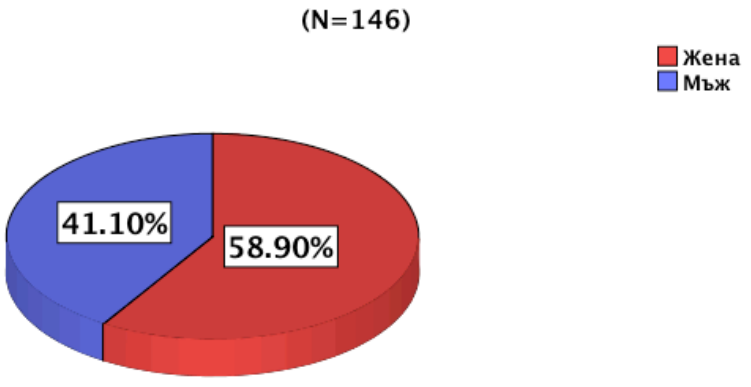
Изследваният клиничен контингент включва 146 пациенти, потърсили лекарска помощ поради проблеми със слуха. За съжаление голяма част от глухите родители отказват да изследват децата си, които също са с увреден слух, дори и да ги лекуват. Така последните остават в средата на глухите.

За изпълнението на поставените задачи и анализа на получените резултати са използвани препоръките на European Working Group on genetic hearing impairments. (2)

Създаване на клинична база данни и разширяване на ДНК биобанката на пациенти с несиндромна слухова загуба

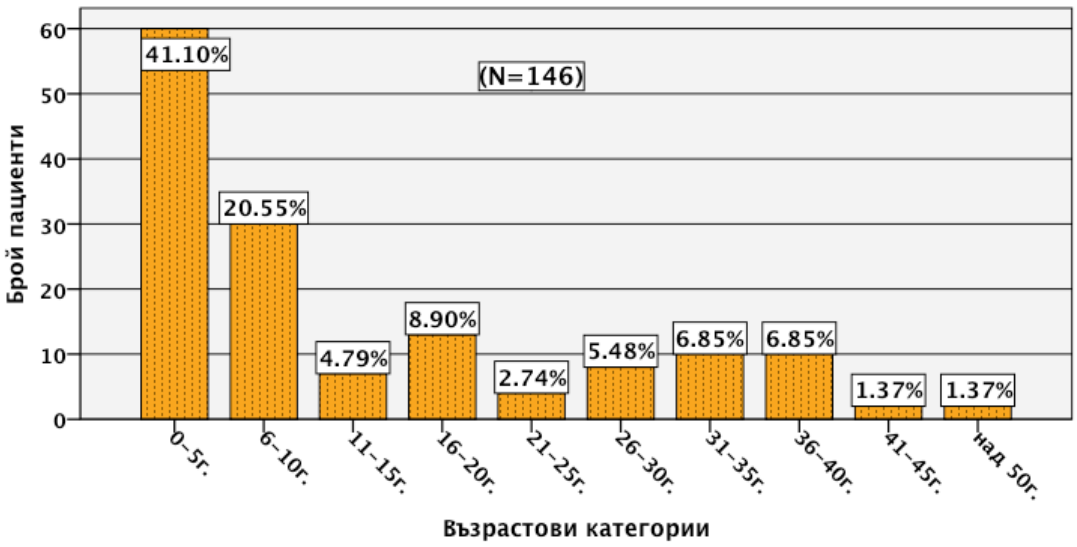
Позовавайки се на критериите за включване, бяха привлечени 146 пациени с двустанна несиндромна невросензорна загуба на слуха с неясна етиология, без други аномалии в организма и без отклонения в локалния УНГ статус.

В изследваната група преобладават жените 86 (58.9%), а мъжете са 60 (41.1%).



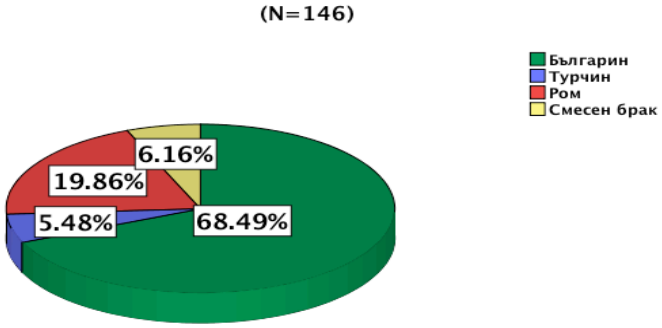
Фиг. 19 Разпределение на пациентите по пол

Изследвани са пациенти от различни възрастови категории – от 3 месеца до 53 години. Средната възраст на участниците, представена чрез медианата е 7 години. Разпределението показва, че най – голям е относителният дял на пациентите до 10-годишна възраст – 61.65%.



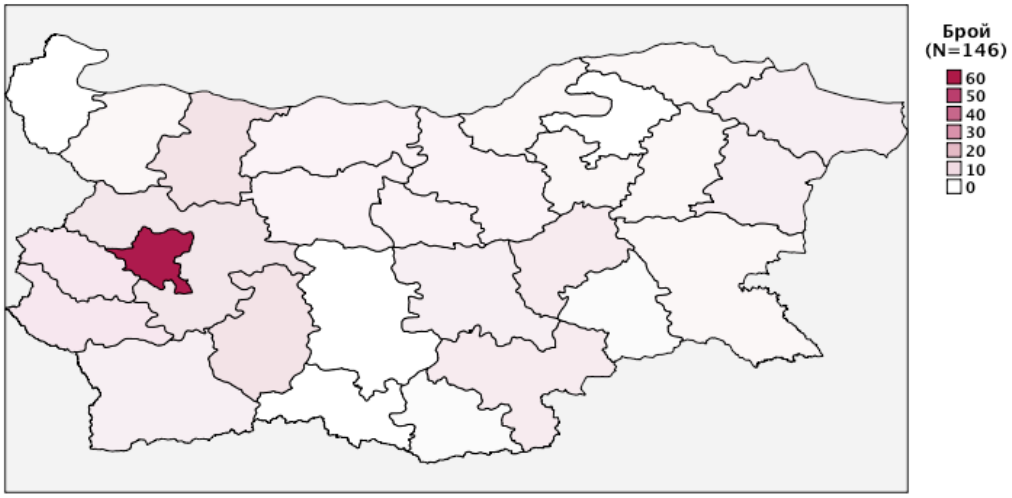
Фиг. 20 Разпределение на пациентите по възраст

В проучването са включени пациенти с различна етническа принадлежност – българи (n=100), турци (n=8), роми (n=29). Девет от пациентите съобщиха, че са от смесен брак между българка и турчин, туркиня и българин, българка и сърбин, българка и албанец, българка и французин, българка и ливанец.



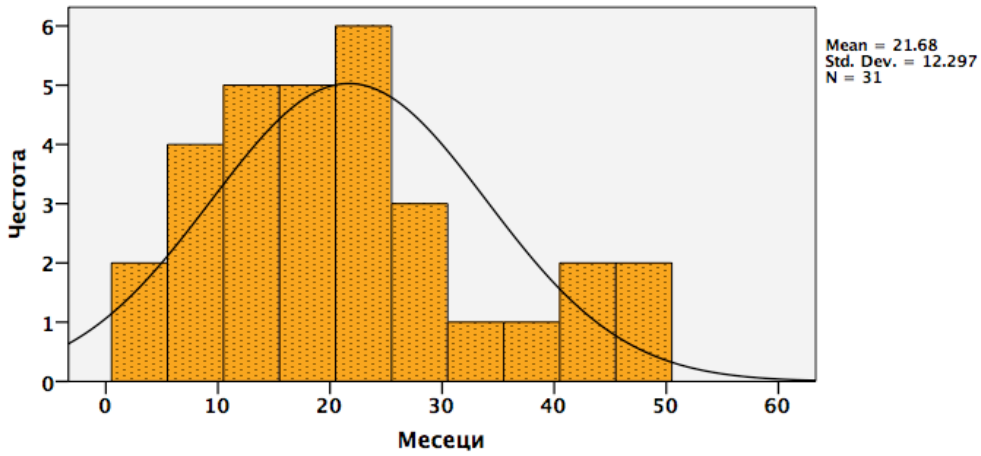
Фиг. 21 Разпределение на пацентите по етническа принадлежност

Обхванати са пациенти от цялата страна с изключение на областите Видин, Пловдив, Разград и Смолян. Най – голям е броят им от София – град (39.7% - 58), следвани по честота от областите Враца (5.5%), Пазарджик (5.5%), София – област (4.7%), Кюстендил (4.1%), Перник (4.1%), Сливен (3.4%), Хасково (3.4%) и др. Най – малък е броят на пациентите от Кърджали и Ямбол (по 0.7%).



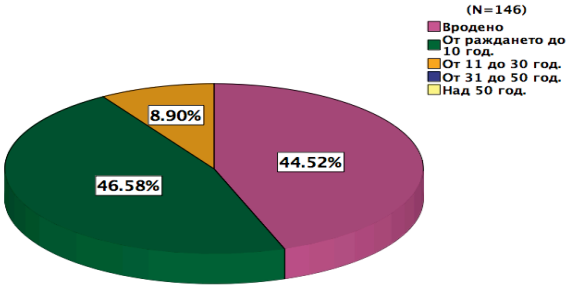
Фиг. 22 Разпределение на пациентите по региони в България

21.9% от пациентите са посочили точната възраст на поставяне на диагнозата несиндромна слухова загуба. Тя варира от 3 до 50 месеца, със средна стойност 21 месеца и половина и стандартно отклонение 12.3 месеца.



Фиг. 23 Средна възраст (в месеци) при поставяне на диагноза несиндромна слухова загуба

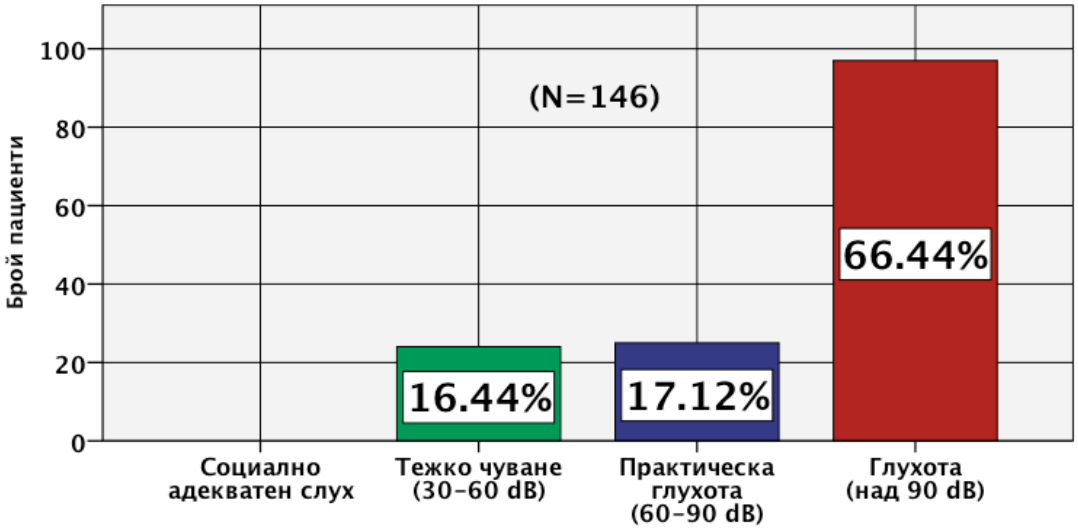
При всички пациенти слуховата загуба е с начало най – късно до 30 годишна възраст.



Фиг. 24 Начало на слуховото увреждане според класификацията на European Working Group on genetic hearing impairments

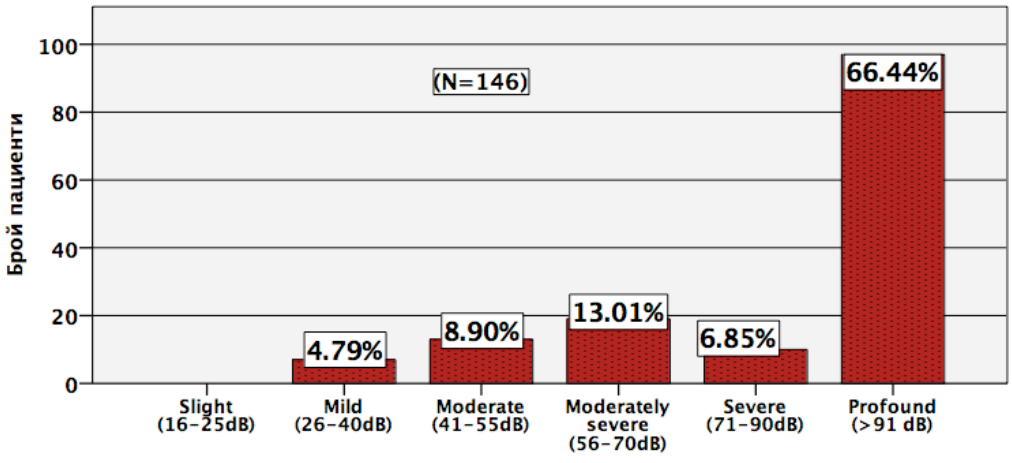
Средната слухова загуба на по – добре чуващото ухо на изследваните 146 пациенти е 82.72dB.

При разглеждане на степентта на увреда на слуха според Българската класификация прави впечатление тежкото засягане на слуховата функция. 2/3 от пациентите (66.44%) са с глухота. Най – често срещаната средна слухова загуба, изразена чрез модата е 95dB (при 44.5%).

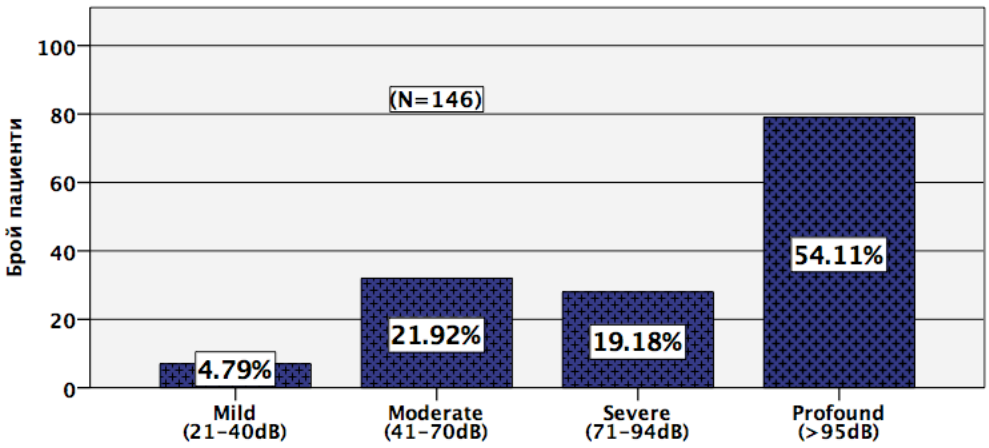


Фиг. 25 Ниво на слуховата увреда на пациентите според Българската класификация

Подобно е разпределението на пациентите и според Американската класификация на слуховите увреди (ASHA) и European Working Group on genetic hearing impairments. Поради по – големия брой подгрупи тук, степента на слуховата загуба може да бъде по – прецизно категоризирана. Именно последната класификация е използвана при сравняването на слуховта увреда с публикации на чужди автори.



Фиг. 26 Ниво на слуховата увреда според класификацията на ASHA

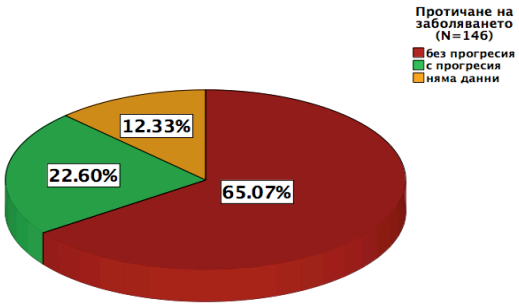


Фиг. 27 Ниво на слуховата увреда според European Working Group on genetic hearing impairments

От последните три графики се установява, че най – голям е броят на пациентите с дълбока слухова загуба (profound) или глухота.

Анализът на средната слухова загуба при 136 (93.2%) от пациентите показва симетрично засягане на двете уши и само при 6.8% е асиметрично. Разлика повече от 10dB между двете уши е приета за асиметрична. (106)

По анамнестични данни протичането на заболяването при 65.1% е стабилно, без флуктуация и без влошаване с течение на времето. 22.6% съобщават за прогресивно влошаване, а 12.3% не могат да дадат точен отговор.



Фиг. 28 Разпределение на пациентите според протичане на заболяването

При 70 пациенти (47.9%) нивото на слуховата загуба се установи с тонална прагова аудиометрия (ТПА). При останалите 52.1% (деца под 3 годишна възраст, които не са успели да се справят с детската игрова аудиометрия) се направиха слухови стволови евокирани потенциали (ССЕП) под обща анестезия.

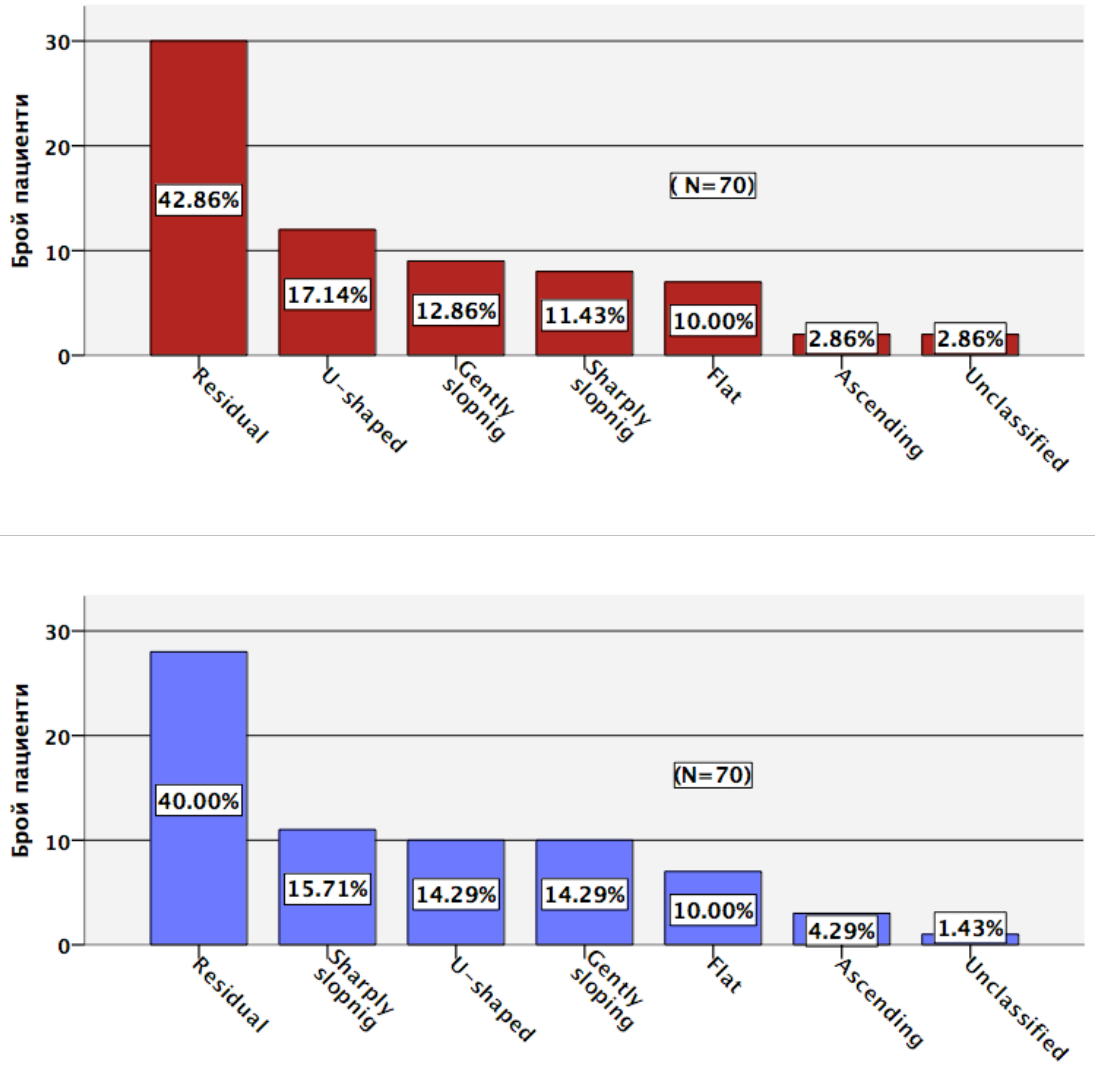
Тъй като голяма част от изледваните пациенти са с тежко засягане на слуха, за интерпретирането на аудиометричните криви се позовахме на класификацията на Liu иXi. Тя се припокрива с тази на Европейската работна група по генетични слухови увреждания, но е включен и още един вид аудиометрична крива – residual hearing, така наречената остатъчна или ъглова (остатъчен слух с измерими прагове само в нискочестотния интервал). Това осигури още по – детайлно охарактеризиране на ТПА.

Табл. 4 Класификация на аудиометричните криви по Liu и Xi

Вид аудиометрична крива
Gently sloping – плавно спускаща се за високите честоти
Sharply sloping – стръмно спускаща се за високите честоти
Ascending – възходяща
U – shaped – U – образна
Flat – плоска
Residual (hearing) – с остатъчен слух или ъглова

Преобладаващият тип аудиометрична крива сред 70-те пациенти, при които се осъществи ТПА (140 уши) е ъглова или с остатъчен слух (residual) – 41.43%. Следват криви с низходяща форма (намаление на слуха за високите честоти) полегато и стръмно спускаща се (gently sloping и sharply sloping) общо 27.15%, с U – образна форма (намаление на слуха предимно за средните честоти) 15.72% и плоска при 10%. Най – рядко срещаните аудиометрични

криви са възходящите, отразяващи намаление на слуха предимно за ниските честоти (ascending) 3.58%. 2,16% от аудиограмите на изследваните от нас пациенти с несиндромна слухова загуба не можаха да намерят място в използваната класификация. В единия случай става въпрос за намаление на слуха за ниските и високите и норма за средните честоти (1.45%), а в другия със зъбец на 4000Hz само 0.7%.



Фиг. 29 Видове аудиометрични криви на дясно (в червено) и ляво (в синьо) ухо – класификация на Liu и Xi

При сравнение вида на аудиометричните криви на двете уши се установи, че при 78.6% те са симетрични.

При всички пациенти импедансът на средното ухо е с нормални стойности, т. е. тимпанограмата е тип А. Така са изключени заболявания на средното ухо и наличие на звукопроводна слухова загуба.

От рефлексометрията положителен рефлекс на стапедиалния мускул имат само тежко чуващите пациенти (16.44%) според Българската класификация на слуховите увреди. Така са изключени пациенти с лабиринтна форма на отосклероза.

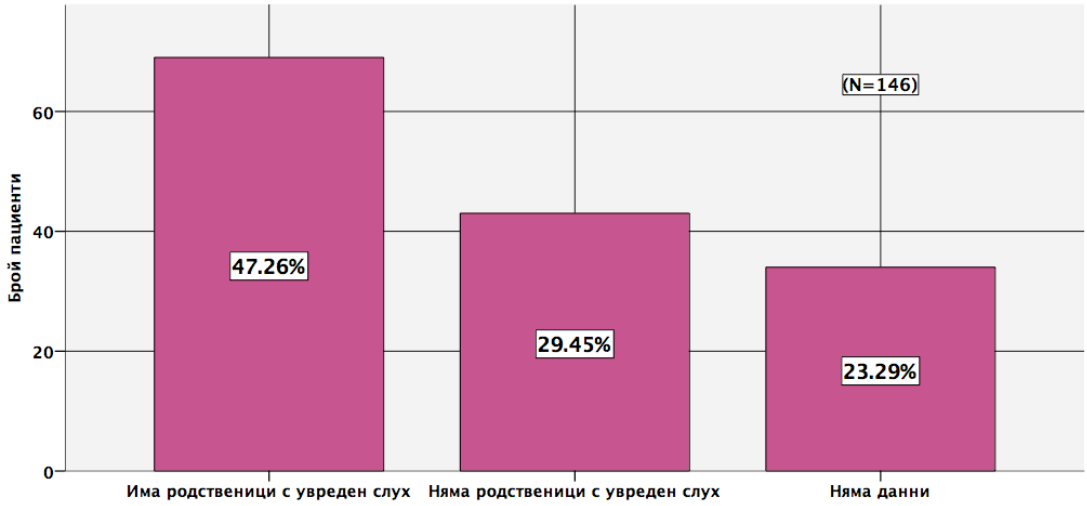
Получени са нормални TEOAE само при пациентите с лека слухова загуба до около 40dB (4.8%). При всички останали пациенти не се установява наличие на отоакустични емисии. В изследваната група не се установяват пациенти с глухота и наличие на TEOAE.

ASSR са изследвани са само пациенти с остатъчен слух , за да се определи точният праг на слуха. По този начин е определен подходящият слухов апарат, а при едностранна кохлеарна имплантация подходящото за оперативна интервенция ухо.

Анализът на анамнестичните данни показва, че проблемите със слуха при изследвания контингент са започнали от раждането най – късно до 30 годишна възраст. Прави впечатление ранното засягане на слуховата функция – при 91.1% началото е до 10, а при 74% даже до 2 годишна възраст.

Що се отнася до началото на слуховата увреда спрямо говорно развитие при 69.2% от изследваните, проблемите със слуха за започнали преди проговарянето, т. е. прелингвално. Тук трябва да се обърне внимание на факта, че някои от пациентите смятат лепетните думи за говор и субективната им преценка не е особена точна.

47.26% от изследваните пациенти са съобщили за родственици с увреден слух, 29.45% отричат, а останалите 23.29% нямат сигурни данни или не знаят за подобни случаи в семействата си.



Фиг. 30 Разпределение на пациентите по отношение на родственици със слухова увреда

Фактът, че над 66% от всички изследвани са с глухота, обяснява защо е най – голям делът на пациентите с поставен кохлеарен имплант (46.6%). Слухов апарат използват едва 10.3%. Немалко от пациентите обаче не използват нито слухов апарат, нито кохлеарен имплант – 43.2%.

На пациентите с поставен кохлеарен имплант предоперативно е направена компютърна томография. Всичките 68 пациенти са с нормално развито вътрешно ухо, без аномалии.

Генетичен анализ за наличие на мутации и/или полиморфизми в GJB2 и GJB6, кодиращи конексин 26 и конексин 30

След установяване на несиндромна слухова увреда и подписване на информирано съгласие, на участниците в изследването беше взета и венозна кръв за ДНК анализ. Събирането

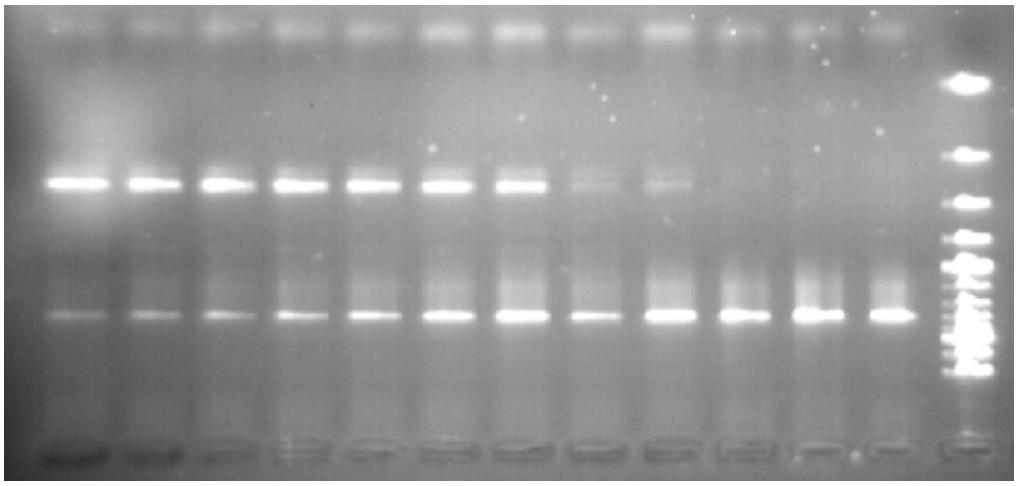
и съхранението на данните за болестта и фамилната обремененост беше извършвано в съответствие с приетите норми за съхранение на лична информация и конфиденциалност. От кръвта беше получена ДНК. ДНК – материалът се съхранява в криоепруветки на – 80^{o}C. Част от този материал беше използван за генетичен анализ, а останалата се съхранява за по – нататъшни изследвания. Така в Центъра по молекулна медицина към МУ – София се разшири ДНК биобанката на пациенти с несиндромна слухова загуба.

