

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

---

**Д-Р ИГЛИКА ПЕТРОВА СТАНЧЕВА**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор”

**Научна специалност: ото-рино-ларингология**

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

РЕЦЕНЗЕНТИ: проф. д-р Дичо Димов, д.м.н.

доц. д-р Соня Върбанова, д.м.

**СОФИЯ**

**2015**

Дисертационният труд е написан на 175 страници и е онагледен със 73 фигури и 17 таблици.

Библиографският списък съдържа 162 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по ушни, носни и гърлени болести при Медицински факултет на Медицински университет – София на 01.10.2014 г., съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на **6 март 2015 г. от 13.00 часа** в аудиторията на Клиниката по УНГ болести, УМБАЛ «Царица Йоанна – ИСУЛ» ЕАД, съгласно чл.76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на заповед N РК 36-2716/26.11.2015 г. на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

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

Членове:

1. проф.д-р Дичо Димов, д.м.н. – външен член и рецензент
2. доц.д-р Соня Върбанова, д.м. - вътрешен член и рецензент
3. проф.д-р Румен Бенчев, д.м.н. - външен член
4. доц.д-р Диляна Вичева, д.м. – външен член

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ – София и са на разположение в Катедра по УНГ болести при Медицински факултет на Медицински университет – София.

\*Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

## **СЪДЪРЖАНИЕ:**

<b>1</b>	<b>Въведение</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Цел, задачи, материали и методи</b> .....	<b>6</b>
2.1.1	Цел.....	6
2.1.2	Задачи.....	6
2.1.3	Материали.....	7
2.1.4	Методи на изследванията.....	8
<b>3</b>	<b>Резултати</b> .....	<b>17</b>
3.1	<b>Създаване на клинична база данни и разширяване на ДНК биобанката на пациенти с несиндромна слухова загуба</b> .....	<b>17</b>
3.2	<b>Генетичен анализ за наличие на мутации и/или полиморфизми в GJB2 и GJB6, кодиращи конексин 26 и конексин 30</b> .....	<b>20</b>
3.2.1	Генетичен анализ за носителство на мутации и полиморфизми в connexin 26	20
3.2.2	Генетичен анализ за носителство на мутации и полиморфизми в connexin 30	23
3.3	<b>Корелационен анализ между клиничното протичане на несиндромната слухова загуба и установените мутации в гените, кодиращи конексин 26 и конексин 30 (генотип – фенотип корелации)</b> .....	<b>23</b>
3.3.1	Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, свързана с увреда на конексин 26 .....	24
3.3.2	Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на конексин 30.....	45
3.4	<b>Клинична характеристика и аудиологичен профил на пациентите с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26</b> .....	<b>45</b>
3.5	<b>Роля на генетичното изследване за мутации в