Генетичен анализ за носителсвто на мутации и полиморфизми в connexin 26

Оптимизиране на условията за анализ на мутациите и полиморфизмите в Cx26

Оптималните условия за амплификация и PCR реакционните смеси са намерени при последователно вариране на някои параметри. Оптимизация изискваше и методът за директно секвениране.

Оптималната температура на анилинг на праймерите беше намерена чрез градиентен PCR. Резултатите са показани на следващата фигура:



52.1 52.5 53.2 54.4 55.9 57.6 59.2 61 62.9 64.1 64.8 65.2°C L

Фиг. 31 Резултати от градиентен PCR: под всеки старт е написана температурана на анилинг. L – 100 bp маркер. Дължината на PCR продукта е 777 bp

Използваните PCR компоненти и оптимизираните количества, както и оптимизираните условия за протичане на PCR реакцията са представени в следващите две таблици.

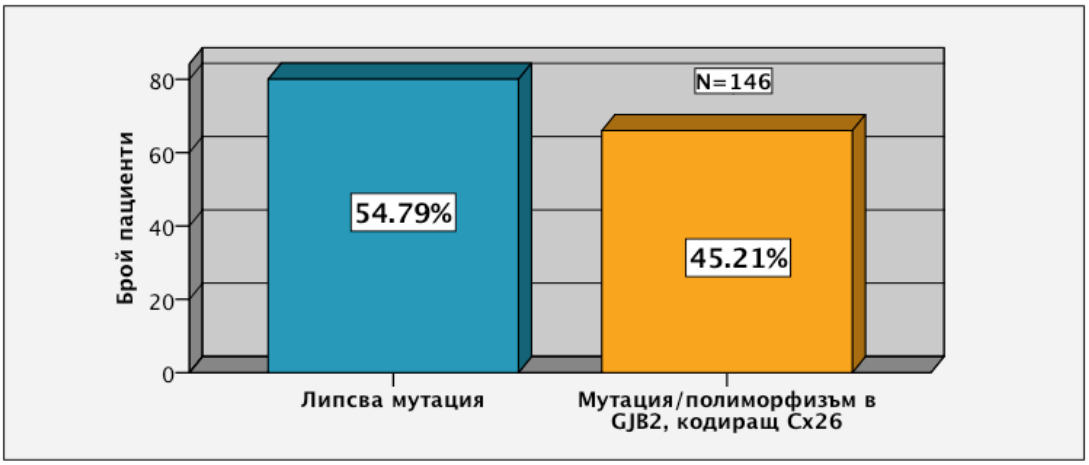
Табл. 5 PCR реактиви, използвани в хода на изследването

Компоненти на реакционната смес за PCR	***Количество (µl)***
ДНК 50 ng/µl	1
Буфер 10x (без MgCl2)	1.5
Праймер F 20 pm/ µl	0.3
Праймер R 20 pm/ µl	0.3
$MgCl_2$ (50мМ)	0.45
dNTP 5 mM/ µl	1.2
Taq-полимераза (500U/ µl)	0.05
H_2O	9.675
Краен обем	***15***

Табл. 6 Условия за протичане на PCR реакцията

Етапи на PCR реакцията	*Температура/ Времетраене*
Начална денатурация	95°C / 4 мин
Денатурация	95 °C / 1 мин
Анилинг	65 °C / 1 мин
Елонгация	72 °C / 2 мин
Крайна елонгация	72 °C / 5 мин
Брой цикли	***35***

От генетичното изследване на 146 пациенти с несиндромна слухова загуба при 66 (45.21%) се установиха мутации и/или полиморфизми в GJB2 гена, кодиращ белтъка конексин 26.



Фиг. 32 Резултати от генетичното изследване за мутации в гена GJB2, кодиращ Cx26

Алелната честота на различните мутации и полиморфизми на Cx26 в изследваната от нас популация от 146 пациенти е дадена в таблицата по – долу.

Табл. 7 Установени мутации и/или полиморфизми в Cx26 (IC1 – интрацелуларна примка 1; IC2 – интрацелуларна примка 2; TM1 – трансмембранен домен 1; TM2 – трансмембранен домен 2)

Нуклеотидна промяна	***Белтъчна промяна***	***Алелна честота сред цялата изследвана популация (N=146)***	***Домен (107)***	***Вид мутация***	***Truncating (T)/ Nontruncating (NT)***
c.35delG	p.G12fsX13	26.71%	IC1	Frameshift	T
c.71G>A	p.W24X	9.5%	TM1	Nonsense	T
c.312del14	p.K105fsX109	0.68%	IC2	Frameshift	T
c.109G>A	p.Val37Ile	0.34%	TM1	Missense	NT
c.269 T>C	p.Leu90Pro	0.34%	TM2	Missense	NT
c.362T>A	p.lle121Asn	0.34%	IC2	Missense	NT
c.79G>A	p.Val27Ile (полиморфизъм)	0.34%	TM1	Missense	NT
c.380G>A/ 379G>A	p.Arg127His (полиморфизъм)	0.68%	IC2	Missense	NT

Идентифицираните алелни варианти бяха класифицирани като truncating (разкъсващи) и nontruncating (неразкъсващи) мутации. Групата на truncating мутациите включва nonsense мутации и мутации, водещи до изместване в рамката на четене (frameshift). Групата на nontruncating мутации включва missense мутации, водещи до аминокиселинна замяна. Въпреки, че в последния случай протеинът може да бъде транслиран, при някои аминокиселинни замени е възможно той да е функционално неактивен.

В таблицата по – долу са посочени намерените мутации и/или полиморфизми в гена GJB2, кодиращ Cx26.

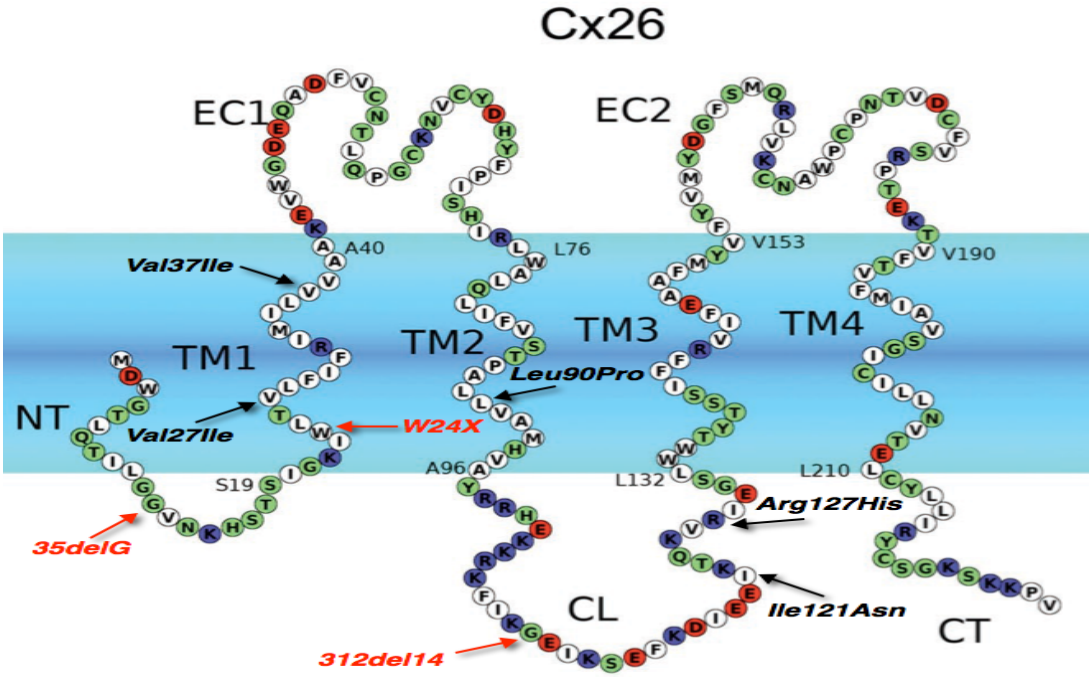
Табл. 8 Установени генотипове в GJB2, кодиращ Cx26

Вид мутации в гена, кодиращ Cx26	***Брой пациенти (N)***	***Процент от всички пациенти (N=146)***	***Процент от пациентите с мутации в GJB2 (N=66)***	***Етническа принадлежност***
c.35delG/ c.35delG	32	21.9%	48.48%	Българин 25 (78.1%) Турчин 4 (12.5%) Смесен брак 3 (9.4%)
c.35delG/WT	12	8.2%	18.18%	Българин 12 (100%)
c.35delG/ c.312del14	1	0.7%	1.52%	Българин 1 (100%)
c.35delG/p.W24X	1	0.7%	1.52%	Ром 1 (100%)
p.W24X/p.W24X	13	8.9%	19.7%	Ром 13 (100%)
p.W24X/WT	1	0.7%	1.52%	Смесен брак 1 (100%)
p.Arg127His/WT	2	1.4%	3.03%	Ром 2 (100%)
p.Leu90Pro/ p.Ile121Asn	1	0.7%	1.52%	Българин 1 (100%)
c.312del14/WT	1	0.7%	1.52%	Българин 1 (100%)
p.Val27Ile/WT	1	0.7%	1.52%	Българин 1 (100%)
p.Val37Ile/WT	1	0.7%	1.52%	Българин 1 (100%)

В изследвания контингент е установена (при групата пациенти, събрани при проучването от 2009 година) непубликувана до момента в световен мащаб мутация p.Ile121Asn при пациент с

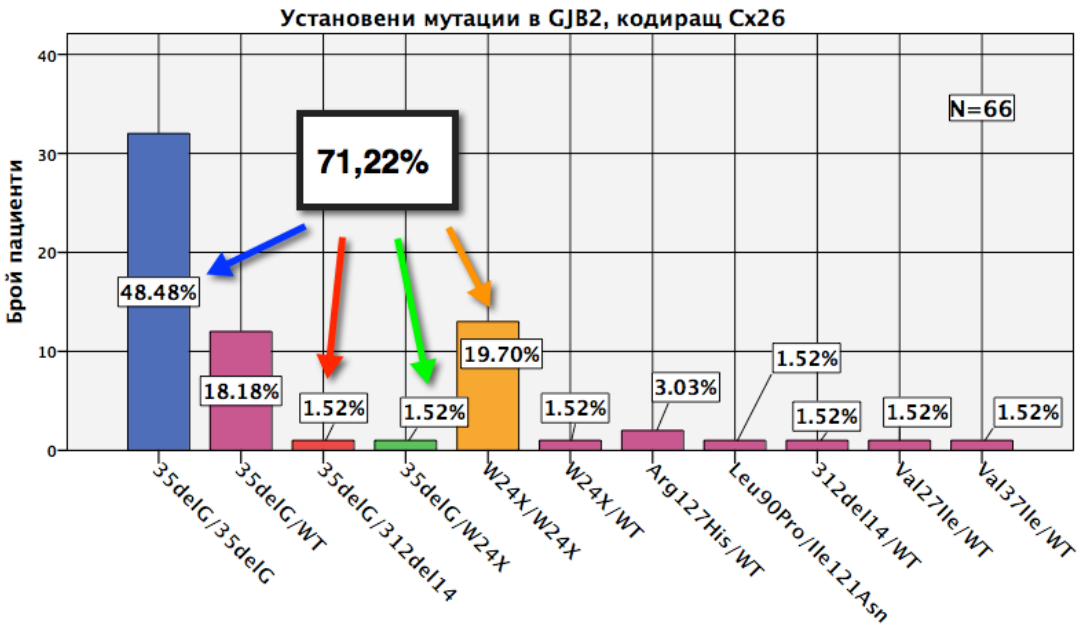
несиндромна слухова увреда и то в хетерозиготно състояние p.Leu90Pro/p.Ile121Asn.

Голямо внимание е обърнато на различните видове мутации в гена GJB2, кодиращ Cx26, тъй като клиничното протичане на слуховата увреда има специфични особености при всяка една от тях.



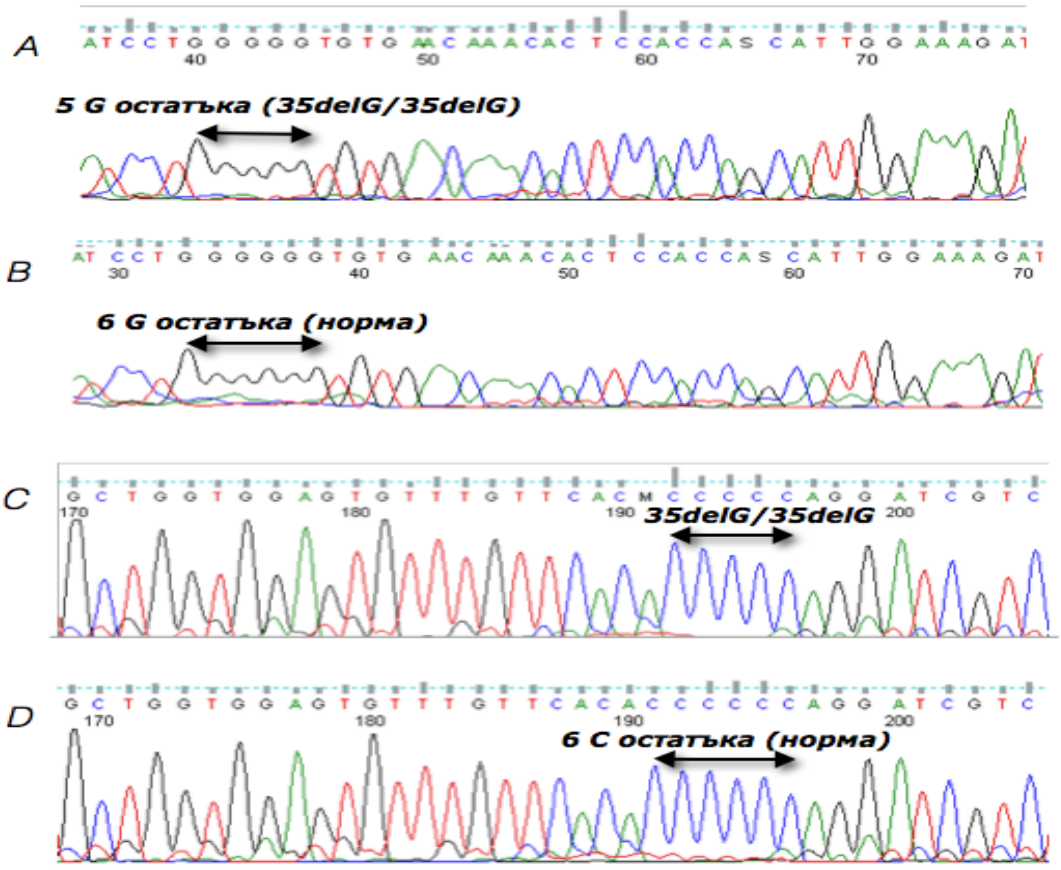
Фиг. 33 Място на увреда в конексин 26 на откритите от нас мутации. Отразените с червено мутации в хомозиготно състояние или като комплексни хетерозиготи водят до генетична несиндромна слухова загуба при изследваните пациенти

Генетична причина за слуховата увреда беше установена при 71.22% от пациентите с мутации и/или полиморфизми в Cx26 или 32.2% от общия брой изследвани пациенти. Наблюдаваните шест вида мутации и двата полиморфни варианта (p.Arg127His, p.V27I) в гена GJB2, кодиращ Cx26, са представени на следната графика:

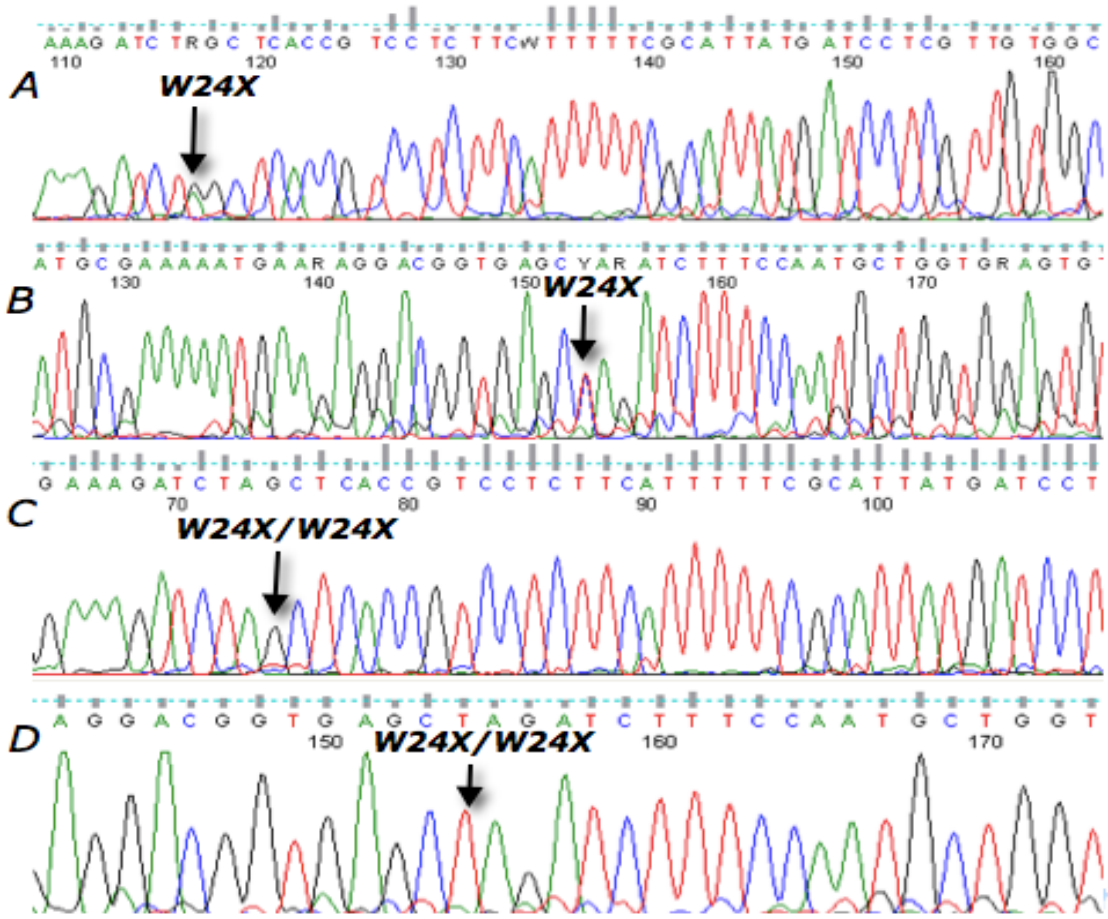


Фиг. 34 Видове мутации и/или полиморфизми, установени в GJB2, кодиращ Cx26. Посочените със стрелки мутации водят до генетична несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26

Почти половината от случаите с мутации и/или полиморфизми в Cx26 (GJB2) са с c.35delG/c.35delG (48.48%). Вторият по честота мутация с 19.7% е p.W24X/p.W24X и се установи при 13 пациенти.

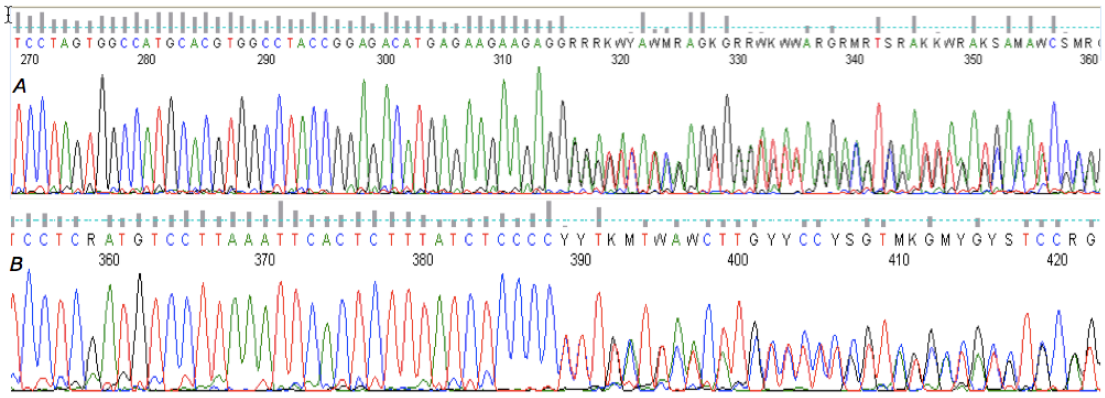


Фиг. 35 Електрофореграми, показващи пациент с мутацията c.35delG в хомозиготно състояние и пациент без мутацията. A) и C) секвенции, показващи мутацията c.35delG с праймер Cx26 1F и Cx26 2R съответно; B) и D) секвенции на пациент, при който не се наблюдава мутацията c.35delG направени с Cx26 1F и Cx26 2R



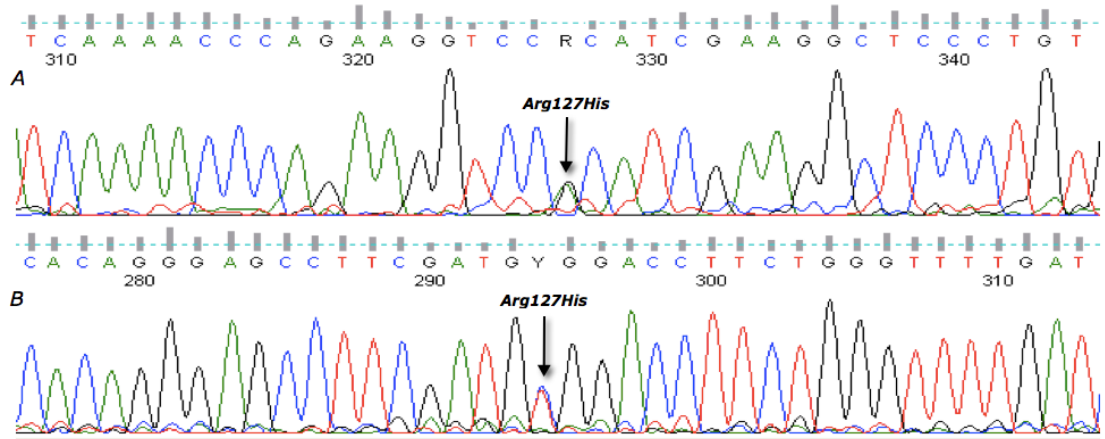
Фиг. 36 Електрофореграми на пациент с мутацията p.W24X в хетерозиготно (A и B) и в хомозиготно (C и D) състояние. A) и C) Секвенция получена с Cx26 1F праймер; B) и D) Секвенция получена с Cx26 2R праймер

Двама от пациентите с генетична Cx26 свързана глухота се оказаха комплексни хетерозиготи, съответно с c.35delG/c.312del14 (1.52%) и c.35delG/p.W24X (1.52%). Това е състояние, при което са налице два рецесивни алела на един и същ ген, но тези два алела са различни един от друг.

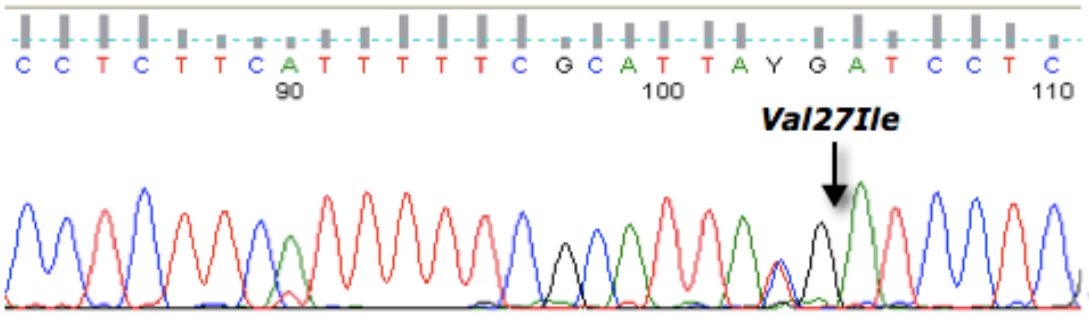


Фиг. 37 Електрофореграма на пациент хетерозиготен носител на мутацията c.312del14 (c.313_326del14). А) Секвенция получена с 1F праймер; В) Секвенция получена с 1R праймер

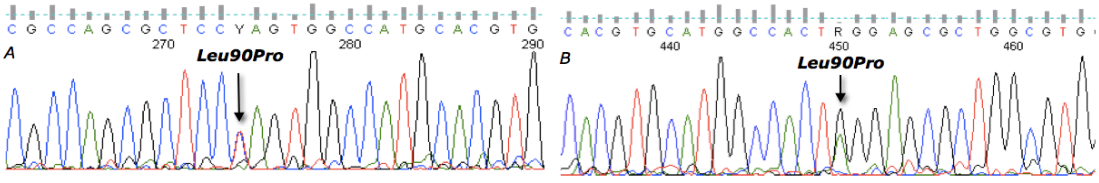
Двата полиморфни варианта p.Arg127His и p.Val27Ile нямат значимост за клиничното протичане и представляват едновременно наличие в популацията на няколко алела в един и същ локус, които се намират в равновесие в продължение на редица поколения.



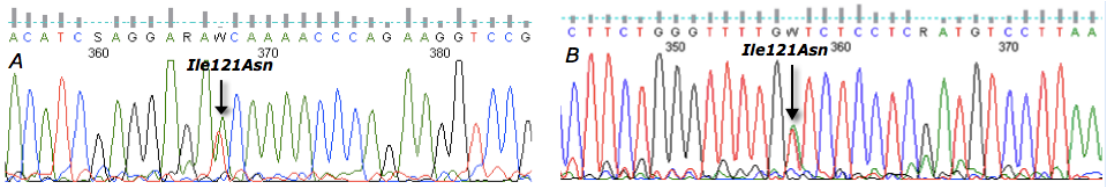
Фиг. 38 Електрофореграми на пациент носител на мутацията p.Agr127His в хетерозиготно състояние. А) Секвенция получена при използването на Cx26 1F праймера В) секвенция получена при използването на Cx26 1R праймера



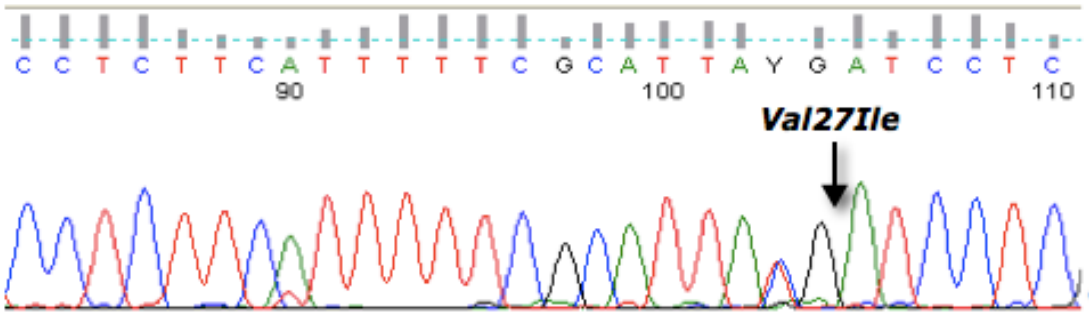
Фиг. 39 Електрофореграма на пациент носител на полиморфизма p.V27I в хетерозиготно състояние



Фиг. 40 Електрофореграми на пациент с мутацията p.Leu90Pro. A) и B) секвенции показващи мутацията p.L90P с Cx26 1F и Cx26 1R съответно



Фиг. 41 Електрофореграми на пациент с мутацията p.Ile121Asn. A) секвенция, получена с Cx26 1F праймер B) секвенция получена с Cx26 2R праймер



Фиг. 42 Електрофореграма на пациент носител на полиморфизма p.V27I в хетерозиготно състояние

Генетичен анализ за носителство на мутации и полиморфизми в connexin 30

Пациентите без мутации или полиморфизми в GJB2 (80 или 54.79%) и хетерозиготните пациенти за GJB2 (19 или 13.01%) бяха изследвани за делеции в гена GJB6, кодиращ Cx30. При нито един не се откриха делециите del(GJB6-D13S1830) и del(GJB6-D13S1854). За тези пациенти генетичният скрининг трябва да продължи като се търсят мутации в други гени.

Корелационен анализ между клиничното протичане на несиндромната слухова загуба и установените мутации в гените, кодиращи конексин 26 и конексин 30 (генотип – фенотип корелации)

Получените генетични резултати се опитахме да обвържем с клиничното протичане на несиндромната слухова увреда, т. е. да направим генотип – фенотип корелации, които да спомогнат за изготвянето на клинична характеристика на несиндромната слуховата загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30.

А. Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26

С цел интерпретиране на получените от генетичното изследване резултати в светлината на клиничното протичане на несиндромната слухова загуба, разделихме пациентите на следните групи:

- Пациенти без установени мутации в Cx26 – 54.8% (n=80)
- Пациенти с налични мутации и/или полиморфизми в Cx26, които обаче не са достатъчни да обяснят слуховата увреда – 13% (n=19): c.35delG/WT;

p.W24X/WT; p.Arg127His/WT; p.Leu90Pro/p.Ile121Asn; c.312del14/WT; p.Val27Ile/WT; p.Val37Ile/WT

- Пациенти с доказана генетична несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 – 32.2% (n=47): хомозиготни – c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X – както и комплексните хетерозиготни – c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14

Разпределение на пациентите по пол

58.9% от всички изследвани пациенти са жени, а 41.1% са мъже. Анализът на разпределението на пацинетите по пол, използвайки метода χ^2, не установи връзка между наличието на мутации и/или полиморфизми в Cx26 и пола на пациентите (Pearson chi square p=0.469).

Табл. 9 Разпрепределение на пациентите по пол в зависимост от установените мутации в гена на Cx26

	Пол		***Общо***
	Жена	***Мъж***	
Липсва мутация	50	30	80
Хетерозиготно състояние/ полиморфизъм	9	10	19
c.35delG/c.35delG; p.W24X/p.W24X; c.35delG/c.312del14; c.35delG/p.W24X	27	20	47
Общо:	*86*	*60*	*146*

Не установихме статистически значима разлика по пол и между пациентите с двете хомозихотни мутации c.35delG и p.W24X. (Pearson Chi-Square p=0.745)

Разпределение на пациентите по етническа принадлежност

Подбраният от нас контингент е с разнородна етническа принадлежност. Анализирайки различните мутации в Cx26 установихме, че те са характерни за определени етнически групи.

Табл. 10 Разпределение на пациентите в зависимост от вида установена мутация и/или полиморфозъм в Cx26 и етническата принадлежност

	Етническа принадлежност				***Общ брой (% от общия брой)***
	Българин (n=100)	***Турчин (n=8)***	***Ром (n=29)***	***Смесен брак (n=9)***	
c.35delG/c.35delG	25 (17.1%)	4 (2.7%)	0	3 (2.1%)	32 ***(21.9%)***
c.35delG/WT	12 (8.2%)	0	0	0	12 (8.2%)
c.35delG/c.312del14	1 (0.7%)	0	0	0	1 ***(0.7%)***
c.35delG/p.W24X	0	0	1 (0.7%)	0	1 ***(0.7%)***
p.W24X/p.W24X	0	0	13 (8.9%)	0	13 ***(8.9%)***
p.W24X/WT	0	0	0	1 (0.7%)	1 (0.7%)
p.Arg127His/WT	0	0	2 (1.4%)	0	2 (1.4%)
p.L90P/p.Ile121Asn	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
c.312del14/WT	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
p.Val27Ile/WT	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
p.Val37Ile/WT	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
Липсва мутация	58 (39.7%)	4 (2.7%)	13 (8.9%)	5 93.4%)	80 (54.8%)
Общо:	100 (68.5%)	8 (5.5%)	29 (19.9%)	9 (6.2%)	146 (100%)

При 42% пациентите с български етнически произход (n=100) се установиха генетични промени. Това са мутациите c.35delG, c.312del14, p.Leu90Pro, p.Ile121Asn, p.Val37Ile и полиморфният вариант p.Val27Ile.

Най – често срещаната мутация в тази група е c.35delG. Хомозиготният й вариант води до генетична глухота, поради увреда на Cx26 при 25% от българите в нашата популация. При 12% от тях

се установи хетерозиготният вариант c.35delG/WT. Или при повече от 1/3 от българите са носители на мутантен алел c.35delG.

И двамата носители на c.312del14 в нашата популация са българи. Единият е комплексен хетерозигот c.35delG/c.312del14 (1% от всички българи), а другият е в хетерозиготно състояние c.312del14/WT. В първия случай мутацията води до прелингвална генетична глухота, докато във втория трябва да се търси друга мутация, обясняваща намалението на слуха. Изследването на GJB6 не доказа делеции при тези пациенти.

Мутациите p.Leu90Pro (1%) и p.Ile121Asn (1%) установихме едновременно при един пациент от български произход. Той е комплексен хетерозигот. Най – вероятно тези две мутации са причина за глухотата при него. Необходимо е да бъдат извършени молекулярни изследвания на новооткритата p.Ile121Asn мутация, доказващи връзката й с несиндромната слухова загуба. Глухотата в този случай също е вродена, прелингвална, а пациентът е с добро развитие на говора и слуха от поставения кохлеарен имплант.

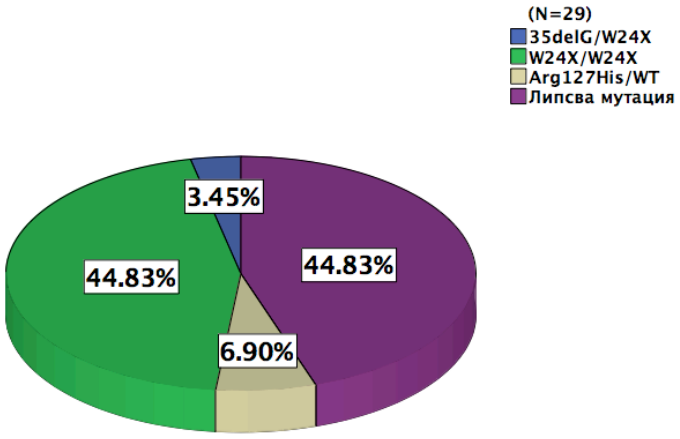
p.Val37Ile/WT и полиморфният вариант p.Val27Ile/WT са с честота по 1% сред българите или 0.7% сред цялата ни популация.

Полиморфният вариант p.V27I бе наблюдаван в хетерозиготно състояние при един пациент с български произход (1%) с пълна слухова загуба още от раждането. Той е непатогенен и не е причина за глухотата в случая. Del Castro et al. докладва, че p.V27I е установен в 28.6% от глухи пациенти бразилски произход. (108)

При 50% от пациентите с турски етнически произход (n=8) се установи генетична причина за несиндромната слухова загуба. Единсвената мутация при тях и то само в хомозиготно състояние е c.35delG.

През 2005 Kalay доказва висока алелна честота на c.35delG в GJB2 (76%) при изследване на пациенти ARNSHL от Североизточна Турция. В тази популация са описани и p.W24X, c.310del14, c.delE120, R184, Q80K и P173S. (109)

В настоящето изследване са включени 29 пациенти от ромски етнически произход. Мутациите, които бяха наблюдавани при тях са p.W24X, c.35delG и p.Arg127His. Генетична причина за възникването на несиндромна слухова загуба, резулат от увреда на Cx26 в тази група се откри при 48.2% (14/29). Това са пациентите с p.W24X/p.W24X, както и комплексният хетерозигот c.35delG/p.W24X. Другите двама са носители на полиморфния вариант p.Arg127His/WT.



Фиг. 43 Резултати от генетичното изследване сред пациентите с ромски етнически произход

Мутацията p.W24X е била проучена от изследователския екип на Bouwer. Те генотипирали 603 контролни индивида от ромски произход, представящи 8 традиционни субизолатни популации в Югоизточна Европа и 4 допълнителни Европейски региони. Авторите открили, че p.W24X е широко разпространена, тъй като е

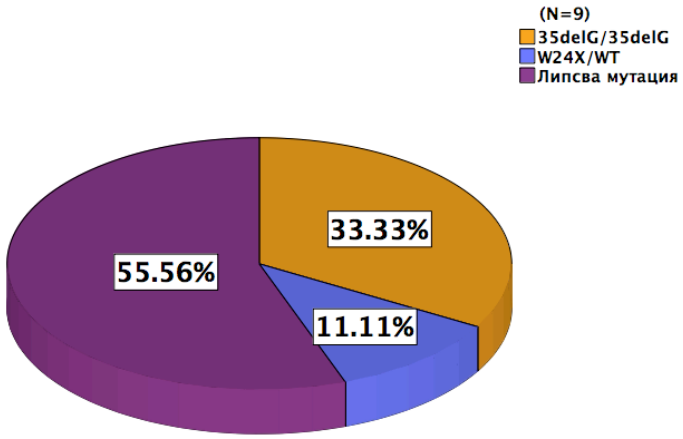
прародителска мутация на основателя. Те наблюдавали вариране в субизолатните популации, но средната честота на носителство била в границите на 4-5%. (110) Мутацията била наблюдавана с висока честота в пациенти с несиндромна слухова загуба от индийски и ромски произход, а така също и в бангладежка и словашка популции. (94, 111-114) Изследователската група на Padma et al., изследвали за носителство на мутации в GJB2 303 пациента от Индия и установили, че p.W24X представлява 87% от всички наблюдавани мутантни алели. (114) Алелната честота на тази мутация била 79% от всички мутантни DFNB1 алели в проучване на Alvarez et al. Тази група изследвали 34 семейства в Испания от ромски произход. Алелната честота на c.35delG, най – честата мутация предизвикваща несиндромна слухова загуба в Кавказката популация в това проучване, била 17%. (113)

В нашето изследване откриваме мутацията p.W24X и в единия от двамата комплексни хетерозиготи с генетична глухота, който също е ром c.35delG/p.W24X (3.4%). Такъв хетерозигот е докладван и от Khandelwal и сътрудници при проучване ролята на GJB2 в Индийската популация. (115) Lazar et al. в проучване сред пациенти с несиндромна слухова загуба в Северозападна Румъния съобщава за два случая с c.35delG/p.W24X. (116) Два случая са докладвани и в проучване във Франция. (117)

Втората по честота мутация в ромската група е p.Arg127His. Доказана е при двама души (при 6.9% от ромската група или 1.4% от цялата ни популация) и то в хетерозиготно състояние. Алелът е бил открит в хомо – и хетерозиготно състояние при пациенти с увреден слух в различни страни. Според изследване на Minarik et al. от 2003 година на словашки роми, честотата на тази мутация е 0.92%. (94) Според авторския колектив на Matos et al. p.Arg127His може да

доведе до намаление на слуха в зависимост от заобикалящите ни фактори и/или генетичният фон. (118)

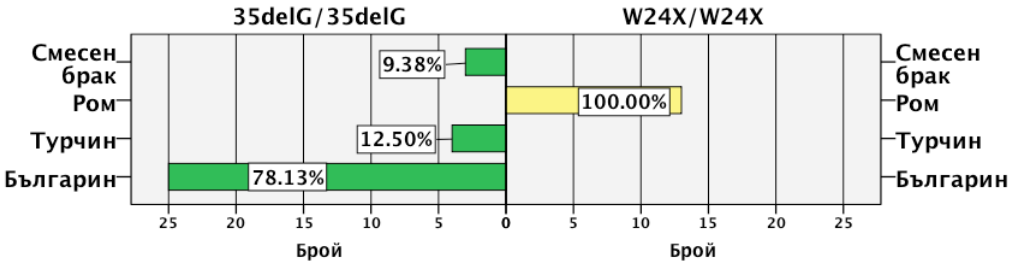
При пациентите от смесени бракове (n=9) се установиха мутациите c.35delG и p.W24X. При 33% (3/9) от пациентите в тази група несиндромната глухота се дължи на увреда на Cx26, поради хомозиготната мутация c.35delG/c.35delG. Тези пациенти са от бракове между туркия и българин, българка и сърбин, българка и турчин. Единственият пациент, при който се установи p.W24X в хетерозиготно състояние е с майка българка и баща албанец (11.1% от тази група или 0.7% от цялата изследвана популация). В проучване на Stefanovska et al. за разпространението на мутациите в GJB2 в Република Македония p.W24X се е установява само при роми. При албанците са намерени мутациите c.35delG и p.V37I. При останалите 55.56% от тази група не се доказаха мутации в Cx26.



Фиг. 44 Резултати от генетичното изследване при пациентите от смесени бракове

Анализирайки резултатите, установихме статистически значима разлика между етническата принадлежност в двете групи хомозиготни мутации c.35delG и p.W24X (p=0,000). p.W24X/p.W24X се среща само при пациенти от ромски произход, а c.35delG/c.35delG

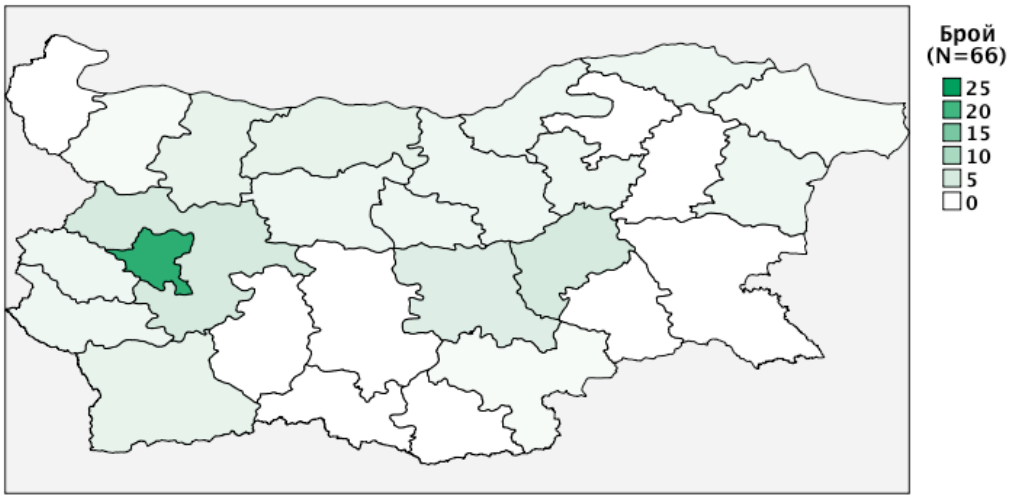
при пациенти от български, турски произход, както и пациенти от смесени бракове между българи, турци, сърби.



Фиг. 45 Сравнение между пациентите с c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X по етническа принадлежност

Разпределение на пациентите по региони в България

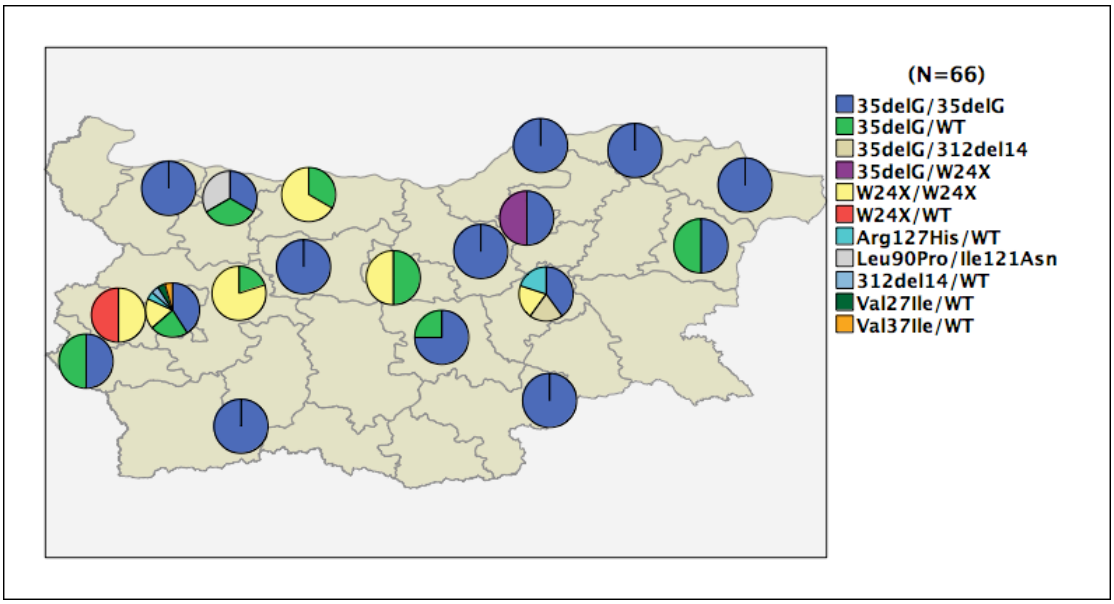
Събраният контингент за това изследване е от цялата страна, но най – голям е броят на пациентите с мутации и/или полиморфизми в Cx26 от София – град 22 (33.3%). Това може да се обясни с по – големия брой събрани пациенти от този регион (58/146). Следват София – област и Сливен с по 7.6%, Стара Загора – 6.1%.



Фиг. 46 Разпределение на пациентите с установени мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26 по региони в България

Докато мутацията c.35delG/c.35delG е почти равномерно разпределена на територията на нашата страна, като челно място

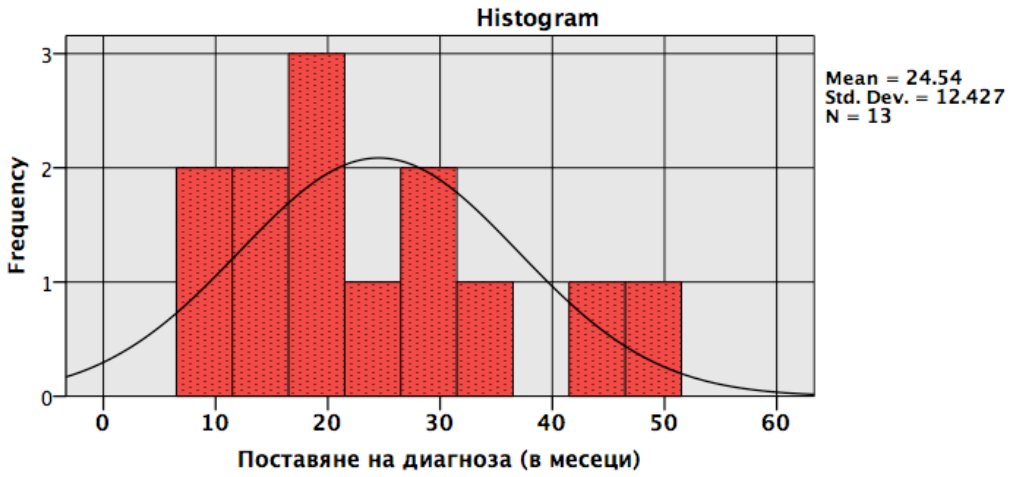
заема София – град, следван от Стара Загора и Благоевград, то p.W24X/p.W24X се среща предимно в София – град, София – област, Плевен, Габрово, Перник и Сливен. Двамата комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 са съответно от Търговище и Сливен.



Фиг. 47 Разпределение на пациентите с мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26 по региони в България

Възраст при поставяне на диагнозата генетична слухова загуба, резултат от увреда на Cx26

В проведеното изследване 13 от пациентите с генетична слухова загуба, поради увреда на Cx26, са посочили точната възраст на поставяне на диагнозата – от 9 до 50 месеца, със средна възраст 24.54 месеца и стандартно отклонение 12.427.



Фиг. 48 Възраст на поставяне на диагнозата генетична слухова загуба, резултат от увреда на Cx26

Средната възраст на поставяне на диагноза несиндромна слухова загуба без генетични увреди в Cx26 (n=13) е 18.69 месеца.

Табл. 11 Възраст на поставяне на диагнозата несиндромна слухова загуба при пациентите с и без генетични увреди в Cx26

	Пациенти с несиндромна СЗ, резултат от увреда на Cx26	***Пациенти с несиндомна СЗ, но без установени генетични промени в Cx26***
N	13	13
Средна възраст (в месеци)	24.54	18.69
Поставяне на диагноза (в месеци)		
Минимум	9	3
Максимум	50	44
Медиана	21.00	12.00
Мода	20	12
Стандартно отклонение	12.427	11.996

Представената по – горе таблица показва забавеното откритие на намалението на слуха, независимо от етиологията (средно около 21.5 месеца). Средната възраст на поставяне на диагнозата при генетичните слухови увреди е по – късно с около половин година.

Начало на слуховата увреда

В изследвания контингент началото на слуховата загуба е най – късно до 30 годишна възраст. Прави впечатление обаче, много по – ранната увреда при пациентите с мутации в Cx26 (най – късно до 10 години), като по – голям в тази група е делът на хетерозиготните.

Табл. 12 Начало на слуховата увреда при изследваните групи пациенти според класификацията European Working Group on genetic hearing impairments

Изследвани пациенти	***N***	***Вродено***		***От раждането до 10 години***		***От 11 до 30 години***	
		брой	***%***	***брой***	***%***	***брой***	***%***
Без мутации в Cx26	80	23	28.8%	44	55%	13	16.3%
С мутации и/или полиморфизми в Cx26:	66	42	63.6%	24	36.4%	-	-
необясняващи слуховата загуба	19	15	***78.9%***	4	***21.1%***	-	-
обясняващи слуховата загуба	47	27	***57.4%***	20	***42.6%***	-	-

В нашата популация 63.6% от пациентите с промени в Cx26 съобщават за вродено увреждане (n=66), а 71.3% от пациентите без мутации в Cx26 началото на слуховата загуба е от раждането до 30 годишна възраст. Т.е. констатирахме статистически значима разлика (p=0.000) в началото на слуховата увреда при пациентите с (n=66) и без мутации (n=80) в GJB2. Такава обаче не се установи (p=0.103), както между групите на пациентите с генетична слухова увреда от Cx26 (n=47) и пациентите с мутации в GJB2, но с неясна причина за намаления слух (n=19), така и в групата на пациентите с генетична слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 (n=47) (p=0.570). При

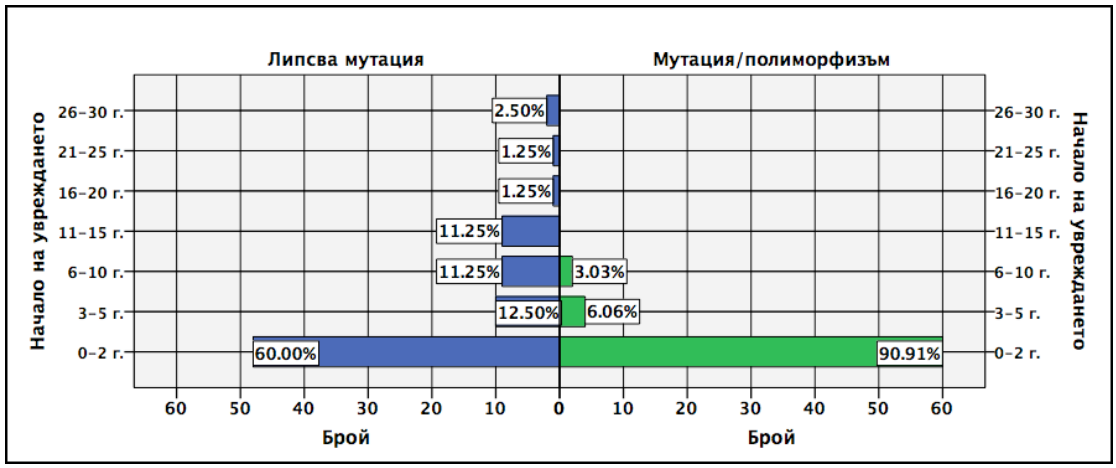
всички комплексни хетерозиготни (c.35delG/p.W24X; c.35delG/c.312del14; p.Leu90Pro/p.Ile121Asn) слуховата загуба е вродена. Или генетичните промени в Cx26 пердизвикват ранна увреда на слуховата функция.

В нашето изследване всички пациенти с мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26, слуховата загуба започва най – късно до 10 годишна възраст, а в групата с вродено увреждане техният дял е 64.6%. За разлика от тях при 16.3% от пациентите с неустановени мутации слуховата увреда започва след 11 годишна възраст, а най – голям е броят им (55%) от раждането до 10 години. Едва 28.8% съобщават за вродено увреждане.

При събирането на анамнестичните данни за началото на слуховата загуба, обаче се сблъскахме със следния проблем. Не малък процент от пациентите се колебаеха да посочат дали слухът е засегнат още от раждането или в първите месеци след това, а дори и през първите 1 – 2 години преди проговарянето на детето. Това би подложило на съмнение достоверността на получените резултати. Някои от родителите смятаха, че децата им чуват, тъй като реагират на затварянето на вратата, преминаването на превозни средства, звъненето на звънеца в къщи и други, без да отчитат усещането на вибрациите. Други пък възприемаха гукането, викането, лепетните думи за говор, което също е довело до забавяне поставянето на диагнозата. Този проблем още веднъж насочи вниманието ни върху момента на поставяне на диагнозата на слуховта увреда. Въвеждането на неонатален слухов скриниг в България би спестило време и разходи на тези родители и на държавата и най – важното навременно лечение на глухите деца.

За да се опитаме да изключим влиянието на субективния фактор за началото на слуховата увреда разделихме пациентите на

групи през 5 години, като в първите 5 години включихме две подгрупи – от раждането до 2 – годишна възраст и 3 – 5 години. Получените резултати сравнихме с тези от предходната класификация.



Фиг. 49 Разпределение на пациентите с и без мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26 според началото на слуховата увреда (собствена класификация)

Констатирахме статистически значима зависимост между наличието на генетични промени в Cx26 и ранното начало на слуховата загуба (p=0.000). При 90.9% от пациентите с генетични промени в Cx26 (n=66) началото на нарушението на слуха е от 0 – 2 години, а при пациентите без установени мутации (n=80) в 60%. Такава зависимост по отношение началото на слуховата увреда не се установява между пациентите с хеторзиготни мутации или полиморфизми и тези с генетична слухова загуба (p=0.495).

Анализирайки данните по вид мутациии, получихме интересни резултати. При всички пациенти с c.35delG/c.35delG слуховата увреда започва в периода от раждането до 2 годишна възраст, като 59.4% са посочили даже, че увредата е вродена. При p.W24X/p.W24X едва 61.5% съобщават за начало на слуховото увреждане от раждането до 2 години, при 30.8% до 5 годишна възраст и само при един пациент слуховата увреда е започнала на 6

години. При 46.2% от пациентите с тази мутация увреждането на слуха е вродено.

И двамата комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 са посочили, че увреждането е вродено.

Можем да заключим, че за началото на слуховата загуба има значение и видът увреда в Cx26. Според нашата класификация е налице статистически значима разлика между c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X по отношение началото на слуховото увреждане. (p=0.001), за разлика от Европейската (p=0.424). Това се обяснява с по – детайлното разпределение по възрастови групи в нашата класификация.

Табл. 13 Разпределение на пациентите с генетична несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 според началото на увреждането. Класификация на European Working Group on genetic hearing impairments (в зелено) и собствена класификация (в червено)

		c.35delG/ c.35delG	c.35delG/ c.312delG	c.35delG/ p.W24X	p.W24X/ p.W24X		
Начало на СЗ (European Working Group on genetic hearing impairments)	Вродено	19 / 32	1 / 1	1 / 1	6 / 8	0-2 год.	Начало на СЗ (собствена класификация)
	От раждането до 10 год.	13 / 0	0 / 0	0 / 0	7 / 4	3-5 год.	
	От 11-30 год.	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 1	6-10 год.	

Установи се, че 89.4% от пациентите с генетична несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26, са с начало на слуховото увреждане от раждането до 2 годишна възраст, 8.5% са с начало на слуховата загуба между 3 и 5 годишна възраст.

При 57.4% генетичните слухови увреди на Cx26 в нашата популация са вродени, а при останалите началото е най – късно до 10 годишна възраст.

Начало на слуховата увреда спрямо говорното развитие

Анализът на този показател е направен на база на анамнестичните данни от пациентите. И тук трябва да отбележим факта за субективната преценка и възприемането на гукането или лепетните думи като говор.

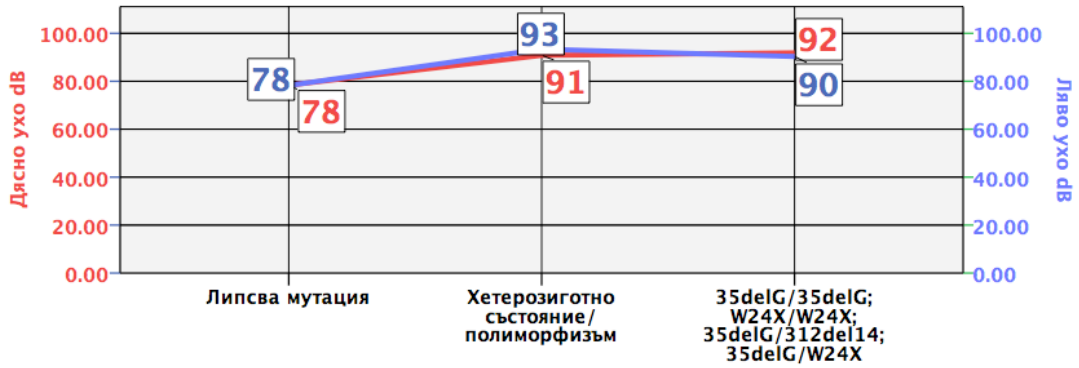
83% от пациентите с генетична Cx26 свързана слухова загуба съобщават за прелингвално начало, срещу 56.3% от тези без мутации в Cx26.

И при този показател установихме различия в зависимост от вида мутации. За прелингвално начало на слуховата увреда са съобщили 90.6% от пациентите с c.35delG/c.35delG, двамата комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 и 61.5% от p.W24X/p.W24X. (p=0.024)

Средна слухова загуба в dB

По литературни данни генетичната автозомно – рецесивна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 протича с тежко засягане на слуховата функция.

Резултатите, получени от изследването на слуховия праг на нашата популация, са представени на следната графика.



Фиг. 50 Средна слухова загуба в dB на дясно (в червено) и ляво (в синьо) ухо на изследваните 146 пациенти, разделени в зависимост от генетичните резултати

Средната слухова загуба на по – добре чуващото ухо при пациентите със слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 е 90.26dB, а при пациентите без мутации 76.44dB.

Установихме статистически значима връзка между наличието на мутации в гена на Cx26 и средната слухова загуба в dB на по – добре чуващото ухо ($p<0.05$) и липса на такава между пациентите с генетична слухова загуба и хетерозиготни мутации ($p=0.953$). One way ANOVA, Post Hoc Test

Табл. 14 Сравнение на средната слухова загуба в dB на по – добро чуващото ухо сред трите групи пациенти

Descriptives

Средна слухова загуба dB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Липсва мутация	80	76.4375	22.17813	2.47959	71.5020	81.3730	31.00	100.00
Хетерозиготно състояние/ полиморфизъм	19	90.5526	11.86603	2.72225	84.8334	96.2719	62.50	100.00
35delG/35delG; W24X/W24X; 35delG/312del14; 35delG/W24X	47	90.2553	12.43696	1.81412	86.6037	93.9069	41.00	100.00
Total	146	82.7226	19.56409	1.61914	79.5224	85.9228	31.00	100.00

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Средна слухова загуба dB

LSD

(I) MutNewCat	(J) MutNewCat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Липсва мутация	Хетерозиготно състояние/ полиморфизъм 35delG/35delG; W24X/W24X; 35delG/312del14; 35delG/W24X	-14.11513*	4.70036	***.003***	-23.4063	-4.8240
		-13.81782*	3.38488	***.000***	-20.5087	-7.1269
Хетерозиготно състояние/ полиморфизъм 35delG/35delG; W24X/W24X; 35delG/312del14; 35delG/W24X	Липсва мутация	14.11513*	4.70036	***.003***	4.8240	23.4063
	35delG/35delG; W24X/W24X; 35delG/312del14; 35delG/W24X	.29731	5.00705	***.953***	-9.6001	10.1947
	Липсва мутация	13.81782*	3.38488	***.000***	7.1269	20.5087
	Хетерозиготно състояние/ полиморфизъм	-.29731	5.00705	***.953***	-10.1947	9.6001

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

81.8% от пациентите с мутации в Cx26 (n=66) имат слухова загуба над 91 dB и само 53.9% от пациентите без мутации.

90.7% от хомозиготните с c.35delG/c.35delG, както и двамата комплексни хетерозиготи с генетична глухота c.35delG/c.312del14 и c.35delG/p.W24X, имат средната слухова загуба над 91dB, докато при p.W24X/p.W24X едва 61.6%. Използвайки теста One way ANOVA доказахме статистически значима връзка между вида мутация в GJB2, водеща до генетична глухота от увреда на Cx26 и средната слухова загуба на по – добре чуващото ухо (p=0.027).

В нашата популация пациентите с c.35delG/c.35delG имат по – тежко засягане на слуховата функция (mean=93.38dB) от носителите на p.W24X/p.W24X (mean=81.85dB). Средна слухова загуба над 94.58dB имат и хетерозиготните пациентите с c.35delG/WT.

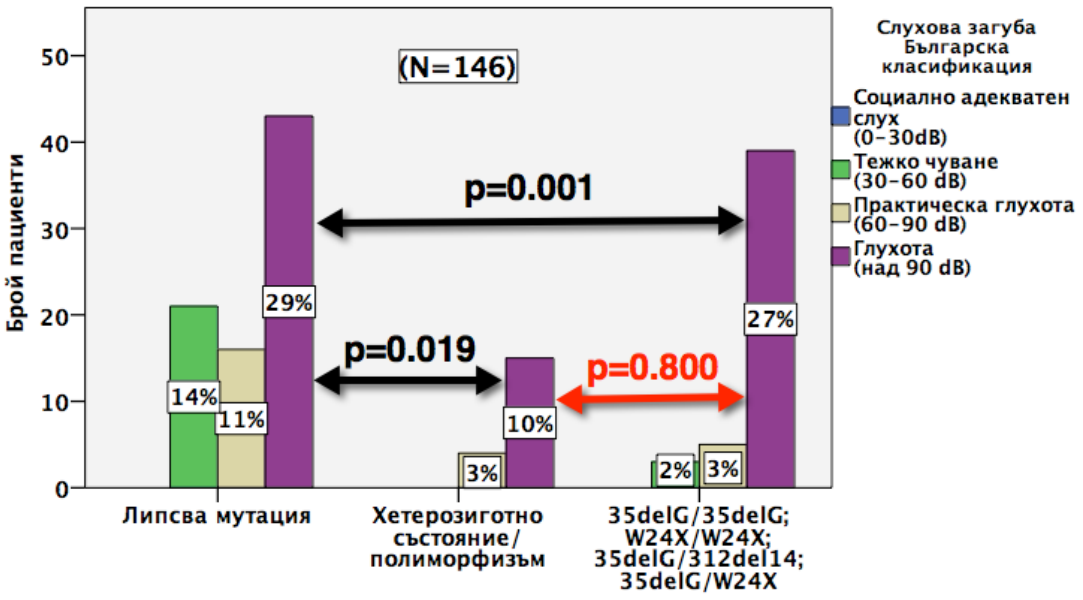
Тежест на слуховата загуба

В настоящето изследване при подбора на пациентите е използвана Българската класификация на слуховите увреди. Оказа се обаче, че тя е трудно приложима при съпоставка на получените резултати с данни от доклади на чужди автори. Липсва съответствие между отделните групи и наименованията им между Българската и Американската, Европейската класификации, дори и тази на СЗО. Анализът на тежестта на слуховата увреда се затрудни и от факта, че

различните автори в своите изследвания използват различни класификации, понякога даже без да се спомене коя точно. Това прави съпоставката между отделните проучвания неточна. Използването на единна класификация на слуховите увреди би улеснило анализа и предотвратило грешки в категоризирането на слуховата загуба.

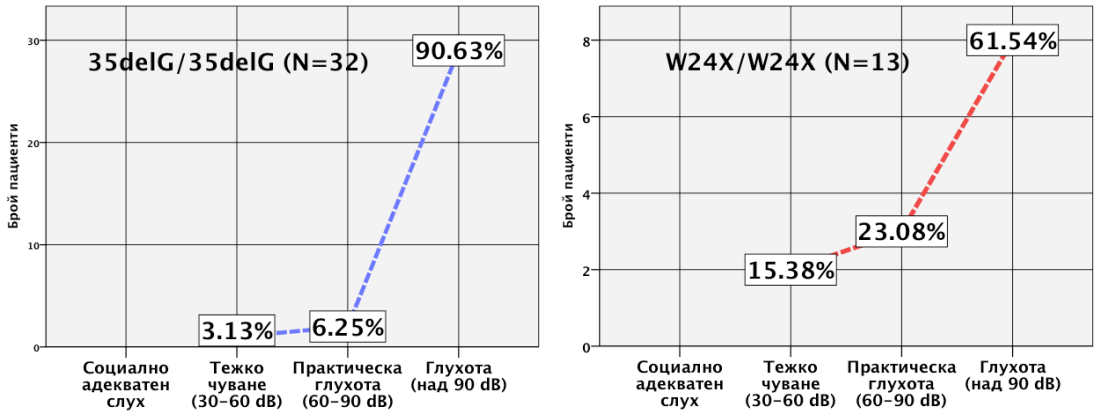
В представеното изследване тежестта на слуховата уреда е изчислена спрямо четирите посочени класификации, но за анализа и съпоставката с проучвания на чужди автори е използвана класификацията на Европейската работна група по генетични слухови увреждания (European Working Group on genetic hearing impairments), предвид естеството на настоящето изследване.

Използвайки Българската класификация доказахме статистически значима разлика в степента на слуховата увреда между пациентите с и без мутации в гена на Cx26 GJB2 (p=0.001 и p=0.019), докато между групите на хомозиготните и комплексните хетерозиготни пациенти и хетерозиготните такава разлика не се установява (p=0.800). Kruscal Wallis test



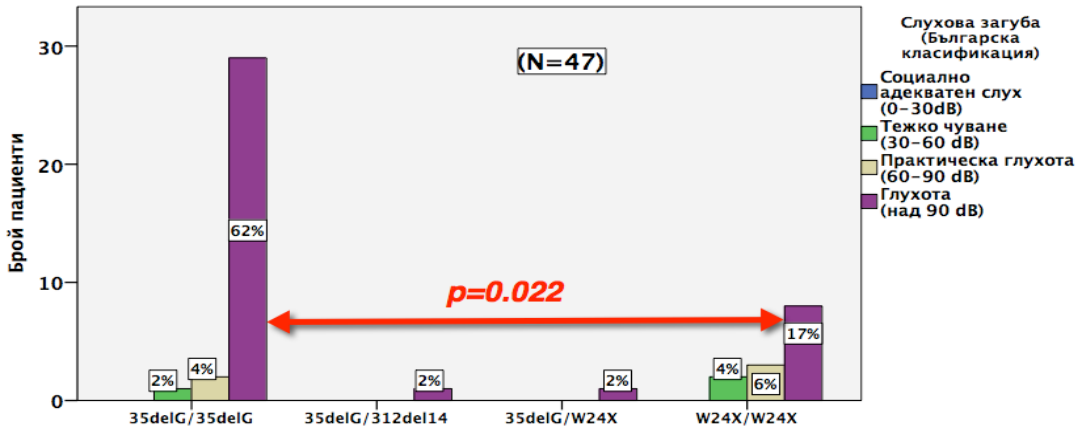
Фиг. 51 Ниво на слуховата загуба според Българската класификация

В нашето проучване 90% от пациентите с c.35delG/c.35delG и 61.54% от пациентите с p.W24X/p.W24X, както и двамата комплексни хетерозиготи съответно с c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 са с глухота.

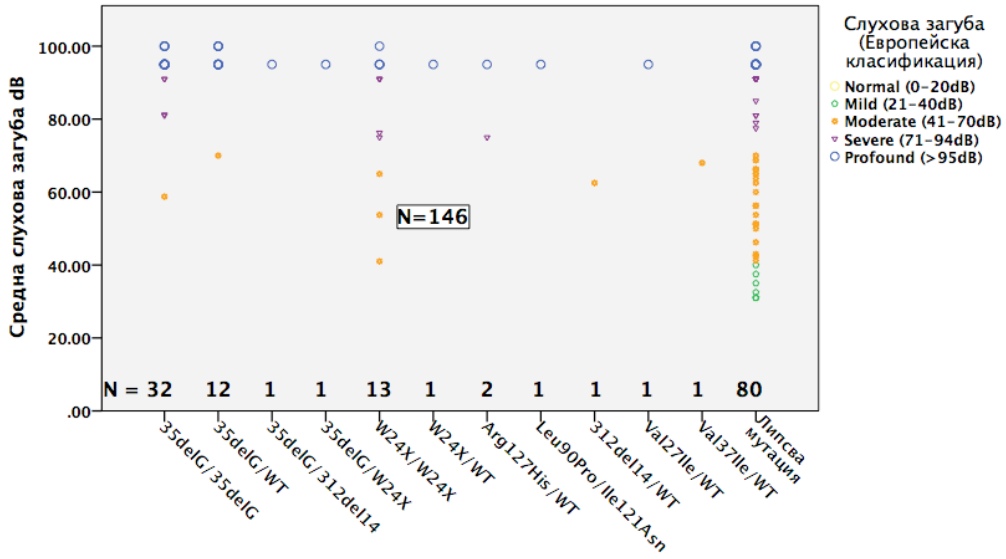


Фиг. 52 Разпределение на пациентите с c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X според нивото на слуховата увреда спрямо Българската класификация

Споменахме по – горе, че при нашите пациенти с c.35delG/c.35delG слуховата функция е засегната в по – тежка степен от p.W24X/p.W24X. Средната слухова загуба е съответно 93.38 и 81.85dB. Това обяснява и установената статистически значима разлика в степента на слухова увреда според Българската класификация (p=0.022).



Фиг. 53 Ниво на слуховата увреда според Българската класификация при нациентите с генетична несиндромна слухова загуба, резултат от промени в Cx26



Фиг. 54 Ниво и степен на слухова загуба според Европейската класификация на пациентите с доказани мутации в Cx26

И според класификацията на European Working Group on genetic hearing impairments получихме съпоставими резултати.

Табл. 15 Разпределение на пациентите с и без увреда в Cx26 спрямо тежестта на слухова загуба според European Working Group on genetic hearing impairments

Вид мутация в Cx26	*Слухова загуба*				*Общо*
	Mild (21-40dB)	*Moderate (41-70dB)*	*Severe (71-94dB)*	*Profound (>95dB)*	
c.35delG/c.35delG	0	1	4	27	32
c.35delG/c.312del14	0	0	0	1	1
c.35delG/p.W24X	0	0	0	1	1
p.W24X/p.W24X	0	3	5	5	13
p.Leu90Pro/p.Ile121Asn	0	0	0	1	1
c.35delG/WT	0	1	0	11	12
p.W24X/WT	0	0	0	1	1
p.Arg127His/WT	0	0	1	1	2
c.312del14/WT	0	1	0	0	1
p.Val27Ile/WT	0	0	0	1	1
p.Val37Ile/WT	0	1	0	0	1
Липсва мутация	7	25	18	30	80
Общо:	7	32	28	79	146

Установихме статистически значима разлика в тежестта на слуховата увреда между пациентите с генетична слухова загуба резултат от увреда на Cx26 и пациентите без мутации в GJB2 според Европейската класификация (p=0.000). При 91.5% от първата група слуховата загуба е тежка към дълбока (severe to profound), а от втората едва при 60%. Лека слухова загуба (mild) не установихме при нито един пациент с увреда в Cx26.

В групата на c.35delG/c.35delG 96.9% са с тежка към дълбока слухова загуба (severe 12.5% to profound 84.4%). Близки резултати (94%) са получени и от Sansovic et al. при изследване на пациенти от Хърватия с несиндромна слухова загуба.(119) Само един (3.1%) от нашите пациенти от тази група е с умерена (moderate) слухова загуба от 58.75dB. В проучване на Cryns 63% от пациентите са с дълбока (profound), 29% са с тежка (severe), умерена (modearte) 8% и лека (mild) <1% слухова загуба. (90)

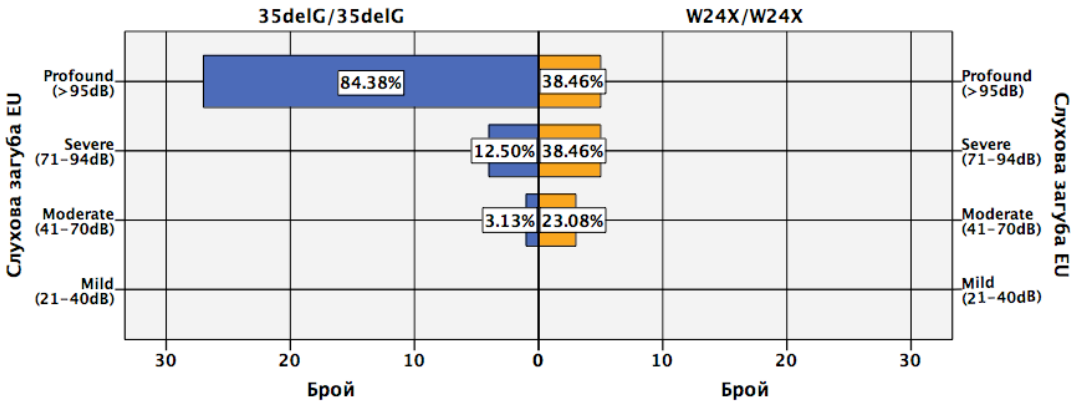
От носителите само на един мутантен алел c.35delG/WT 91.7% (11/12) също са с дълбока слухова загуба (profound). Само един е с умерена слухова загуба (moderate).

И трите комплексни хетерозиготни пациенти c.35delG/p.W24X, c.35delG/c.312del14 и p.Leu90Pro/p.Ile121Asn са с дълбока слухова загуба (profound).

В изследваната популация алелът c.35delG, независимо дали е в хомозиготно, хетерозиготно състояние или като комплексен хетерозигот, в 87% води до дълбока слухова загуба (profound), 8.7% тежка (severe) и само в 4.2% до умерена (moderate).

Не беше установена статистически значима разлика в степента на слуховата увреда според Европейската класификация между хомозиготните и хетерозиготните за c.35delG (p=0.363).

Установихме статистически значима разлика в степентта на слухова увреда между c.35delG и p.W24X (p=0.002). 38.46% (5/13) от p.W24X/p.W24X са с дълбока и също толкова са с тежка слухова загуба. 23.01% (3/13) са с умерена.



Фиг. 55 Сравнение на степента на слуховата загуба според класификацията на European Working Group on genetic hearing impairments при двете хомозиготни мутации c.35delG и p.W24X в изследваната популация

Симетричност на слуховата увреда

По данни на European Working Group on genetic hearing impairments разлика >10dB между прага на слуха на двете уши най – малко за две честоти определя слуховата загуба като асиметрична.

В нашата популация наличието на мутации или полиморфизми в GJB2 води до симетрично засягане на слуха на двете уши, изразено чрез Paired Samples Test (p=0.692) При 93.9% от тези пациенти средната слухова загуба на двете уши е <10dB.

Табл. 16 Симетричност на слуховата увреда при пациентите с увреди в Cx26

Paired Samples Test

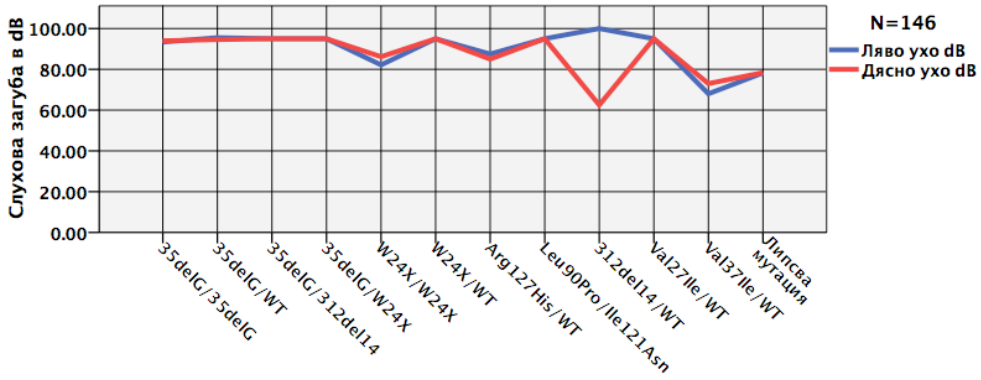
N=66	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Средна слухова загуба Дясно ухо dB – Ляво ухо dB	.33712	6.87533	.84629	-1.35305	2.02729	.398	65	.692

Асиметрична слухова загуба установихме при пациента с c.312del14/WT, с разлика между двете уши от 37.5dB. При двама

пациенти с p.W24X/p.W24X слуховата загуба също е асиметрична с разлика между двете уши съответно 21 и 25 dB. От пациентите с c.35delG/c.35delG само един е с асиметрична слухова загуба от 18 dB.

Подобни резултати обаче, получихме и при пациентите без мутации в GJB2 (p=0.874), както и тези с генетична глухота c.35delG/c.35delG (p=0.325) и p.W24X/p.W24X (p=0.127) Paired Samples test. При всички комплексни хетерозиготи за Cx26 е налице симетрична слухова загуба.

В случая симетричността на слуховата увреда не е решаващ фактор за поставянето на диагнозата генетична глухота на базата на данни от нашата популация, но е важна част от характеристиката й.



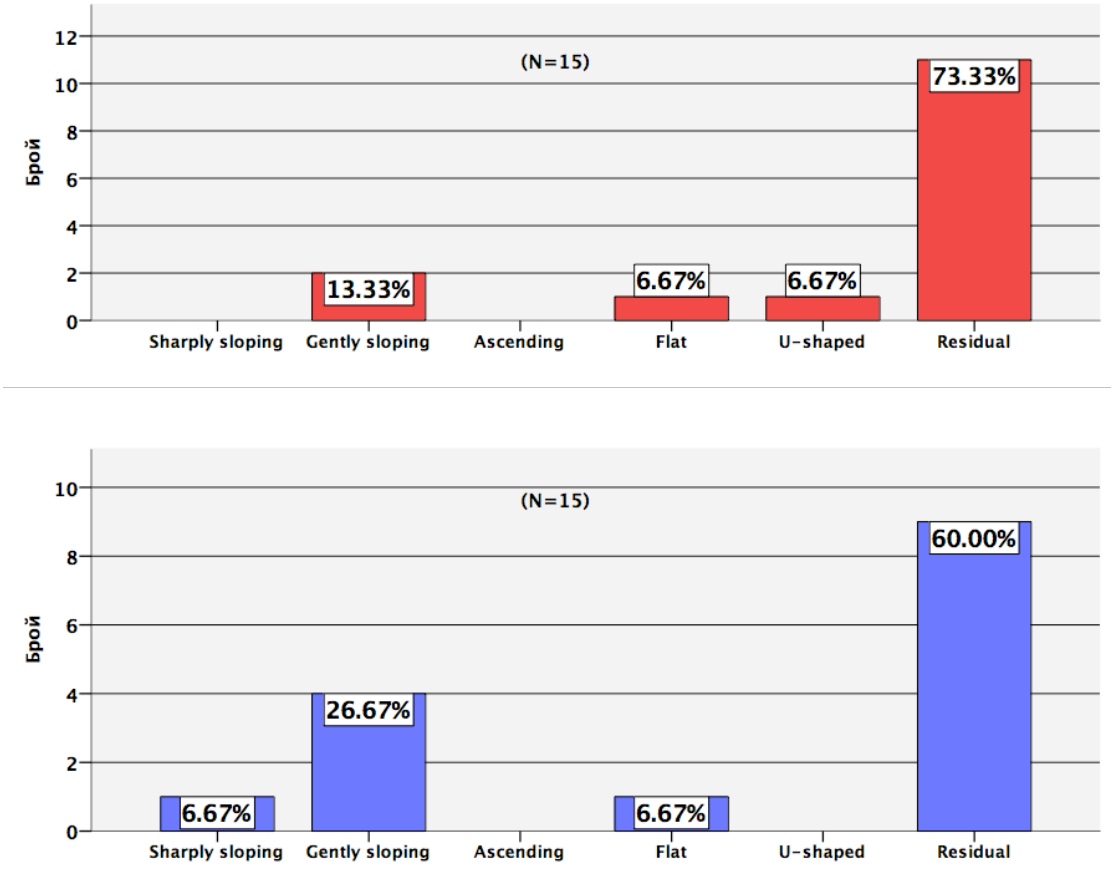
Фиг. 56 Слухова загуба в dB за лявото (в синьо) и дясното (в червено) ухо при всички изследвани пациенти. Най – голяма асиметрия между двете уши се установява при пациента с c.312del14/WT (37.5dB).

Вид аудиометрична крива

От всичките 47 пациенти с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26, при 15 минималният слухов праг се установи чрез тонална прагова аудиометрия. При останалите 32 (68.09%), поради възрастта на пациентите и невъзможността да се

използва детската игрова аудиометрия, се направиха слухови стволови евокирани потенциали.

Анализирайки резултатите на 15 – те пациенти (общо 30 уши) според класификацията на Liu и Xi установихме, че най – често срещаният тип аудиометрична крива е ъглова, с остатъчен слух 66.67% (20 уши), следвана от плавно спускащата се за високите честоти 20% (6 уши), плоска 6.67% (2 уши), стръмно спускаща се за високите честоти и U – образна с по 3.34% (по едно ухо).



Фиг. 57 Разпределение на пациентите с увреда на Cx26 в зависимост от вида на аудиометричната крива според класификацията на Liu и Xi. Дясно ухо в червено, ляво ухо в синьо

Установихме, че при 66.7% (10/15) от пациентите с генетична слухова загуба, резултат от увреда на Cx26, аудиометричните криви

от тоналната прагова аудиометрия са симетрични за двете уши, като засягането на слуха е предимно за сметка на високите честоти.

При 48 пациенти (96 уши) без мутации в Cx26 нивото на слуховия праг се установи с ТПА. Най – честата аудиометрична крива и тук е с остатъчен слух (residual), но само при 32.3% (31 уши). Следват U – образни аудиометрични криви (21.85%, 21 уши), стъмно спускащи се за високите честоти (14.6%, 14 уши), плоски (12.5%, 12 уши), плавно спускащи се за високите честоти (11.45%, 11 уши), възходящи (с намаление предимно за ниските честоти – 5.25%, 5 уши), некласифируеми (2.1%, едно ухо със зъбец на 4000Hz и едно с намаление за ниските и високите честоти и норма за средните).

Табл. 17 Вид и честота на аудиометричните криви при пациентите с и без увреда в Cx26

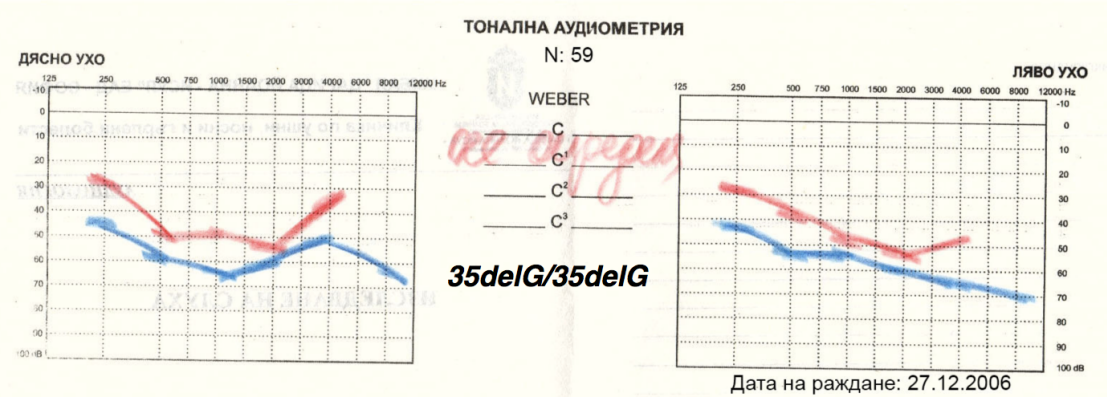
Вид аудиометична крива	***Пациенти с Cx26 свързана СЗ (n=15, 30 уши)***	***Пациенти без увреда в Cx26 (n=48, 96 уши)***
Residual	66.67% (20 уши)	32.3% (31уши)
Sharply sloping	3.34% (1 ухо)	14.6% (14 уши)
Gently sloping	20% (6 уши)	11.45% (11 уши)
Ascending	-	5.25% (5 уши)
Flat	6.67% (2 уши)	12.5% (12 уши)
U – shaped	3.34% (1 ухо)	21.85% (21 уши)
Unclassified	-	2.1% (2 уши)

c.35delG

На 78.1% (25/32) от носителите на хомозиготната мутация c.35delG са направени ССЕП, а при останалите 21.9% (7/32) тонална прагова аудиометрия. От кривите от ТПА на тези 7 пациенти или 14

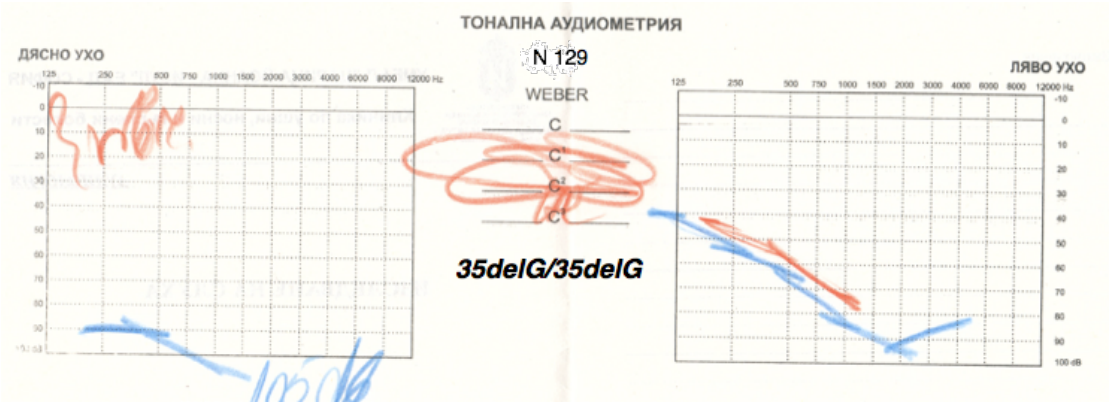
уши най – често срещаният тип е с остатъчен слух (residual) 85,7% (12 уши), U – образна (7,15%) и плавно спускаща се за високите честоти (gently sloping) (7,15%). Последните две аудиометрични криви се установиха при при един и същи пациент. Той е единственият с тежко чуване (средна слухова загуба 58.75dB) и не съобщава за прогресия на слуховата увреда.

На следващата фигура е представена е тоналната прагова аудиометрия на този пациент – българка, хомозиготна носителка на c.35delG. Само при нея началото на слуховата увреда е от около 3 годишна възраст.



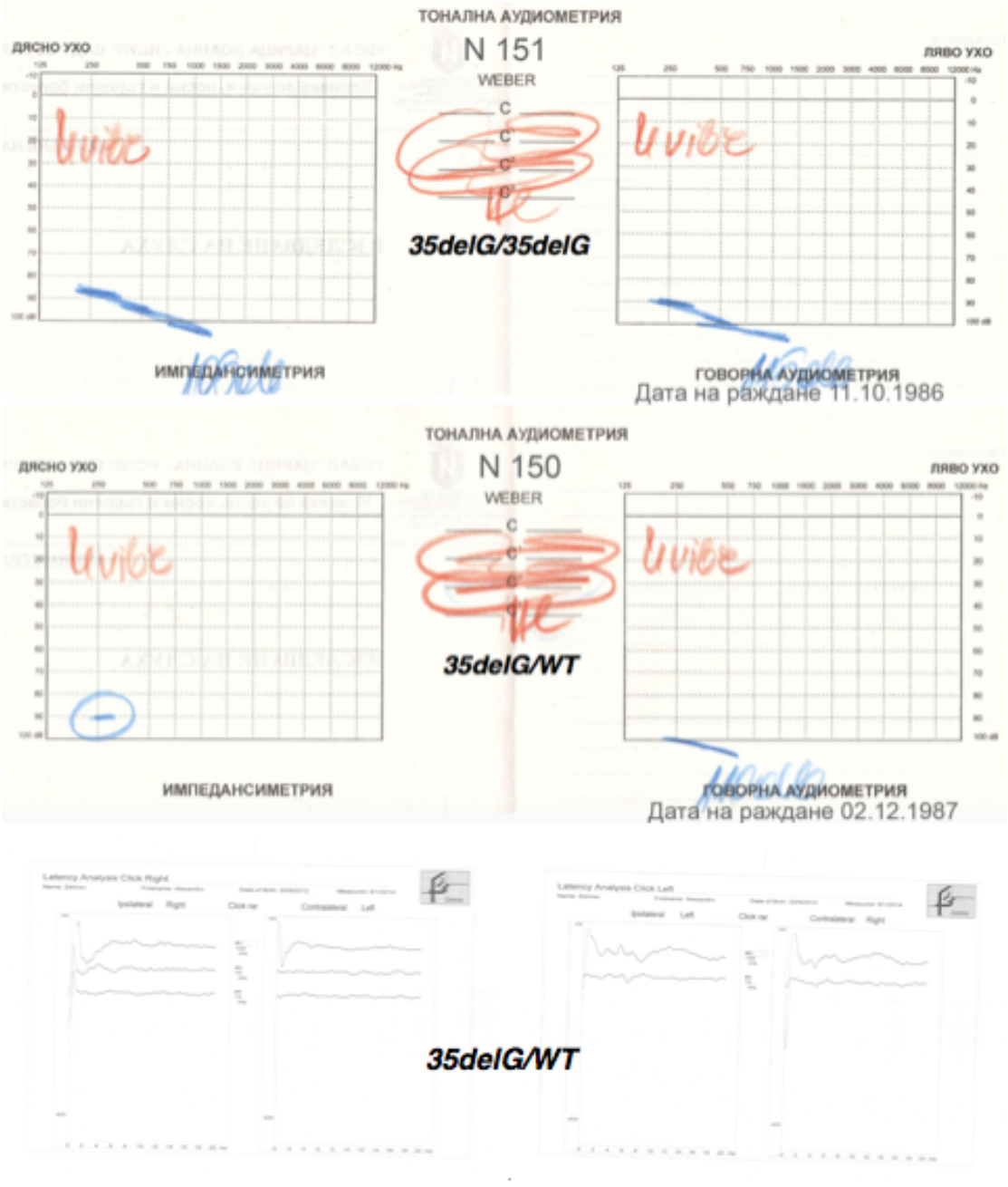
Фиг. 58 Тонална прагова аудиометрия на пациентка от български произход с c.35delG/c.35delG

На следващата фигура е представена тоналната прагова аудиометрия на пациент с български произход с хомозиготната мутация c.35delG. Началото на слуховата увреда е около една годишна възраст.



Фиг. 59 Тонална прагова аудиометрия на пациент с c.35delG/c.35delG

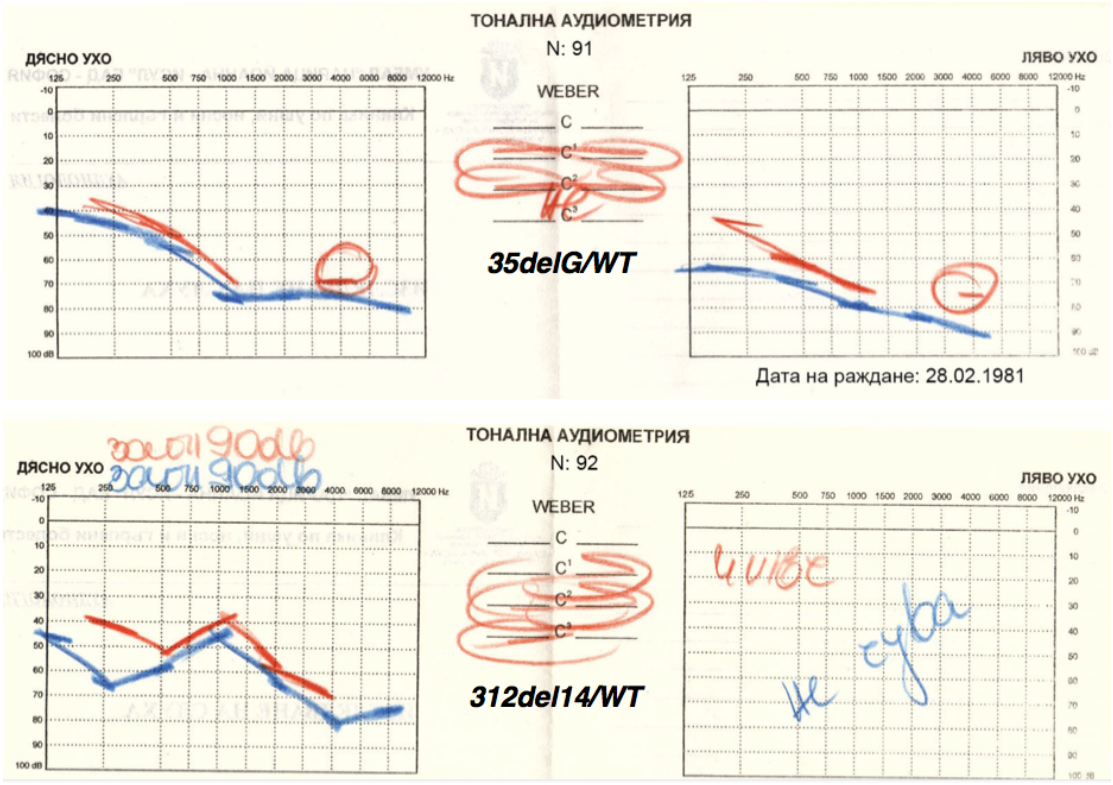
Интересни резултати се получиха при българско семейство. Бащата (№ 150) и детето (№ 149) са хетерозиготни за мутацията c.35delG, а майката (№ 151) е хомозиготна. И тримата са със слухова загуба над 90dB, като увреждането е още от раждането. Почти всички родственици в двата рода са с увреден слух. В това семейство се установи генетична причина за глухотата само при майката. Най – вероятно и при бащата и детето ще се докаже това, но при изследване на други гени. В GJB6 гена, кодиращ Cx30 не се откриха делеции.



Фиг. 60 ТПА на мъж с c.35delG/WT (№ 150) и жена с c.35delG/c.35delG (№ 151) и ССЕП на тяхното дете с c.35delG/WT (№ 149). Обянения в текста.

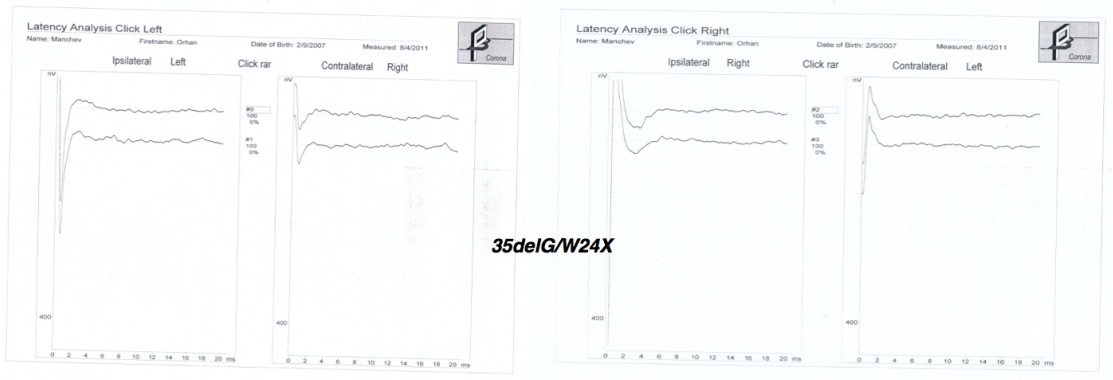
В друго българско семейство (№ 91, 92, 93) от двама родители с тежка слухова загуба и глухо дете генетичният анализ доказа мутации и при трима. Бащата (№ 91) и детето (№ 93) са носители на един мутантен алел c.35delG. Майката (№ 92) е с c.312del14/WT. И при трима увреденият слух датира от раждането. Въпреки установените мутации, генетичната причина за слуховите увреди в

това семейство не можа да се установи. Най-вероятно са налице мутации и в други гени, отговорни за увредения слух.



Фиг. 61 Тонална прагова аудиометрия на мъж и жена с български произход, носители съответно на c.35delG/WT и c.312del14/WT

При дете от ромски произход с глухота, датираща от раждането и глухоняма майка, беше установен комплексният хетерозиготен вариант c.35delG/p.W24X. Тези промени в Cx26 водят до генетична глухота при него.

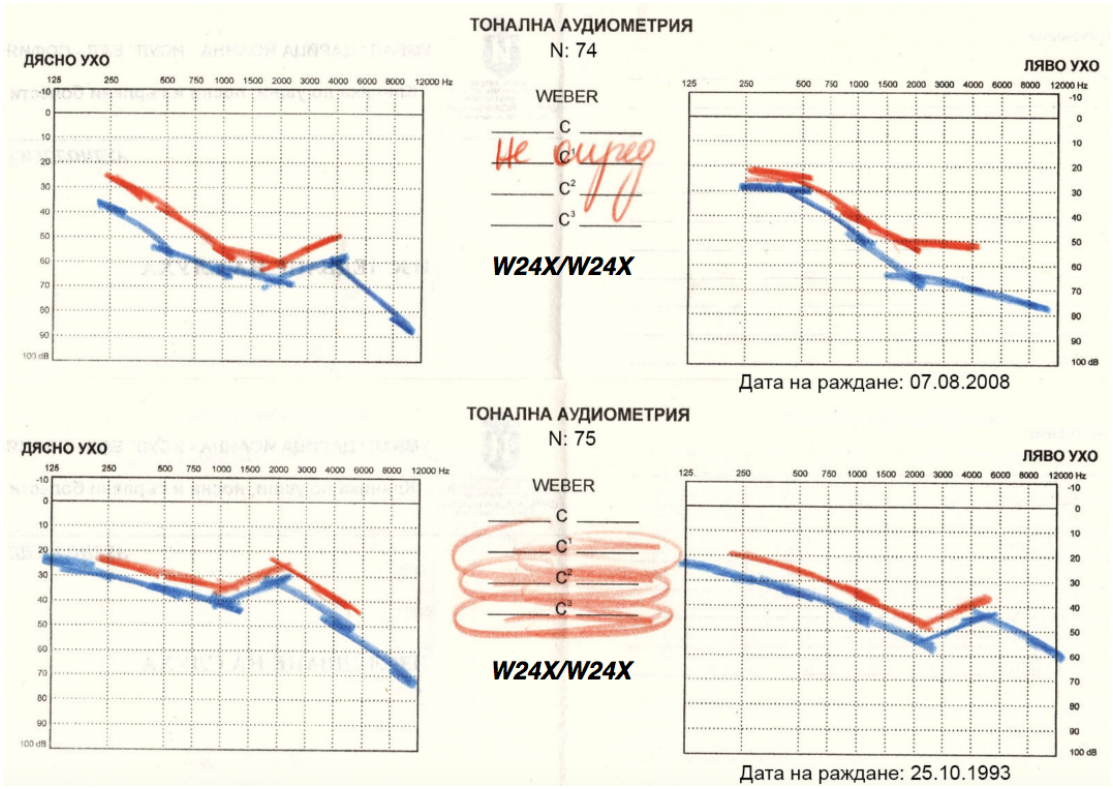


Фиг. 62 ССЕП на момче от ромски произход с c.35delG/p.W24X

p.W24X

При 38.46% от пациентите с p.W24X/p.W24X (5/13) слуховият праг се диагностицира със ССЕП, а при останалите 61.5% (8/13) с тонална прагова аудиометрия. От тези 8 пациенти (16 уши) 50% (8 уши) са с аудиометрична крива, показваща остатъчен слух (residual), 31.25% (5 уши) са с плавно спускаща се за високите честоти (gently sloping), плоска при 12.5% (2 уши) и при 6.25% (едно ухо) е стръмно спускаща се за високите честоти (sharply sloping).

При две момичета първи братовчедки от ромски произход с умерена слухова загуба открихме мутацията p.W24X/p.W24X. При № 74 началото на слуховата загуба е от 4 годишна възраст, при № 75 от около 10 годишна възраст. Следващата фигура показва нивото на слуховата им увреда .

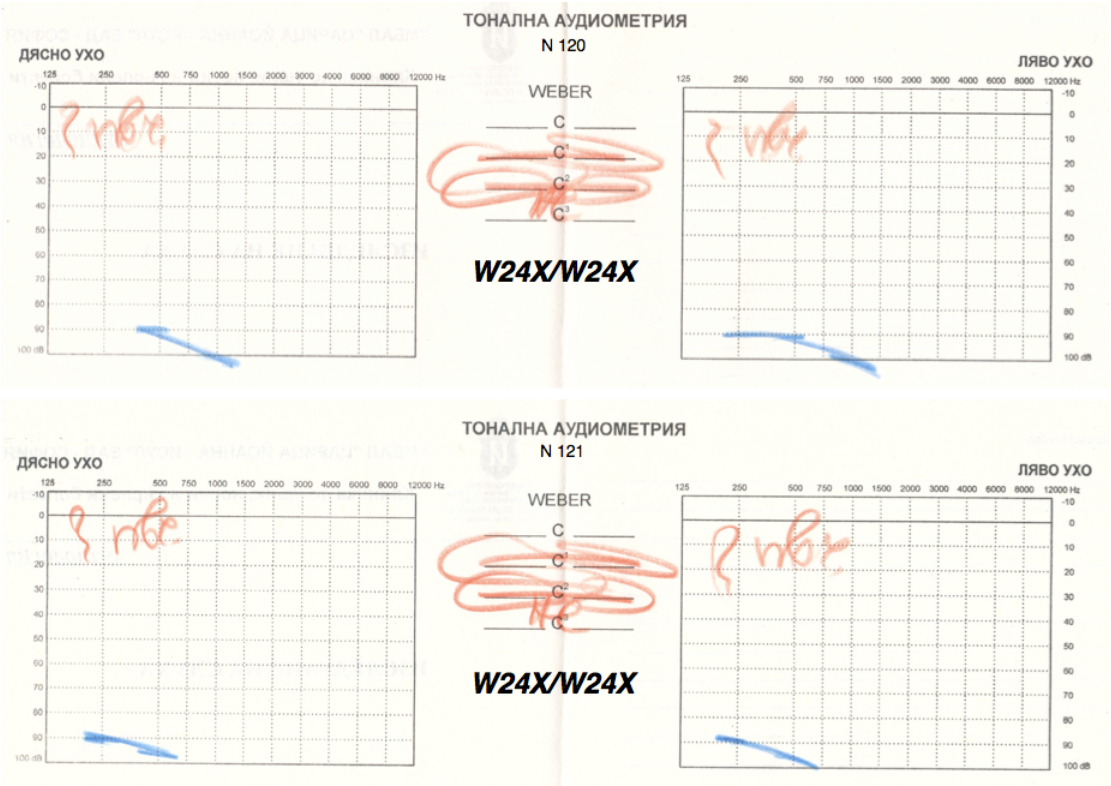


Фиг. 63 Тонална прагова аудиометрия на две момичета от ромски произход с p.W24X/p.W24X

При изследването на друго ромско семейство беше установено, че причината за глухотата и на трите им деца е именно

увреда на Cx26 – хомозиготната мутация p.W24X. При две от децата началото на увредения слух е от раждането (№ 120, 121), а при третото (№ 119) след 1 годишна възраст.

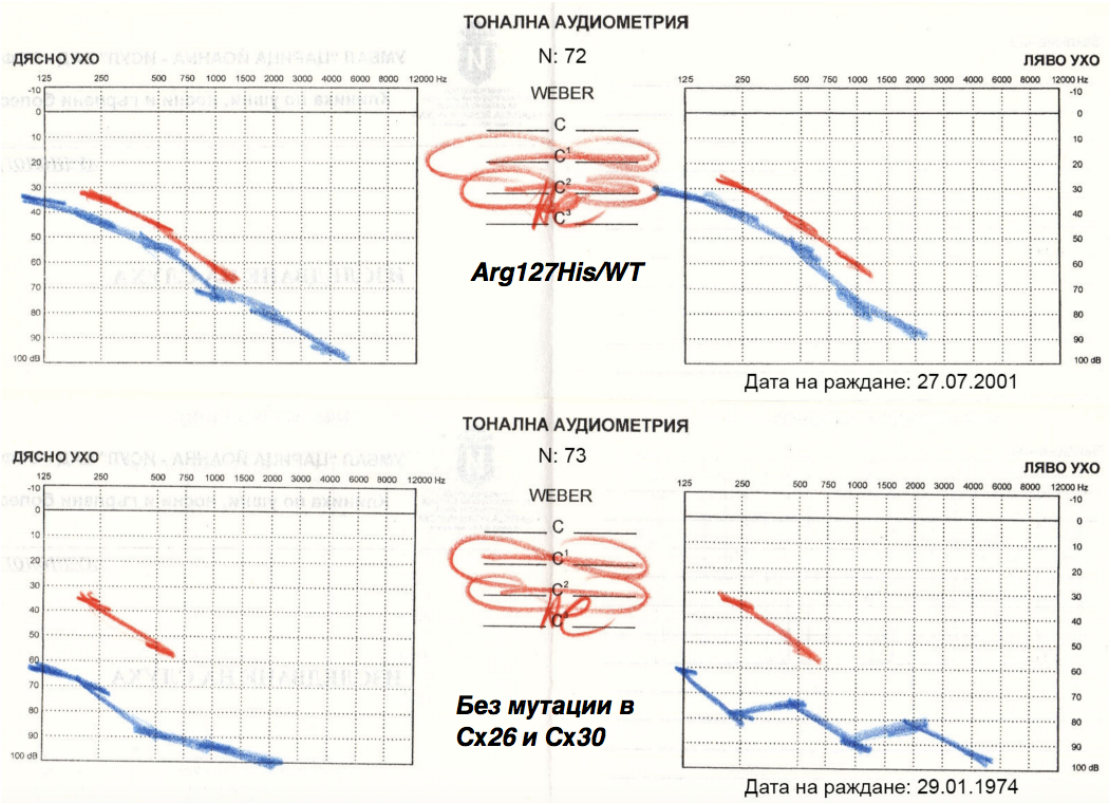
Анализът на резултатите от тоналната прагова аудиометрия показва, че и при двата алела c.35delG и p.W24X в хомозиготно състояние аудиометричната крива е или с остатъчен слух или плавно спускаща се за високите тонове.



Фиг. 64 Тонална прагова аудиометрия на брат (№ 120) и сестра (№ 121) от ромски произход с p.W24X/p.W24X

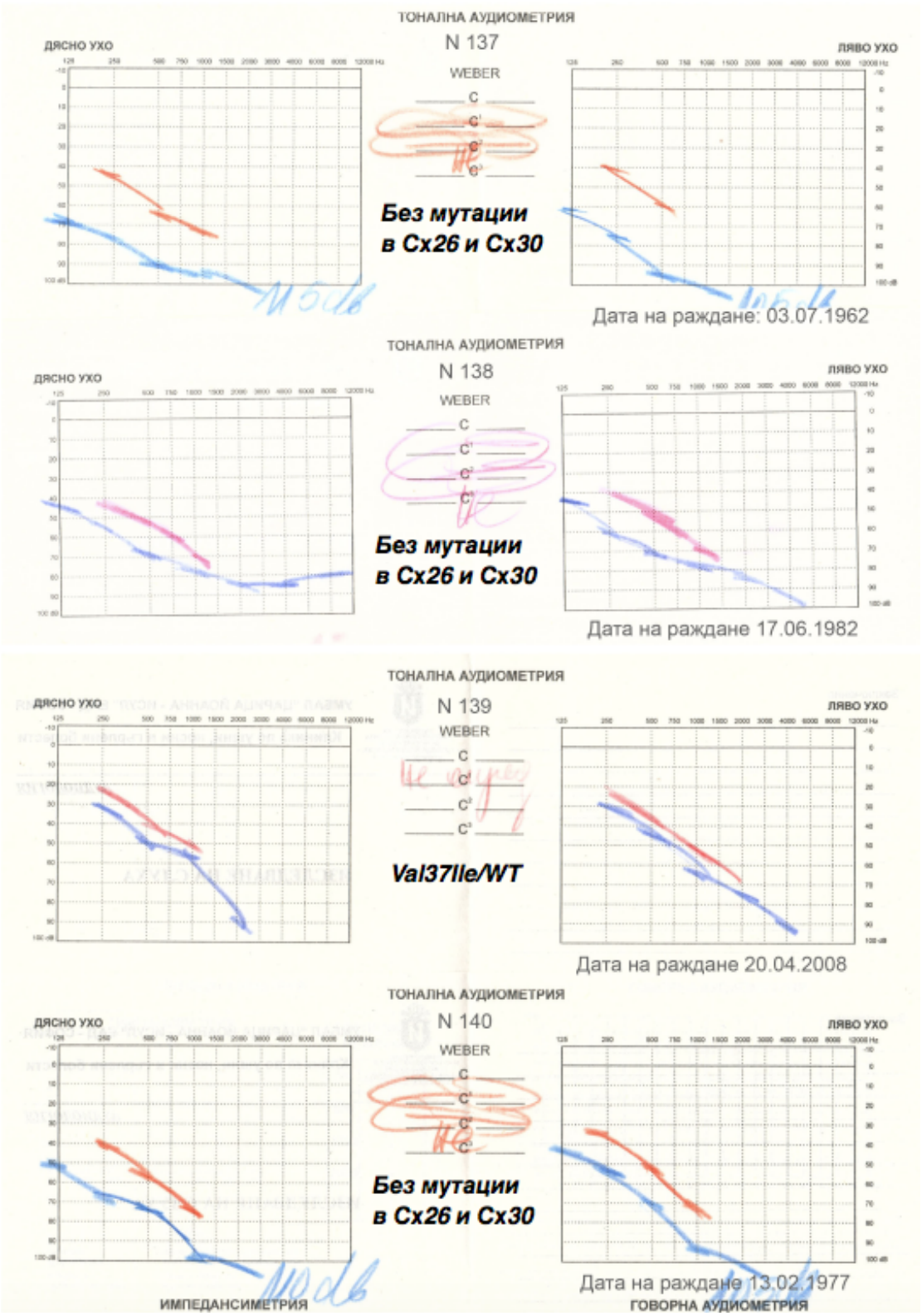
Една от рецесивните мутации p.Arg127His бе открита в хетерозиготно състояние в пациент от ромски произход с тежка слухова загуба и начало около 9 годишна възраст (№ 72). Вероятно този пациент е носител на рецесивна мутация в друг ген. Анализът за носителство на делеции в GJB6 не доведе до откриване на втора мутация. Тъй като генетичната причина за възникналото увреждане на слуха не бе открита, трябва да продължи с изследване на други гени. Майката на този пациент също е с намален слух с

постлингвално начало (№ 73), но генетични промени в Cx26 и Cx30 при нея не се установиха.



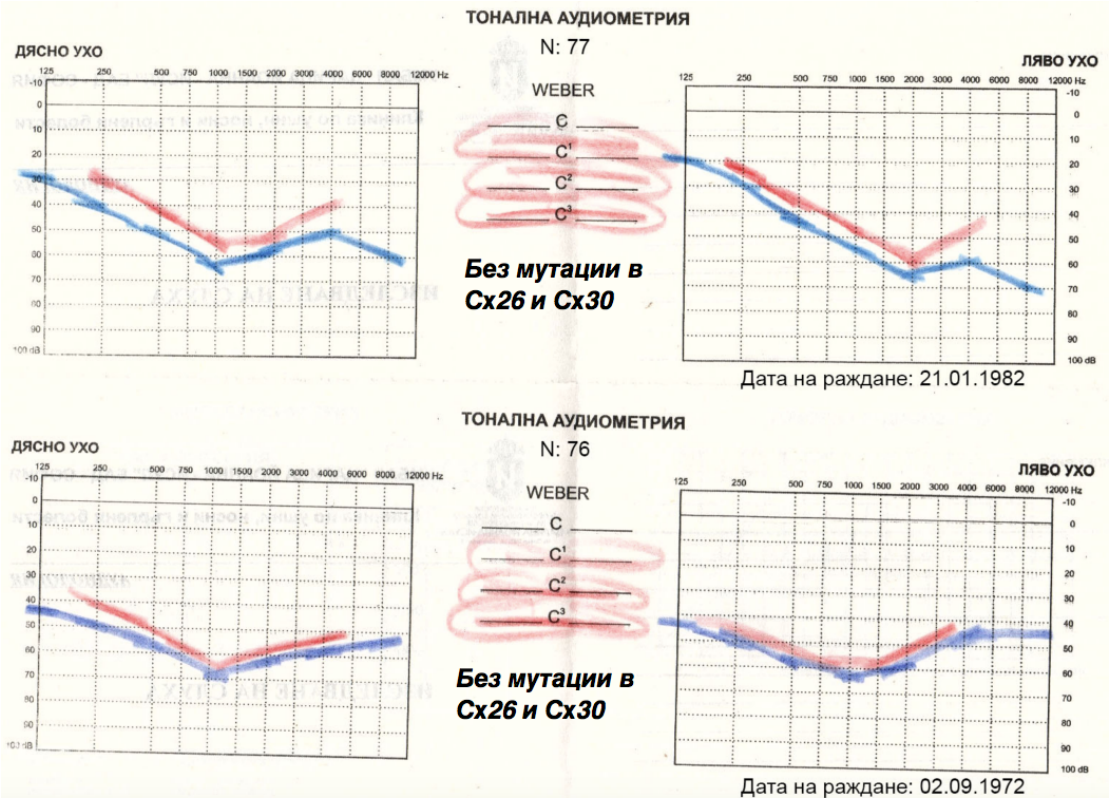
Фиг. 65 Тонална прагова аудиометрия на майка (№ 72) и син (№ 73) с несиндромна слухова загуба. Обяснения в текста.

В друго българско семейство изследвахме пет пациента с увреден слух (№ 137, 138, 139, 140, 141). Трима от тях са с глухота, а другите двама с практическа глухота. При двама намалението на слуха е от раждането, при други двама е настъпило до петата година и при един около 15 годишна възраст. В това семейство четири поредни поколения са със увреден слух, но само при един от изследваните пациенти (№ 139) се доказа мутацията p.Val37Ile в хетерозиготно състояние. Тя обаче не е отговорна за слуховото увреждане. В случая става въпрос най – вероятно за доминантна форма на унаследяване на слуховата увреда. Необходимо е да се изследват и други гени, отговорни за глухотата, за да се докаже генетичната причина в това семейство.



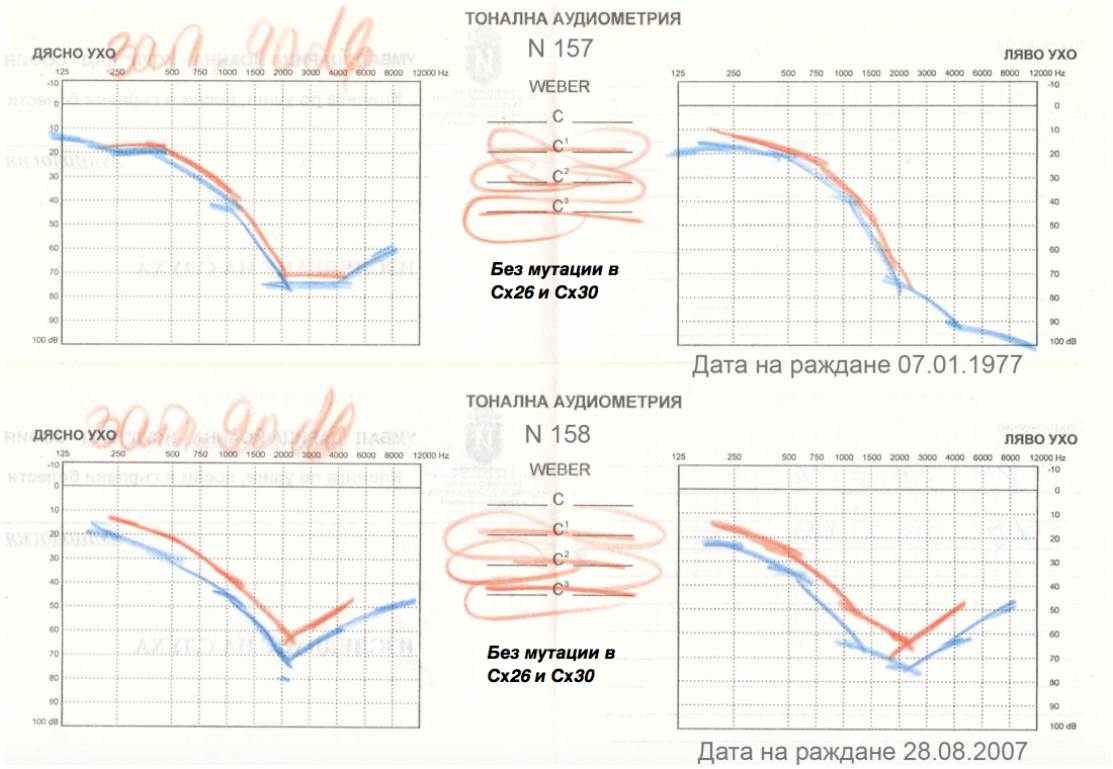
Фиг. 66 Тонални прагови аудиометрии на семейство от пациенти с намален слух. При № 139 е открита мутацията p.Val37Ile/WT

При две сестри от български произход (№ 77, 78) не установихме промени в Cx26 и Cx30. Слуховата увреда и при двете е постлингвална и е с начало до 10 годишна възраст.



Фиг. 67 Тонална прагова аудиометрия на две сестри с български произход без установени мутации и/или полиморфизми в Cx26 и Cx30

От изследването на майка (№ 157) и дъщеря (№ 158) с български произход и тежко чуване също не установихме мутации в Cx26 и Cx30. Слуховата увреда и при двете е постлингвална, като при майката започва около пубертета, докато при детето към 5 – годишна възраст.

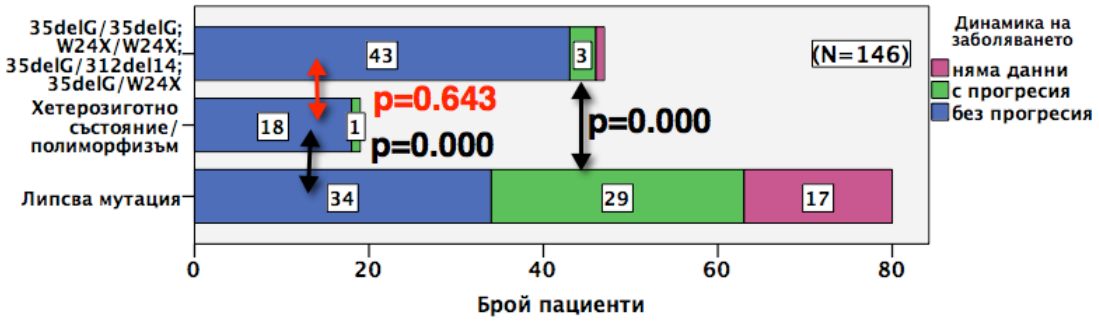


Фиг. 68 Тонална прагова аудиометрия на майка (№ 157) и дъщеря (№ 158) без установени промени в Cx26 и Cx30

Протичане на заболяването

В настоящето изследване протичането на заболяването – с или без прогресия – беше интерпретирано на базата на амнестичните данни от пациентите. Събраната база данни може да бъде допълнена и интерпретирана в бъдеще, поради продължаващото проследяване на пациентите.

Констатирахме статистически значима разлика в протичането на заболяването между пациентите с и без мутации в GJB2 (p=0.000) и липса на такава между пациентите с хомо – и хетерозиготни мутации (p=0.643). 91.49% от пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 съобщават за липса на прогресия в заболяването, докато при пациентите без мутации в Cx26 само 42.5%.



Фиг. 69 Протичане на заболяването при пациентите с и без мутации и/или полиморфизми в Cx26

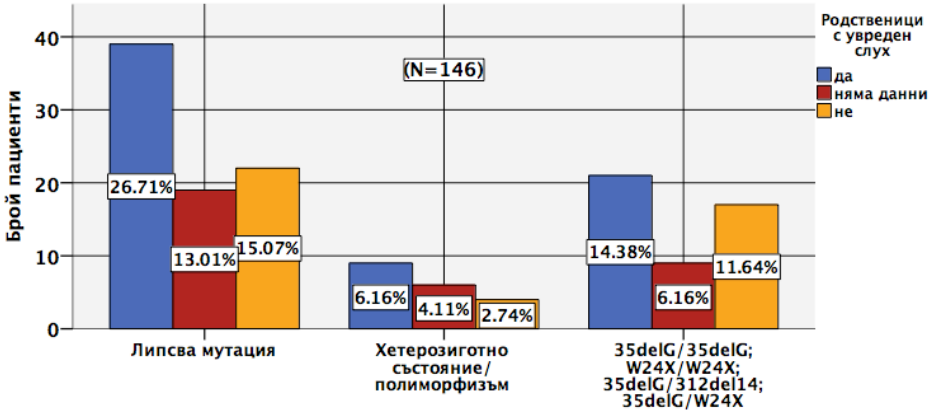
Интересни резултати се получиха и при анализа на групата пациенти с генетична Cx26 слухова увреда. 96.9% (31/32) от пациентите с c.35delG/c.35delG, 76.9% (10/13) от p.W24X/p.W24X, както и двамата комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 съобщават, че няма прогресия или флуктуация в слуховата загуба. Налице е статистически значима разлика и в протичането на заболяването между хомозиготните носители на c.35delG и p.W24X (p=0.018).

Статистичеки значима разлика в протичането на заболяването се установява и между пациентите с двете хомозиготни мутации в Cx26 – c.35delG и p.W24X (p=0.018).

В 96.9% (31/32) от пациентите с c.35delG/c.35delG, двамата хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 и 76.9% (10/13) от p.W24X/p.W24X съобщават, че няма прогресия или флуктуация в слуховата загуба.

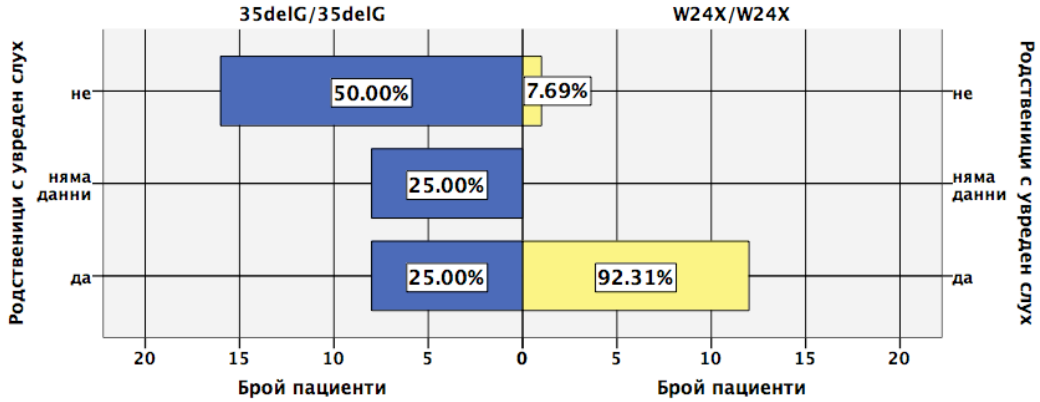
Родственици с увреден слух

Наличието на родственици с увреден слух не е задължителен елемент в клиничната характеристика на несиндромната автозомно – рецесивна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 за нашата популация. (p=0.930).



Фиг. 70 Наличие на родственици с увреден слух сред трите групи в нашето изследване

Не такива са резултатите обаче, при съпоставяне на двете групи хомозиготни пациенти с генетична Cx26 слухова загуба (p=0.000). Докато 92.31% от пациентите с p.W24X/p.W24X съобщават, че имат други членове в семействата си с намаление на слуха, то при 75% от пациентите с c.35delG/c.35delG отричат или нямат точни данни за това.



Фиг. 71 Наличие на родственици с увреден слух при пациентите с c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X

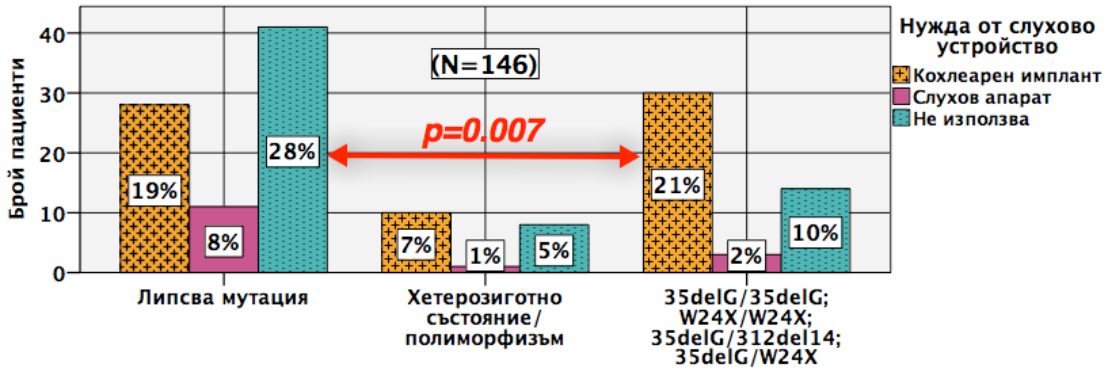
Хомозиготната рецесивна мутация в GJB2 в пробанда предполага 50% вероятност останалите братя и сестри да са

носители на един мутантен алел, но без намаление на слуха (без клинична изява) и 25% вероятност да са здрави.

Използване на кохлеарен имплант или слухов апарат

Тежкото засягане на слуховата функция при несиндромната слухова загуба, поради увреда на Cx26 предполага и употреба в по – голям процент на слухови апарати и кохлеарни импланти.

В изследваната популация се доказа статистически значима разлика между пациентите със и без увреди в Cx26 (p=0.007) по отношение на нуждата от употреба на кохлеарен имплант или слухов апарат. Такава разлика, обаче не се установи между хетерозиготните и хомозиготните за Cx26 мутации (p=0.634).

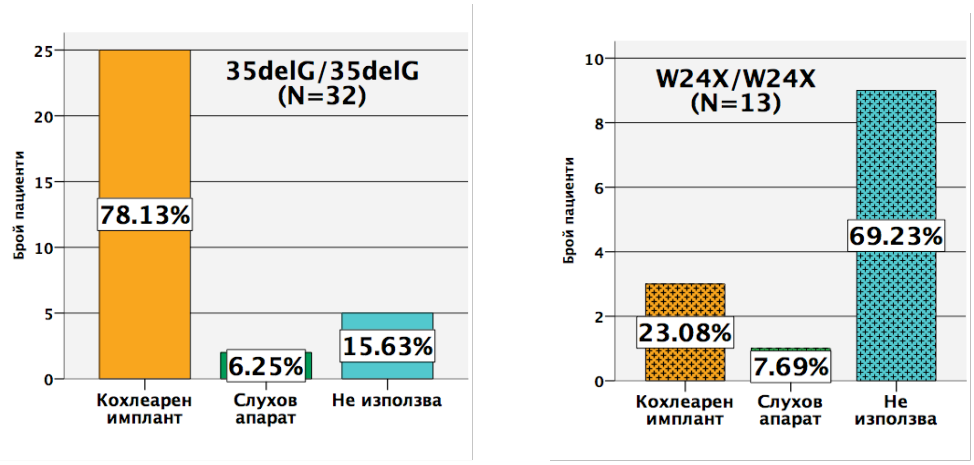


Фиг. 72 Употреба на слухов апарат или кохлеарен имплант сред трите групи изследвани пациенти

Разликата в тежестта на слуховата увреда между двете групи пациенти с хомозиготни мутации в Cx26 води и до различия в необходимостта от използване на слухов апарат и кохлеарен имплант.

По – тежкото засягане на слуха при пациентите с c.35delG/c.35delG очаквано довежда до по – висок процент употреба на кохлеарни импланти (78.13%), докато при пациентите с p.W24X/p.W24X 69.23% не използват нито кохлеарен имплант, нито слухов апарат. Това може да се обясни освен с по – лекото засягане

на слуховата функция при p.W24X/p.W24X (едва 38.5% са със средна слухова загуба над 95dB, за разлика от 78.1% при c.35delG/c.35delG), но и с факта, че тези пациенти са от ромски произход и въпреки тежестта на слуховата увреда повечето са отказали предложените им слухов апарат или кохлеарен имплант.



Фиг. 73 Употреба на кохлеарен имплант или слухов апарат при пациенти с хомозиготни мутации c.35delG и p.W24X

Б. Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30

Поради факта, че в изследвания от нас контингент не се установиха генетични промени в Cx30, не сме в състояние да направим клинико – генетични корелации за несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30. Това обаче ни дава основание да предположим ниска честота на мутации в GJB6 гена за българската популация. Изследването на по – голям брой пациенти би допринесло за изясняване на това.

Клинична характеристика и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30

Пълна клинична характеристика и аудиологичен профил на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 в изследваната популация

От анализа на клиничните и генетични изследвания, както и от клинико – генетичните корелации можем да заключим следното:

Несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 засяга и двата пола.

Алелът c.35delG се среща при българи, турци и пациенти от смесен брак (но с един родител българин), а p.W24X само при роми.

Докато мутацията c.35delG/c.35delG е почти равномерно разпределена на територията на нашата страна, като челно място заема София – град, то p.W24X/p.W24X се среща предимно в София – град, София – област, Плевен, Габрово, Перник и Сливен.

Характерно е ранно начало на слуховата увреда, като при повече от половинта от случаите тя е вродена, а при останалите започва най – късно до 10 годишна възраст. При c.35delG/c.35delG, както и при комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 се проявява най – късно до 2, а при p.W24X/p.W24X до 6 годишна възраст.

Въпреки ранното началото на слуховата увреда, средната възраст на поставяне на диагнозата е чак около 24.5 месеца.

Слуховата загуба е предимно с прелингвално начало, като това е по – характерно за c.35delG/c.35delG (90.6%) и за комплексните хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14. За p.W24X/p.W24X слуховата увреда е прелингвална при 61.5%.

Средна слухова загуба на по – добре чуващото ухо е 90.26dB, като пациентите с c.35delG/c.35delG (mean=93.38dB), c.35delG/c.312del14 и c.35delG/p.W24X имат по – тежко засягане на слуховата функция от носителите на p.W24X/p.W24X (mean=81.85dB).

Налице е симетрично засягане на слуховата функция при 93.9%.

Тежестта на слуховата загуба варира. По – често е тежка към дълбока и много по – рядко умерена. Алелът c.35delG (независимо дали е в хомо – или хетерозиготно състояние) води до по – тежко засягане на слуховата функция от p.W24X за пациентите от изследвания контингент.

Най – често срещаните аудиометрични криви са с остатъчен слух (residual) и плавно спускаща се за високите честоти (gently sloping). В повечето случаи са симетрични за двете уши. Много по – рядко се срещат плоска (flat), стръмно спускаща се за високите честоти (sharply sloping) и U – образна аудиометрични криви и то при носителите на p.W24X.

Слуховата увреда е стабилна, без флуктуации или прогресия при 96.6% от пациентите с c.35delG/c.35delG и 76.9% при p.W24X/p.W24X.

Наличието на родственици с увреден слух не е задължителен елемент в клиничната характеристика на несиндромната автозомно – рецесивна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 за нашата популация.

Наличието на родственици с увреден слух е по – характерно пациентите с p.W24X/p.W24X. 92.31% от тях съобщават, че имат други членове в семействата си с намаление на слуха и само 25%

при c.35delG/c.35delG. 75% от пациентите с c.35delG/c.35delG отричат или нямат точни данни за това.

Тежкото засягане на слуховата функция при пациентите с предполага и по – честата употреба на слухови апарти и/или кохлеарни импланти при 70.2%

Пълна клинична характеристика и аудиологичен профил на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30 в изследваната популация

Поради липса на установени мутации в GJB6 гена, кодиращ Cx30, не може да се направи характеристика на този тип слухова загуба за изследваната популация.

Роля на генетичното изследване за мутации в конексин 26 и конексин 30 в семейното планиране

Генетична консултация

В изследваната от нас популация проучихме няколко семейства със слухова увреда, при които в последствие доказахме Cx26 свързана слухова загуба. На всички пациенти беше направена генетична консултация.

Така например на един от пациентите с глухота от ранна детска възраст (№ 45), поради установена хомозиготна мутация c.35delG/c.35delG, проведохме генетични изследвания и на неговия брат. Последният е с нормален слух и не е включен в изследваната популация от 146 пациенти. И при него се доказа c.35delG, но в хетерозихотно състояние.

Пренатална диагностика

При едно от изследваните деца с глухота доказахме c.35delG/c.35delG. Две години по – късно беше направена пренатална диагностика на амниотична течност на майката на това дете в 18 гестационна седмица. Установи се c.35delG/c.35delG. В това семейство и следващото дете ще е с увреден слух.

Ето защо ролята на генетичната консултация при такива семейства е важна част от интердисциплинарния подход при несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30.

Препоръки за провеждане на генетичен слухов скрининг за GJB2

От анализа на получените резултати устновихме при 45.21% от пациентите промени в гена кодиращ Cx26. При 1/3 от изследваната популация причината за слуховата увреда са именно мутации в GJB2, кодиращ Cx26. Тежкото засягане на слуховата функция изисква ранна диагноза на тази увреда. Ето защо можем да дадем следните препоръки за провеждането на генетичен слухов скриниг:

- ✓ Пациенти с двустранно звукоприемно намаление на слуха с неясна етиология, датиращо от раждането или от ранна детска възраст
- ✓ Тежко към дълбоко, симетрично увреждане на слуховата функция
- ✓ Аудиометрична крива с остатъчен слух или низходящ тип, с ангажиране на предимно на високите честоти.
- ✓ Други членове на семейството с намален слух

Установяването на хомозиготна мутация в GJB2 доказва генетична причина за слуховата увреда. При установяване на хетерозиготна мутация скринингът трябва да продължи с изследване на други гени. За да преценим, кои да бъдат те за Българската популация, трябва да се направят мащабни проучвания за честотата им на увреда.

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Несиндромната автозомно – рецесивна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30 (локус DFNB1), е най – честата причина за генетична увреда на слуха. Слухът е засегнат от лека до дълбока степен (mild to profound) и обикновено увреждането е вродено. Над 220 мутации в Connexin 26 (Cx26) са асоциирани с глухота. (120)

Най – честата причина за несиндромна автозомно – рецесивна слухова загуба сред Кавказката раса е c.35delG. По литературни данни тя може да достигне 70% от всички мутации в GJB2. (88)

Честотите на носителство обаче, се различават между различните Европейски популации. Gasparini и сътрудници анализират мутацията c.35delG в 3270 случайни контроли от 17 Европейски страни. Те установяват честота на носителство 1/35 в Южна Европа и 1/79 в Централна и Северна Европа. Според това проучване мутацията произлиза някъде от Европа или Близкия Изток и сред всички Европейски популации честотата на носителство е 1/51. (121).

Алелната честота на c.35delG за САЩ и Австралия е 1%, Австрия 1.7%, Турция 1.8%, Португалия 2.2%, Испания 2.5%, Франция 2.7%, Италия 2 – 4%. (56, 121-125)

Единственото предходно българско изследване сред пациенти с несиндромна слухова увреда представя честота на хомозиготните за мутацията c.35delG 39%. Алелът p.W24X в този доклад е установен в хетерозиготно състояние и то само при един пациент. (99) В настоящето изследване честотата на хомозиготните c.35delG е 21.9%. Причината за тази разлика е, че са подбрани пациенти с различно ниво на слухова загуба, а не само с практическа глухота и

глухота. Това доказва важността на тежестта на увреда при изследваните популации.

Подобно на нашите резултати Lazar и сътрудници също установяват най – висока алелна честота за c.35delG (33%) и p.W24X (5.3%). (116) В нашето изследване обаче, p.W24X е с по – голямо процентно съотношение – 9.5%. Тези резултати се дължат най – вероятно на по – големия брой роми включени в изследването (29/146), тъй като тази мутация се среща при хора от ромски произход.

Danilenko et al. изследват 757 пациенти от Беларус с нормален слух и 391 млади пациенти с NSHL и установяват висока честота на носителство на c.35delG в Беларус – 5.7%. 178 от пациентите с NSHL (45.5%) са били хомозиготни, а 51 (13.1%) са били само с един мутантел алел. (126)

c.312del14 е втората по честота мутация в Беларус. Алелната й честота сред пациентите с NSHL в същото проучване е 3.7%. (126) В нашето изследване алелната й честотата е едва 0.68%. Установена е при двама пациенти, като единият е комплексен хетерозигот c.35delG/c.312del14 с генетична глухота, а при другия c.312del14/ WT.

Мутацията p.L90P е била за пръв път описана при два неродствени индивида от Италия и по – късно при пациенти от Австрия, Унгария, при словашки роми и при пациенти с кавказко – американски и с кавказко – канадски произход. (127) Ние я установяваме в комплексно хетерозиготно състояние.

Мутацията p.V37I първоначално е докладвана от Kelley и съавтори. (56) Авторският колектив е смятал, че този вариант е полиморфен и не води до развитието на слухова загуба. В последствие е бил описан от друг авторски колектив като патогенна

мутация. (107) Gallant et al. установява p.V37I при китайци, японци, виетнамци, филипинци с лека към умерена слухова загуба (mild to moderate). (128) Ние я установихме при едно дете от глухо семейство и то в хетерозиготно състояние.

В скорошно проучване от 2014 година Rayess доказва, че полът не е фактор, определящ вида и протичането на несиндромната слухова загуба резултат от увреда на Cx26. (129) Нашето изследване потвърждава тези резултати.

Мутацията c.35delG е най – честата причина за генетична глухота сред Кавказката популация. Може да се установи в хомозиготно или в комплексно хетерозиготно състояние (едновременно с друга мутация в гените GJB2 или GJB6).

Честотата на c.35delG обаче е ниска в Корейската и Арабската популации. (130) В доклад на Galehdari от изследваните 61 глухи пациенти с арабски произход при нито един не е доказана мутациия в гена кодиращ Cx26. (131)

При изследване на 2063 пациенти със слухова загуба за наличие на мутации в Cx26, Dai открива c.35delG само в автономния район Синдзян (Xinjiang). Това вероятно се дължи на непосредствената му близост до Русия и страните от Източна Европа, предполагащо смесени бракове между двете раси. (132)

Изследването на 560 души от 5 етнически групи от Русия установява носителство на c.35delG с честота 1/47. Тези резултати демонстрират, че c.35delG е налична не само в Западна, но и в Източна Европа (сред Угро – Финската и Тюркската популации). (133) c.35delG обаче не се установява при китайци и японци. (76)

В изследваната от нас популация от 146 пациенти с несиндромна слухова загуба c.35delG също е най – често срещаната

мутация и е причина за слуховата увреда при 21.9% (32/146), като всички пациенти са българи.

Втората по честота мутация, установена от нас е p.W24X. За първи път е описана от Kesell в пакистанско семейство (54), а по – късно е установена и в няколко азиатски семейства. (57, 134) Според Maheshwari p.W24X е преобладаващият DFNB1 алел в Индия. (92) Същите са и данните, докладвани от Joseph. (112) По данни на Kalaydjieva ромите произходжат от земите на днешна Индия, от където на различни миграционни вълни през 11 век са се преместили и в Европа. До 15 – ти век те присъстват в повечето Европейски страни. (135) Установяваването на висока честота на тази мутация при словашки и испански роми и в Индия, показва че този мутантен алел може да е сред често срещаните и в други Европейски ромски популации. p.W24X е докладвана при чешки роми (95), в Турция (136), в Унгария (137), Австрия (123), Гърция (138), Франция (117) – страни със значително ромско малцинство. Сравнението на хаплотиповете на други p.W24X носители от Европа и Азия ще помогне за разбирането на еволюционните корени на тази мутация.

В Централните и Югоизточните Европейски страни най-честите мутации отговорни за конгенитална загуба на слуха са c.35delG и p.W24X (15-55.8% и 2.5-4.3% съответно). (116)

В изследваната от нас популация не се установиха другите две често срещани мутации c.167delT и c.235delC, които са характерни за Ешкеназните евреи и азиатците съответно. (132)

c.312del14 е била докладвана и в други проучвания. В Словашката популация честотата й е 1.89% (139), в Иранската популация е 1.94%. (140)

Получените от нас резултати потвърждават публикуваните до момента данни, че етническата принадлежност има определяща роля за вида мутации в GJB2, а от там и за клиничното протичане на несиндромната слухова загуба резултат от увреда на Cx26.

От проведено изследваме открихме, че установяването на увредения слух, независимо от етиологията е около 20 – я месец. Средната възраст на поставяне на диагнозата при генетичните форми е дори 24.54 месеца.

Lévêque M и сътр. през 2007 год. представят резултати от програма за неонатален слухов скриниг във френския регион Champagne – Ardenne, обхващаща всички родилни отделения в посочената област. Слуховият скрининг е проведен на две нива. Първата стъпка са TEOAE още в родилното отделение, извършвани от медицинска сестра или акушерка. Ако TEOAE липсват в двете уши (положителен тест), бебето се насочва за втори тест. Той може да е TEOAE или автоматизирани ССЕП (АССЕП). Извършва се от лекар около 15 дни след изписването на детето. Ако тестът отново се окаже положителен в двете уши, бебето се насочва към специализиран център. В неонаталните интензивни отделения слуховият скриниг започва с АССЕП, поради голямата честота на слухова невропатия. Изследвани са били 33 873 или 92.42% от всички новородени в съответния регион, като 27 са диагностицирани с глухота (0.08%). Така медианната възраст за поставяне на диагноза в този френски регион е съкратена от 17 месеца на 10 седмици. (141)

В нашето изследване възрастта, изразена чрез медианата е 20 месеца или ние сме поставили диагнозата несиндромна слухова загуба 8 пъти по – късно от лекарите във Франция от посоченото проучване, поради липсата на неонатален слухов скрининг в България.

За съжаление слуховите увреждания се интервинират с успех, ако терапията започне до шестия месец от раждането. Ето защо предпоставка за успех е ранното откриване на слуховите увреждания, което може да стане единствено чрез въвеждането на универсален неонатален слухов скрининг (УНСС). Неонаталният слухов скрининг се извършва задължително при всички новородени в САЩ, Канада и в някои страни от Европейския съюз. (102) В рамките на Национална програма за неонатален слухов скрининг през периода 2006 – 2010 година за първи път в България се прави мащабно изследване на слуховата функция на новородените още в родилния дом. В момента за съжаление това става само в някои частни акушеро – гинеколочни клиники след заплащане.

В много държави, поради високата честота на несиндромната слухова загуба в резултат на увреждания на Cx26, генетичният скрининг за мутации в GJB2 като първата стъпка е златен стандарт. От получените резултати за нашата популация установихме мутации в GJB2 при 45.2% (66/146), като при 32.2% (47/146) те се оказаха причината за увредата на слуха. Липсата на установени делеции в GJB6 сред изследваната популация е резултат на ниската им честота у нас. Разширяването на извадката би доказало това. Според Hoefsloot скрининг за носителство на мутации в този ген трябва да се осъществи за пациентите с открита само една или нито една мутация в GJB2. (142)

Ето защо генетичният скрининг при пациенти с неясна етиология на слуховата увреда в България, трябва да започне със секвениране на GJB2. Освен това въвеждането на неонатален слухов скриниг ще улесни и отсее пациентите за генетичния.

GJB2 вариантите на слухова увреда в повечето изследвания се описват като прелингвални. Често обаче е невъзможо да се

отдиференцира вродената от невродената прелингвална загуба на слуха, особено в страните без въведен неонатален слухов скрининг. От друга страна, децата преминали неонаталния слухов скрининг, но диагностицирани по – късно в ранна детска възраст с Cx26 свързана слухова загуба, са много важни. Дали те са фалшиво отрицателни или се касае за късно начало на слуховата загуба и/или са изява на прогресивната природа на някои генетични случаи не е достатъчно изяснено. (143)

В България за съжаление не е въведен неонатален слухов скрининг. Изследването на слуха в тази възраст става само спорадично.

Orzan докладва за три италиански деца с биалелни GJB2 генотипове с внезапна поява на слуховата загуба между 18 и 24 – месечна възраст. В този случай не е ясно дали е налице предварително документиране на слуха или е въз основа само на анамнестичните данни на родителите. (144) Този пример е един от много, които насочват вниманието за уеднаквяване на показателите.

Според нашето изследване началото на слуховата увреда в Cx26, засяга възрастта под 10 години и показва, че началото на генетичната глухота е най – често в ранна детска възраст. 97.9% в нашите пациенти са деца под 5 години.

Denoyelle докладва за 43 от 88 пациенти с прелингвална невросензорна слухова загуба, носители на различни варианти на GJB2 гена. Промени в GJB2 не са открити при 16 – те лица с постлингвална слухова увреда. (87)

Подобни резултати се съобщават и в проучване от Израел на пациенти с несиндромна слухова загуба, тествани за GJB2 промени. От 66 изследвани с прелингвална слухова загуба 25 са хозиготни или комплексни хетерозиготни за GJB2 и четири са хетерозиготни. Не са

установени GJB2 варианти сред 11 – те случая с постлингвална слухова загуба (не е дадено определение от авторите). (145)

В изследването на Loffler алелът p.L90P се наблюдава в 2 от 16 постлингвални (недефинирани) случая и в 3 от 53 прелингвални случая на слухова загуба. Този алел най – вероятно има значителен принос за постлингвалната сухова увреда. (146) В изследвания от нас контингент комплексният хетерозигот p.Leu90Pro/p.Ile121An е с вродена прелингвална глухота.

При нашите пациенти носителите на c.35delG/c.35delG, c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 са с начало на слуховата загуба до 2 годишна възраст, а при p.W24X/p.W24X най – късно до 6.

Проучванията от различни автори предполагат слуховата загуба, асоциирана с най – често срещаните GJB2 варианти, да е с прелингвално начало. Резултатите от нашето изследване са съпоставими с получените до момента в световната литература.

Въвеждането на неонателен слухов и генетичен слухов скрининг ще спомогнат да се диагностицира навреме несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30. Увеличаване броя на изследваните индивиди и задълбочените молекулярни тестове при постлингвалната слухова увреда, ще внесат яснота за точното начало на увреждането, тъй като по – лекото засягане на слуховата функция често остава неразкрито преди училищна възраст. Ранната диагностика с въвеждането на неонателен и генетичен слухов скрининг ще спомогне да се прецени дали някои алели реално са свързани с постлингвално начало или просто намалението на слуха не е диагностицирано навреме. От друга страна децата със загуба на слуха демонстрират необратими

дефицити в общуването и психо – социалните умения, познавателната способност и грамотност.

Въпреки това, новородени с лека, прогресивна или късна проява на увреждане на слуха може да се пропуснат в конвенционалния универсален неонатален слухов скрининг (UNHS).

Слуховата загуба, асоциирана с различни увреди в Cx26, се описва като умерена до дълбока (moderate to profound). Тя е по – тежка при индивиди с две truncating мутации в GJB2 и по – лека при две nontruncating.

В изследвания от нас контингент ние установихме средна слухова загуба при тези паиенти 90.26dB и стандартно отклонение 12.44.

Truncating мутациите включват nonsense мутации, делеции, инсерции и дупликации, както и такива, водещи до промяна в рамката на четене, а nontruncating мутациите – аминокиселинни замени. При truncating мутациите протеинният продукт обикновено не е с цялата си дължина, бързо се разгражда или е изключително абнормен, докато при nonturncating мутациите е възможно да е с частична функционална активност. Това обяснява и разликата в тежестта на слуховата загуба. (147)

Всички пациенти в нашето изследване с генетична несиндромна слухова загуба резултат от увреда на Cx26 са с две truncating мутации (c.35delG/c.35delG, p.W24X/p.W24X, c.35delG/c.312del14, c.35delG/p.W24X). Това е причина за тежкото засягане на слуховата функция – в 91.4% е тежко към дълбоко и само в 8.5% умерено. При анализа на двете хомозиготни мутации обаче, прави впечатление фактът, че докато при p.W24X с тежка и дълбока слухова загуба са с по 38.5%, то при c.35delG 84.4% са с дълбока и само 12.5% с тежка. Освен това при p.W24X/p.W24X

23.01% (3/13) са с умерено засегната слухова функция, докато при c.35delG/c.35del само един пациент (3.1%).

Трябва да отбележим, че средната слухова загуба при пациентите с c.35delG/c.35delG е 93.38dB, а при пациентите с p.W24X/p.W24X е 81.85dB независимо, че модата (най – често срещаната стойност) и при двете групи е 95dB. Това се дължи на факта, че слуховата загуба при пациентите с p.W24X/p.W24X варира в по – широки граници – от 41 до 100dB.

Разширяване на извадката би дало отговор на въпроса дали хомозиготнта мутация c.35delG е свързана със статистически значимо по – тежко засягане на слуха от p.W24X за Българската популация.

В мултицентрово изследване на Snoeckx от 12 пациенти с p.W24X/p.W24X с тежка слухова увреда са 3 (25%), а 9 (75%) са с дълбока. В това проучване 64% (569/889) от c.35delG/c.35delG са с дълбока, 25% са с тежка, 10% с умерена и 1% с лека слухова загуба. (88)

При анализ на 256 деца с биалелни мутации в GJB2 и GJB6 Marlin установява при 77% (198) тежка към дълбока слухова загуба (severe to profound), а при хомозиготната мутация c.35delG/c.35delG дори до 82%. В тази студия само един пациент е носител на p.W24X/p.W24X и то с дълбока слухова загуба (profound). Комплексните хетерозиготи c.313del14/c.35delG също са с тежка към дълбока слухова загуба (severe to profound). (79)

Изследване на Попова и колектив от 2012 година сред 51 пациенти с тежка към дълбока слухова загуба за мутации в GJB2, установявя c.35delG при 39% в хомозиготно състояние, а при 8% в хетрозиготно. По – високата честота се свързва с подбора на

пациентите – всички те са с тежка или дълбока слухова загуба, която е най – характерна при увреда на Cx26. (99)

В наблюдаваната от нас популация алелът c.35delG, независимо дали е в хомозиготно, хетерозиготно състояние или като комплексен хетерозигот, в 87% води до дълбока слухова загуба (profound), 8.7% тежка (severe) и само в 4.2% до умерена (moderate). Близки резултати са получени и от Sansovic при изследване на пациенти от Хърватия с несиндромна слухова загуба. (119) Комплексните хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 са с дълбока слухова загуба, което може да се обясни с факта, че и двамата са комбинация от две truncating мутации.

В проучване на 103 корейски семейства с автозомно – рецесивна слухова загуба Kim и сътрудници установяват, че мутацията p.V37I е свързана предимно с лека към умерена слухова загуба. 4.8% от изследваните пациенти са носители на мутацията. (148)

В изследването на Huculak и съавтори, целящо да изясни ролята на p.V37I за развитието на глухота, се стига до следните заключения: (1) p.V37I алелът е чест сред хората с Китайски произход, но много рядко се среща при хора с Кавказки произход и (2) p.V37I алелът е патогенен, но води до по-слаба слухова загуба в сравнение с мутацията c.35delG. (149) Вероятно патогенната роля на този вариант с вариабилна пенетрантност се модифицира от действието на други гени. (150)

In vitro изследванията показват, че p.V37I водят до пълна липса на функционалност на Cx26 и предизвикват средна слухова загуба в хомозиготно състояние или при комплексни хетерозиготни комбинации. (151, 152)

В нашето изследване пациентът, при когото се открива мутацията p.V37I в хетерозиготно състояние е с умерена слухова загуба. Не открихме мутации в Cx30, които да обяснят възникналото намаление на слуха.

По данни на Snoeckx p.V37I, p.M34T и p.L90P са свързани с лека до умерена слухова загуба (88), независимо че проучванията на Bruzzone и Skerrett демонстрират пълна загуба на активността на конексиновите канали. С лека към умерена слухова загуба е свързан алелът p.L90P и в доклада на Marlin, а p.V37I и p.R127H с лека. (79)

Според съвсем скоршно изследване Chai представя данни, според които алелът p.V37I е свързан както с лека към умерена, така и с тежка към дълбока слухова загуба, но с превалиране на по – леките увреди. (153)

Що се отнася до алела p.L90P, резултатите от нашето изследване се различават от представнетите по – горе. В наблюдавания от нас контингент пациентът с p.L90P е с дълбока слухова загуба. Той е комплексен хетерозигот p.Leu90Pro/p.Ile121Asn. Причината за глухота при него най – вероятно се дължи на тези мутации, но е необходимо е да бъдат извършени молекулярни изследвания на новооткритата p.Ile121Asn мутация, доказващи връзката й с несиндромната слухова загуба.

В допълнение, тежестта на слуховата загуба може да варира дори и между отделните братя и сестри. Според Marlin около 36% от семействата носят различни генотипове. Това демонстрира, че DFNB1 фенотиповете се определят не само от GJB2 – GJB6 генотиповете, но и от заобикалящата ни среда и генетичния фонд. (79)

Въпреки, че представените проучвания предполагат GJB2 варианти да се асоциират с умерена до дълбока слухова загуба,

броят изследвани пациенти в различните студиа е малък, а е налице и несъответствие в използваните класификации за слухова увреда от различните авторски колективи. Ето защо изследването на по – голям брой пациенти и използване на единна класификация за степента на слуховите увреди би допринесла за по – детайлна и по – точна характеристика на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и C30.

При 93.9% от нашите пациенти с мутации и/или полиморфизми в Cx26 е налице симетрично засягане на слуха. Получените от нас резултати съвпадат с резултатите на Mueller. Според него няма значителна разлика в средната слухова загуба на двете уши в dB за хомозиготните и комплексните хетерозиготи на GJB2 6.33 (N = 45, SD = 8.09), за хетерозиготните 6.66 (N = 26, SD = 8.05) и пациентите без мутации в GJB2 7.86 (N = 175, SD = 11.19). (154)

При анализа на италиански деца с несиндромна слухова загуба повече от 90% от 46 деца с различни варианти на GJB2 са демонстрирали симетрична увреда на слуха. В това проучване GJB2 варианти са установени при 43 от 75 (66%) индивида със симетрична слухова загуба и само при четири от 19 (21%) с асиметрична увреда. (144)

В група от 24 пациенти от Австрия с невросензорна загуба на слуха и с различни вариани в GJB2 е установена асиметрия на слуховата увреда при пет от тях (при трима с две степени на слуховата увреда и при двама с една). (146)

Асиметричното засягане на слуховата функция при увреда на Cx26 остава неизяснено. Конексините са разпространени едновременно и в двете уши и увредата им се предполага да е

двустанна, симетрична. Ето защо са необходими още данни за хора с различен вид загуба на слуха, за да се внесе яснота по този въпрос.

Повече от проучванията на DFNB1 локуса доказват, че най – често срещаният тип аудиометична крива е с остатъчен слух (residual), но с някои изключения. При комплексните хетерозиготи с две truncating мутации е налице тежко засягане на слуха тип residual. Ако обаче е налице комбинация от truncating/nontruncating или nontruncating/nontruncating мутации, слуховата увреда може да е лека към тежка, а аудиометричната крива плоска или плавно спускаща се за високите честоти. (90) Най – важните truncating мутации са c.35delG(90), c.235delC(81), c.167delT(145), p.W24X(155), както и голяма делеция в GJB6(65), а най – важните nontruncating мутации са p.M34T, p.V37I(117), p.L90P(122), както и slice – site мутацията c.IVS1+1G>A.

При анализа на аудиологичните криви на изследваните от нас пациенти с и без мутации най – обичайна е тази с остатъчен слух (residual). Трябва да отбележим обаче, че при увреда на Cx26 тя се доказва два пъти по – често. Това можем да обясним с по – тежкото засягане на слуховата функция в тази група, дължащо се на комбинация от две truncating мутации. Освен това при 66.7% аудиометричните криви на двете уши са симетрични. При пациентите без муатции в Cx26 установихме всички видове аудиометрични криви, но с различно процентно съотношение. Що се отнася до GJB2 свързаната слухова увреда, освен residual се срещат и плавно спускащи се криви за високите честоти и плоски, но предимно при p.W24X/p.W24X.

Според Liu най – честите аудиометрични криви при пациентите с Cx26 свързана слухова загуба са с остатъчен слух и намаление на слуха за високите честоти (residual и sloping) в 72.7% и

плоски в 23.4%. (156) Получените резултати са съпоставими с нашите, ако се анализира GJB2 като цяло. Разлика обаче се установява във вида мутации. В това проучване c.235delC е най – честата мутация и е свързана с дълбока слухова загуба, докато при нас това е c.35delG. Това се обяснява с факта, че това изследване е проведено сред китайци, а c.235delC е най – честият за тази популация мутантен алел в GJB2. Това още веднъж доказва значението и на етническата принадлежност за клиничната изява на слуховата увреда.

Според Martin U – образната аудиометрична крива или намалението на слуха за средните честоти е по – характерно за доминантните форми на несиндромната слухова увреда. (106) В изследвания от нас контингент установихме такъв тип аудиометрична крива само на едното ухо при един пациент с c.35delG/c.35delG. Единствено той с умерена слухова загуба в тази група. U – образната аудиометрична крива обаче, е втората по честота в групата без установени муатации в Cx26. Тежкото засягане на слуховата функция при Cx26 слуховата загуба предполага по – често аудиометрични криви с остатъчен слух.

В литературата липсват данни за продължително наблюдение на пациенти с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и 30. Това се дължи на факта, че секвенирането на гените за глухота започва през последните 10 – 20 години. Проследяването на такива лица от 1 до 20 години показава, че няма промяна в прага на слуха според Murgia. Въпреки това, детайли за броя на тези случаи и времето на повторно изследване, не са публикувани. (86)

В нашето изследване информацията за протичането на заболяването (стабилно, прогесивно, с флуктуации) е на база на

анаместичните данни. Констатирахме статистически значима разлика в протичането на заболяването при пациентите с и без мутации в GJB2 (p=0.000) и липса на такава между пациентите с хомо – и хетерозиготни мутации. (p=0.643). 91.49% от пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 съобщиха за липса на влошаване на състоянието, докато при пациентите без мутации в Cx26 само 42.5%.

Според Martini прогресивното протичане на слуховата увреда е по – характерно за доминантните форми на несиндромната слухова загуба. (106)

10 годишно наблюдение на 16 деца от Франция с биалелни GJB2 генотипове установява, че при 11 няма промяна в прага на слуха (≦5dB). Три деца (едното с тежка, а другите две с дълбока загуба на слуха) показват лека прогресия (5 – 10dB). Две деца (едно с умерена до тежка и едно с дълбока загуба на слуха) са имали прогресия >10dB. (87)

В изследване на Kenna сред 128 деца с биалелни муатции в GJB2 гена, само едно с c.35delG/c.35delG е имало нормален слух, документиран при раждането и с прогресия към лека до умерена степен на 15 месечна възраст. (147)

В ретроспективен анализ на аудиограми (от 2 – 15 години) на 47 италиански деца, е констатирана прогресия на загубата на слуха отново само при едно дете. Прогресията е била дефинирана като промяна >15dB в две или повече честоти или >10dB промяна в рамките на четири честоти. (144)

При изследване на 25 деца с биалелни мутации в Cx26 Chan и сътрудници отбелязват, че алелът p.Val37Ile, независимо дали е в хомозиготно или комплексно хетерозиготно състояние, е свързан не само с лека, но и с бавно прогресираща слухова загуба. (151)

За прогресивно протичане при три деца (макар и да не е посочена дефиницията за това) докладва и Loffer при изследване на 24 австрийски пациенти с Cx26 свъразана слухова загуба. (146)

Както се вижда повечето от авторите представят ограничен брой пациенти наблюдавани за по – продължителен период от поне няколко години.

Според Kenna няма статистически значима разлика между truncating и nontruncating мутациите от гледна точка на прогресията на слуховата увреда. Тя не може да се свърже и с определена мутация в GJB2. (147) В нашето изследване 96.9% (31/32) от пациентите с c.35delG/c.35delG, 76.9% (10/13) от p.W24X/p.W24X, както и двамата комплексни хетерозиготи c.35delG/p.W24X и c.35delG/c.312del14 съобщават, че няма прогресия или флуктуация в слуховата загуба.

Обширен мета – анализ на Chan от февруари 2014 година на 28 проучвания сред 1140 пациенти с Cx26 свързана слухова загуба представя прогресия при 18.7% (0 – 56%). (72)

И докато тежестта на слухова загуба е повлияна от генетични фактори като степен на увреда на протеиновата функция при nontruncating мутациите, то прогресията й може би зависи от фактори различни от Cx26 протеина. Докладвани са случаи с прогресия от няколко месеца до няколко години. Липсата на прогресия в повечето от случаите с несиндромна слухова загуба резултат от увреда на Cx26 може би се дължи и на факта, че при тези пациенти слухът е засегнат в по – тежка степен (най – често severe to profound).

Необходимостта от по – продължително наблюдение на пациентите с различна степен на слухова увреда и ограничените

данни в тази област до момента предполагат Cx26 слухова увреда предимно с непрогресивно протичане.

Тежкото засягане на слуховата функция при пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30 предполага и в по – голяма степен употреба на слухови апарати или кохлеарни импланти. В проучване на Propst 66.7% от пациентите с мутации в GJB2 са с кохлеарен имплант срещу 63.8% в нашето изследване. (127)

Освен това установихме, че при пациентите с c.35delG/c.35delG, имайки по – тежко засягане на слуха от p.W24X/p.W24X, по – често е поставян кохлеарен имплант (78.1%) от p.W24X/p.W24X (23.08%).

Green установява, че пациентите с кохлеарен имплант поради слухова загуба дължаща се на увреда на Cx26, имат по – голямо подобрение в сравнение с пациентите с други конгенитални увреди на слуха. Това се обяснява с факта, че увреждането са ограничени само във вътрешното ухо. (157)

Липсата на делеции в GJB6, кодиращ Cx30 в проучвания от нас контингент не е неочаквано, поради ниската честота с която се откриват в някои популации. При изследване на 272 пациенти с несиндромна глухота от Словакия за големи делеции del(GJB6-D13S1830) не се открива нито една мутация. (158) Изследването на 94 деца от турски произход също не води до откриване на мутацията del(GJB6-D13S1830) (159). В скорошно скриниране на 655 пациенти с глухота от Китай за del(GJB6-D13S1830) с мултиплексен PCR и секвениране не се открива нито del(GJB6-D13S1830), нито други мутации в GJB6 гена. (160)

Нивото на слухова загуба при индивидите с делеции в GJB6 гена, кодиращ Cx30 варира от умерено до дълбоко. (66, 79) Feldmann

отбелязва прогресия в слуховата увреда при генотип с делеция в GJB6. (83)

Едновременното носителство на мутации в GJB2 и GJB6 води до по – тежко засягане на слуховата функция. (83, 161)

Комплексите хетерозиготи с мутации в GJB2 и делеции в GJB6 са около 2 – 4% от пациентите с автозомно – рецесивна несиндромна слухова загуба. Около 20% от GJB2 хетерозоготни пациенти с несиндромна слухова увреда имат делеции в гена GJB6, кодиращ Cx30. Хомозиготните или комплексни хетерозиготи за GJB6 са рядко срещани. (162)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тежкото засягане на слуховата функция и ранното, предимно прелингвално начало на изява на заболяването налагат навременна диагноза и лечение на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26 и конексин 30. Въвеждането на генетичен слухов скриниг за Cx26 сред пациенти с неясна причина за слухова увреда ще даде шанс на засегнатите за пълноценен живот. Изследването и на други гени, отговорни за слуховъзприятието ще спомогне за изясняване на етиологията слуховите увреди.

ИЗВОДИ

1. Честотата на мутациите и/или полиморфизми в гена ***GJB2***, кодиращ конексин 26 е ***45.21%*** сред изследваните пациенти с увреден слух. Установени са c.35delG, p.W24X, c.312del14, p.Leu90Pro, p.Val37Ile, както два полиморфни варианта p.Arg127His и p.Val27Ile. Откритите ***хомозиготни мутации c.35delG*** са с честота ***21.9%*** и ***p.W24X 8.9%***. съответно**.** Установена е ***нова, непубликувана в световната литература*** мутация при пациент с несиндромна слухова загуба – ***p.Ile121Asn***. Мутацията ***c.35delG*** се среща при пациенти с ***български и турски произход***, а ***p.W24X*** при ***роми***.

2. ***Липсата на установени делеции del(GJB6-D13S1830) и del(GJB6-D13S1830)*** в гена ***GJB6*****, кодиращ конексин 30,** се дължи най – вероятно на ниската им честота сред българската популация.

3. Несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26, е с ***ранно начало*** (най – често вродена), ***прелингвална***. Заболяването протича ***стабилно, без прогресия или флуктуация на слуховата увреда***. Въпреки генетичната етиология, наличието на ***родственици с увреден слух*** не е задължително във фамилната анамнеза.

4. Несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 е ***невросензорна***, ангажираща всички честоти, но с предимство за високите. Слуховата функция е засегната ***двустранно, симетрично***, предимнно ***тежка към дълбока степен, най – често глухота.*** Най – честата форма на аудиометричната крива е с остатъчен слух (residual) и плавно спускаща се за високите честоти (gently sloping).

5. При ***32.19%*** от изследваните пациенти е доказана ***генетична причина*** за несиндромната слухова загуба, ***поради увреда на Cx26***. Генетичната консултация дава възможност ***за прогнозиране на заболяването, навременно лечение и семейно планиране.***

6. Ранното начало, високата честота и тежкото засягане на слуховата функция при генетичната несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26, изисква навременна диагноза и лечение. Това налага ***въвеждането на генетичен слухов скрининг, стартиращ с изследване на GJB2, при пациенти с несиндромна слухова загуба с неясна етиология.***

7. Тежкото засягане на слуха, ранното, предимно прелингвално начало определят ***кохлеарната имплантация и слухопротезирането*** като най – ефикасен лечебен метод при пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26.

ПРИНОСИ

1. Създадена е клинична база данни и е разширена ДНК биобанката на пациенти с несиндромна слухова увреда.

2. Проучена е ролята на генетичните фактори за клиничиното протичане на несиндроманата слухова загуба, резултат от увреда на Cx26 и Cx30.

3. При изследваните 146 пациенти за първи път в световен мащаб е установена мутацията p.Ile121Asn при пациент с несиндромна слухова загуба.

4. За пръв път в България се извършва корелационен анализ между клиничното протичане и генетичните характеристики на несиндромната автозомно – рецесивна слухова загуба резултат от уреда на конексин 26.

5. За първи път в България е направена е детайлна клинична характеристика и аудиологичен профил на пациентите с несидромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26, приложими в клиничната практика.

6. Предложени са практически критерии за провеждане на генетичен слухов скриниг при пациенти с несиндромна слухова загуба с неясна етиология в България, както и

включването на последния в комплексния диагностичен подход.

7. Клиничният подбор на пациенти с несиндромна слухова загуба, молекулярно – генетичните тестове за изключване наследствения характер на увредения слух, медико – генетичните консултации при планиране на семейството, се явяват ефективен подход за ранната диагноза и профилактика на раждането на деца с увреден слух.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Списък на научните публикации във връзка с дисертационния труд:

Popov T., **Stancheva I.**, Kachakova D., et al. Auditory Outcome After Cochlear Implantation in Patients With Congenital Nonsyndromic Hearing Loss: Influence of the GJB2 Status, Otology & Neurotology 2014, 35 (8): 1361 – 1366 (Impact factor 2.014)

Станчева И., Стоянов О., Тодоров Сп., Роля на конексините за слуховата загуба при човека, Международен бюлетин по оториноларингология 2013 (1): 26 – 29

Върбанова С., Попова Д., Попов Т., Тодоров С., Стоянов О., **Станчева И.** Промени в подбора на пациентите за кохлеарна имплантация, Международен бюлетин по оториноларингология 2013 (3): 7 – 12

Станчева И., Доскова Д., Наследствена слухова загуба, Мединфо 2012 (3): 68 – 71

Списък на научните участия във връзка с дисертационния труд:

Станчева И. Слухова невропатия – роля и място сред слуховите увреди. Научна конференция "Съвременни концепции в лечението на ушите, носа и гърлото". Пловдив. 28 – 30 Март 2014

Станчева И., Попова Д., Върбанова С. Наследствена глухота. Научна конференция. Стара Загора. 29 – 31 март 2013

Върбанова С., Попова Д., **Станчева И.** Кохлеарна имплантация при пациенти с едностранна слухова загуба и тинитус. Научна конференция. Стара Загора. 29 – 31 март 2013

Станчева И., Върбанова С., Доскова Д., Попова Д. Конексин 30 – молекулярни основи на глухотата. XII Белинов симпозиум с международно участие. Велико Търново, 7 – 9 Октомври 2011

Попова Д., Върбанова С., Доскова Д., **Станчева И.** Мъртви зони в кохлеята. XII Белинов симпозиум с международно участие. Велико Търново, 7 – 9 Октомври 2011

БИБЛИОГРАФИЯ

1. WHO. Newborn hearing screenig [updated 2009].
2. deafness Enog. European network on genetic deafness: pathogenic mechanisms, clinical and molecular diagnosis, social impact(GENDEAF). Available from: http://www.2020-horizon.com/GENDEAF-European-network-on-genetic-deafness-pathogenic-mechanisms-clinical-and-molecular-diagnosis-social-impact(GENDEAF)-s44205.html.
3. Rodriguez-Paris J, Pique L, Colen T, Roberson J, Gardner P, Schrijver I. Genotyping with a 198 mutation arrayed primer extension array for hereditary hearing loss: assessment of its diagnostic value for medical practice. PloS one. 2010;5(7):e11804.
4. Harris A, Locke D. Connexins : a guide. New York, N.Y.: Springer; 2009. xvi, 573 p. p.
5. Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. The Journal of physiology. 2006;576(Pt 1):11-21.
6. Hibino H, Kurachi Y. Molecular and physiological bases of the K+ circulation in the mammalian inner ear. Physiology. 2006;21:336-45.
7. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Cell Commun Signal. 2009;7:4-.
8. OMIM. Available from: http://omim.org/entry/121011.
9. Kemperman MH, Hoefsloot LH, Cremers CW. Hearing loss and connexin 26. Journal of the Royal Society of Medicine. 2002;95(4):171-7.
10. Hussain MU. Connexins : the gap junction proteins. New York: Springer; 2014. pages cm p.
11. Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol. 2007;127(11):2516-24.
12. Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, et al. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 A resolution. Nature. 2009;458(7238):597-602.
13. Zonta F, Polles G, Zanotti G, Mammano F. Permeation pathway of homomeric connexin 26 and connexin 30 channels investigated by molecular dynamics. J Biomol Struct Dyn. 2012;29(5):985-98.
14. Peracchia C, Wang XC. Connexin domains relevant to the chemical gating of gap junction channels. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]. 1997;30(5):577-90.

15. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Evans WH, Lench N, et al. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. Novartis Found Symp. 1999;219:134-50.
16. Frenz CM, Van De Water TR. Immunolocalization of connexin 26 in the developing mouse cochlea. Brain research Brain research reviews. 2000;32(1):172-80.
17. Xia AP, Ikeda K, Katori Y, Oshima T, Kikuchi T, Takasaka T. Expression of connexin 31 in the developing mouse cochlea. Neuroreport. 2000;11(11):2449-53.
18. Cohen-Salmon M, Maxeiner S, Kruger O, Theis M, Willecke K, Petit C. Expression of the connexin43- and connexin45-encoding genes in the developing and mature mouse inner ear. Cell and tissue research. 2004;316(1):15-22.
19. Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, et al. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. Cell and tissue research. 1998;294(3):415-20.
20. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. Compr Physiol. 2012;2(3):1981-2035.
21. Ahmad S, Chen S, Sun J, Lin X. Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. Biochemical and biophysical research communications. 2003;307(2):362-8.
22. Asma A, Ashwaq A, Norzana AG, Atmadini AM, Ruszymah BH, Saim L, et al. The association between GJB2 mutation and GJB6 gene in non syndromic hearing loss school children. The Medical journal of Malaysia. 2011;66(2):124-8.
23. Ito J. Regenerative medicine for the inner ear. New York: Springer; 2014. pages cm p.
24. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessement of connexin composition in mammals. The Journal of comparative neurology. 2003;467(2):207-31.
25. Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, et al. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. Curr Biol. 2002;12(13):1106-11.
26. Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, et al. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. Hum Mol Genet. 2003;12(1):13-21.
27. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. Brain research Brain research reviews. 2000;32(1):163-6.

28. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J. 2006;394(Pt 3):527-43.
29. Zhang JT, Chen M, Foote CI, Nicholson BJ. Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. Mol Biol Cell. 1996;7(3):471-82.
30. Ahmad S, Evans WH. Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. Biochem J. 2002;365(Pt 3):693-9.
31. George CH, Kendall JM, Evans WH. Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. J Biol Chem. 1999;274(13):8678-85.
32. Sosinsky G. Mixing of connexins in gap junction membrane channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(20):9210-4.
33. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. Cell. 1996;84(3):381-8.
34. Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, et al. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. Science. 2002;296(5567):503-7.
35. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J Cell Biol. 1969;40(3):648-77.
36. Kamiya K, Yum SW, Kurebayashi N, Muraki M, Ogawa K, Karasawa K, et al. Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26. The Journal of clinical investigation. 2014;124(4):1598-607.
37. Martinez AD, Acuna R, Figueroa V, Maripillan J, Nicholson B. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. Antioxidants & redox signaling. 2009;11(2):309-22.
38. Simpson I, Rose B, Loewenstein WR. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. Science. 1977;195(4275):294-6.
39. Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. Hum Mol Genet. 2003;12(8):805-12.
40. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nickel R. Connexins and gap junctions in the inner ear. Audiology & neuro-otology. 2002;7(3):141-5.
41. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem. 2002;383(5):725-37.
42. Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated

with autosomal dominant hearing impairment. Nat Genet. 1998;20(4):370-3.
43. Liu XZ, Xia XJ, Adams J, Chen ZY, Welch KO, Tekin M, et al. Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. Hum Mol Genet. 2001;10(25):2945-51.
44. Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW. Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. Hum Genet. 2004;115(3):191-9.
45. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. Hum Mol Genet. 1997;6(12):2173-7.
46. Genetic home page. Available from: http://ghr.nlm.nih.gov/condition/nonsyndromic-deafness.
47. Stephens SDG. Genetic hearing loss: A historical overview. Adv Audiol. 1985;3: 3– 17.
48. Cranefield PFaWF. Paulus Zacchias on mental deficiency and on deafness. Bull N Y Acad Med Jan 1970;46(1):3-21.
49. Reardon W. Sex linked deafness: Wilde revisited. Journal of medical genetics. 1990;27(6):376-9.
50. Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, et al. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. Nat Genet. 1994;6(1):24-8.
51. Ben Othmane K, Ben Hamida M, Pericak-Vance MA, Ben Hamida C, Blel S, Carter SC, et al. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. Nat Genet. 1992;2(4):315-7.
52. Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, Stewart IA, Nancarrow DJ, Hayward NK, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. American journal of human genetics. 1995;57(3):629-35.
53. Gasparini P, Estivill X, Volpini V, Totaro A, Castellvi-Bel S, Govea N, et al. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. European journal of human genetics : EJHG. 1997;5(2):83-8.
54. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. Nature. 1997;387(6628):80-3.
55. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet. 1997;6(9):1605-9.

56. Kelley PM HD, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, et al. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. American journal of human genetics. 1998;62:792-9.
57. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Human mutation. 1998;11(5):387-94.
58. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. Lancet. 1998;351(9100):415.
59. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. The New England journal of medicine. 1998;339(21):1500-5.
60. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. Neuroreport. 1999;10(9):1853-7.
61. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. Journal of medical genetics. 2000;37(1):41-3.
62. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. Hum Genet. 2002;111(4-5):394-7.
63. Wang YC, Kung CY, Su MC, Su CC, Hsu HM, Tsai CC, et al. Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. European journal of human genetics : EJHG. 2002;10(8):495-8.
64. Gabriel H, Kupsch P, Sudendey J, Winterhager E, Jahnke K, Lautermann J. Mutations in the connexin26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. Human mutation. 2001;17(6):521-2.
65. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. The New England journal of medicine. 2002;346(4):243-9.
66. del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. Journal of medical genetics. 2005;42(7):588-94.
67. Gunther B, Steiner A, Nekahm-Heis D, Albegger K, Zorowka P, Utermann G, et al. The 342-kb deletion in GJB6 is not present in patients

with non-syndromic hearing loss from Austria. Human mutation. 2003;22(2):180.
68. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. Human mutation. 2003;21(5):552-3.
69. Seeman P, Bendova O, Raskova D, Malikova M, Groh D, Kabelka Z. Double heterozygosity with mutations involving both the GJB2 and GJB6 genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population. Annals of human genetics. 2005;69(Pt 1):9-14.
70. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al. GJB2 mutations: passage through Iran. American journal of medical genetics Part A. 2005;133A(2):132-7.
71. homepage C-d. Connexin-deafness homepage. Available from: http://davinci.crg.es/deafness/.
72. Chan DK, Chang KW. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. The Laryngoscope. 2014;124(2):E34-53.
73. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. Lancet. 1998;351(9100):394-8.
74. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. Jama. 1999;281(23):2211-6.
75. Abe S, Kelley PM, Kimberling WJ, Usami SI. Connexin 26 gene (GJB2) mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555A-->G mitochondrial mutation. American journal of medical genetics. 2001;103(4):334-8.
76. Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. American journal of medical genetics. 2000;90(2):141-5.
77. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH, Chiang YL, Oong JL, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2003;5(3):161-5.
78. Lucotte G, Dieterlen F. The 35delG mutation in the connexin 26 gene (GJB2) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence for its origin in ancient Greece. Genetic testing. 2005;9(1):20-5.
79. Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, et al. GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations

in a large cohort of hearing-impaired patients. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2005;131(6):481-7.
80. Dragomir C, Stan A, Stefanescu DT, Savu L, Severin E. Prenatal screening for the 35delG GJB2, del (GJB6-D13S1830), and del (GJB6-D13S1854) mutations in the Romanian population. Genetic testing and molecular biomarkers. 2011;15(11):749-53.
81. Oguchi T, Ohtsuka A, Hashimoto S, Oshima A, Abe S, Kobayashi Y, et al. Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns. Journal of human genetics. 2005;50(2):76-83.
82. Santos RL, Aulchenko YS, Huygen PL, van der Donk KP, de Wijs IJ, Kemperman MH, et al. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2005;69(2):165-74.
83. Feldmann D, Denoyelle F, Chauvin P, Garabedian EN, Couderc R, Odent S, et al. Large deletion of the GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. American journal of medical genetics Part A. 2004;127A(3):263-7.
84. Stinckens C, Kremer H, van Wijk E, Hoefsloot LH, Huygen PL, Standaert L, et al. Longitudinal phenotypic analysis in patients with connexin 26 (GJB2) (DFNB1) and connexin 30 (GJB6) mutations. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2004;113(7):587-93.
85. Boulay AC, del Castillo FJ, Giraudet F, Hamard G, Giaume C, Petit C, et al. Hearing is normal without connexin30. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013;33(2):430-4.
86. Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. Journal of medical genetics. 1999;36(11):829-32.
87. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. Lancet. 1999;353(9161):1298-303.
88. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. American journal of human genetics. 2005;77(6):945-57.
89. Lezirovitz K, Nicastro FS, Pardono E, Abreu-Silva RS, Batissoco AC, Neustein I, et al. Is autosomal recessive deafness associated with oculocutaneous albinism a "coincidence syndrome"? Journal of human genetics. 2006;51(8):716-20.

90. Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PL, Moreno F, del Castillo I, et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. Journal of medical genetics. 2004;41(3):147-54.
91. Hilgert N, Huentelman, M. J., Thorburn, A. Q., Fransen, E., Dieltjens, N., Mueller-Malesinska, M., Pollak, A., Skorka, A., Waligora, J., Ploski, R., Castorina, P., Primignani, P., and 45 others. Phenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene. Europ J Hum Genet. 2009;17:517-24.
92. Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. American journal of medical genetics Part A. 2003;120A(2):180-4.
93. Mani RS, Ganapathy A, Jalvi R, Srikumari Srisailapathy CR, Malhotra V, Chadha S, et al. Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss. European journal of human genetics : EJHG. 2009;17(4):502-9.
94. Minarik G, Ferak V, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L. High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). General physiology and biophysics. 2003;22(4):549-56.
95. Seeman P MM, Raskova D, Bendova O, Groh D, Kubalkova M, Sakmaryova I, Seemanova E, Kabelka Z. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. Clinical genetics. 2004(66):152-7.
96. Dahl HH, Tobin SE, Poulakis Z, Rickards FW, Xu X, Gillam L, et al. The contribution of GJB2 mutations to slight or mild hearing loss in Australian elementary school children. Journal of medical genetics. 2006;43(11):850-5.
97. Iossa S, Chinetti V, Corvino V, Marciano E, Franze A. R75Q dominant mutation in GJB2 gene silenced by the in Cis recessive mutation c.35delG. American journal of medical genetics Part A. 2010;152A(10):2658-60.
98. Ross SA, Novak Z, Kumbla RA, Zhang K, Fowler KB, Boppana S. GJB2 and GJB6 mutations in children with congenital cytomegalovirus infection. Pediatric research. 2007;61(6):687-91.
99. Popova DP, Kaneva R, Varbanova S, Popov TM. Prevalence of GBJ2 mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the

European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2012;269(6):1589-92.
100. impairments EWGogh. European Working Group on genetic hearing impairments 1996.
101. Близнец Е.А. МДН, Хоров О.Г., Маркова Т.Г., Поляков А.В. Спектр мутаций в гене GJB2 у белорусских пациентов с тугоухостью. Результатъі пилотново генетического скрининга нарушения слуха у новорожденнъіх. Генетика. 2014;50(2):214 - 21.
102. НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА ЗА Неонатален слухов скрининг. 2006-2010.
103. Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, Guo YF, He Y, Lan L, et al. Newborn hearing concurrent gene screening can improve care for hearing loss: a study on 14,913 Chinese newborns. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2011;75(4):535-42.
104. Smith RJH, Van Camp G. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNB1. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, et al., editors. GeneReviews(R). Seattle (WA)1993.
105. Върбанова С. Възможности на импедансната аудиометрия при оценка на функционалното състояние на слуховия анализатор. 2008.
106. Martini A. SD, Read A. Genes, Hearing, and Deafness2007.
107. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. Hum Genet. 2000;106(1):40-4.
108. Castro LS, Marinho AN, Rodrigues EM, Marques GC, Carvalho TA, Silva LC, et al. A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon region. Brazilian journal of otorhinolaryngology. 2013;79(1):95-9.
109. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. Hearing research. 2005;203(1-2):88-93.
110. Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. Genetic testing. 2007;11(4):455-8.
111. Bajaj Y, Sirimanna T, Albert DM, Qadir P, Jenkins L, Bitner-Glindzicz M. Spectrum of GJB2 mutations causing deafness in the British Bangladeshi population. Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery. 2008;33(4):313-8.
112. Joseph AY, Rasool TJ. High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of

Kerala, India. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2009;73(3):437-43.
113. Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, Gonzalez-Neira A, Lopez-Nevot A, et al. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. American journal of medical genetics Part A. 2005;137A(3):255-8.
114. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T. GJB2 and GJB6 gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. Journal of genetics. 2009;88(3):267-72.
115. Khandelwal G, Bhalla S, Khullar M, Panda NK. High frequency of heterozygosity in GJB2 mutations among patients with non-syndromic hearing loss. The Journal of laryngology and otology. 2009;123(3):273-7.
116. Lazar C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, et al. Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the GJB2 gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2010;74(4):351-5.
117. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. BMC medical genetics. 2004;5:5.
118. Matos TD, Simoes-Teixeira H, Caria H, Rosa H, O'Neill A, Fialho G. The controversial p.Arg127His mutation in GJB2: report on three Portuguese hearing loss family cases. Genetic testing and molecular biomarkers. 2010;14(1):141-4.
119. Sansovic I, Knezevic J, Musani V, Seeman P, Barisic I, Pavelic J. GJB2 mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. Genetic testing and molecular biomarkers. 2009;13(5):693-9.
120. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? Mutation research. 2009;681(2-3):189-96.
121. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. European journal of human genetics : EJHG. 2000;8(1):19-23.
122. Wilcox SA SK, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. Hum Genet. 2000;106:399-405.
123. Frei K, Szuhai K, Lucas T, Weipoltshammer K, Schofer C, Ramsebner R, et al. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. European journal of human genetics : EJHG. 2002;10(7):427-32.
124. Tekin M, Akar N, Cin S, Blanton SH, Xia XJ, Liu XZ, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications

for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. Hum Genet. 2001;108(5):385-9.
125. Lucotte G, Bathelier C, Champenois T. PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France. Molecular and cellular probes. 2001;15(1):57-9.
126. Danilenko N, Merkulava E, Siniauskaya M, Olejnik O, Levaya-Smaliak A, Kushniarevich A, et al. Spectrum of genetic changes in patients with non-syndromic hearing impairment and extremely high carrier frequency of 35delG GJB2 mutation in Belarus. PloS one. 2012;7(5):e36354.
127. Propst EJ, Stockley TL, Gordon KA, Harrison RV, Papsin BC. Ethnicity and mutations in GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) in a multi-cultural Canadian paediatric Cochlear Implant Program. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2006;70(3):435-44.
128. Gallant E, Francey L, Tsai EA, Berman M, Zhao Y, Fetting H, et al. Homozygosity for the V37I GJB2 mutation in fifteen probands with mild to moderate sensorineural hearing impairment: further confirmation of pathogenicity and haplotype analysis in Asian populations. American journal of medical genetics Part A. 2013;161A(9):2148-57.
129. Rayess HM, Weng C, Murray GS, Megerian CA, Semaan MT. Predictive factors and outcomes of cochlear implantation in patients with connexin 26 mutation: A comparative study. American journal of otolaryngology. 2014.
130. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. Journal of medical genetics. 2001;38(8):515-8.
131. Galehdari H, Foroughmand AM, Soorki MN, Mohammadian G. Absence of mutations in GJB2 (Connexin-26) gene in an ethnic group of southwest Iran. Indian journal of human genetics. 2009;15(1):9-12.
132. Dai P, Yu F, Han B, Liu X, Wang G, Li Q, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. Journal of translational medicine. 2009;7:26.
133. Anichkina A, Kulenich T, Zinchenko S, Shagina I, Polyakov A, Ginter E, et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. European journal of human genetics : EJHG. 2001;9(2):151.
134. Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, et al. GJB2 (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. Otology & neurotology : official publication of the American

Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2001;22(6):858-61.
135. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. BMC medical genetics. 2001;2:5.
136. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. Clinical genetics. 2003;64(1):65-9.
137. Toth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, et al. GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. Human mutation. 2004;23(6):631-2.
138. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, et al. Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2002;65(2):101-8.
139. L. Varga IM, M. Hučková, Z. Kabátová, D. Gašperíková, I. Klimeš, M. Profant. Prevalence of DFNB1 mutations among cochlear implant users in Slovakia and its clinical implications. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2013;271(6):1401-7.
140. Mahdieh N, Rabbani B, Shirkavand A, Bagherian H, Movahed ZS, Fouladi P, et al. Impact of consanguineous marriages in GJB2-related hearing loss in the Iranian population: a report of a novel variant. Genetic testing and molecular biomarkers. 2011;15(7-8):489-93.
141. Leveque M, Schmidt P, Leroux B, Danvin JB, Langagne T, Labrousse M, et al. Universal newborn hearing screening: a 27-month experience in the French region of Champagne-Ardenne. Acta paediatrica. 2007;96(8):1150-4.
142. Hoefsloot LH RA, Bitner-Glindzicz M. Best Practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the DFNB1 locus. Eur J Hum Genet 2013;May 22. doi: 10.1038/ejhg.2013.83.
143. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2002;4(4):258-74.
144. Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi M, Murgia A. Molecular genetics applied to clinical practice: the Cx26 hearing impairment. British journal of audiology. 1999;33(5):291-5.
145. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. Hum Genet. 2000;106(1):50-7.

146. Loffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Menzel HJ, Utermann G, et al. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. European journal of human genetics : EJHG. 2001;9(3):226-30.
147. Kenna MA, Feldman HA, Neault MW, Frangulov A, Wu BL, Fligor B, et al. Audiologic phenotype and progression in GJB2 (Connexin 26) hearing loss. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2010;136(1):81-7.
148. Kim SY, Park G, Han KH, Kim A, Koo JW, Chang SO, et al. Prevalence of p.V37I variant of GJB2 in mild or moderate hearing loss in a pediatric population and the interpretation of its pathogenicity. PloS one. 2013;8(4):e61592.
149. Huculak C, Bruyere H, Nelson TN, Kozak FK, Langlois S. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity. American journal of medical genetics Part A. 2006;140(22):2394-400.
150. Wattanasirichaigoon D, Limwongse C, Jariengprasert C, Yenchitsomanus PT, Tocharoenthanaphol C, Thongnoppakhun W, et al. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. Clinical genetics. 2004;66(5):452-60.
151. Chan DK, Schrijver I, Chang KW. Connexin-26-associated deafness: phenotypic variability and progression of hearing loss. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2010;12(3):174-81.
152. Palmada M, Schmalisch K, Bohmer C, Schug N, Pfister M, Lang F, et al. Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment. Neurobiology of disease. 2006;22(1):112-8.
153. Chai Y, Chen D, Sun L, Li L, Chen Y, Pang X, et al. The homozygous p.V37I variant of GJB2 is associated with diverse hearing phenotypes. Clinical genetics. 2014.
154. Mueller RF, Nehammer A, Middleton A, Houseman M, Taylor GR, Bitner-Glindzciz M, et al. Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 1999;50(1):3-13.
155. RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar HM, Jalvi R, Rangasayee R, et al. Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. Journal of medical genetics. 2003;40(5):e68.

156. Liu XZ, Pandya A, Angeli S, Telischi FF, Arnos KS, Nance WE, et al. Audiological features of GJB2 (connexin 26) deafness. Ear and hearing. 2005;26(3):361-9.
157. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Teagle HF, Tomblin BJ, Spencer LJ, et al. Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. American journal of medical genetics. 2002;109(3):167-70.
158. Minarik G, Tretinarova D, Szemes T, Kadasi L. Prevalence of DFNB1 mutations in Slovak patients with non-syndromic hearing loss. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2012;76(3):400-3.
159. Tarkan O, Sari P, Demirhan O, Kiroglu M, Tuncer U, Surmelioglu O, et al. Connexin 26 and 30 mutations in paediatric patients with congenital, non-syndromic hearing loss treated with cochlear implantation in Mediterranean Turkey. The Journal of laryngology and otology. 2013;127(1):33-7.
160. Chen P, Chen H, Fu S, Chen G, Dong J. Prevalence of GJB6 mutations in Chinese patients with non-syndromic hearing loss. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2012;76(2):265-7.
161. Batissoco AC, Abreu-Silva RS, Braga MC, Lezirovitz K, Della-Rosa V, Alfredo T, Jr., et al. Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. Ear and hearing. 2009;30(1):1-7.
162. Laboratories A. Hearing Loss Panel, Nonsyndromic (GJB2) Sequencing, (GJB6) 2 Deletions and Mitochondrial 2 Mutations 2009. Available from: http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Hearing Loss Panel Nonsyndromic (GJB2) Sequencing.pdf.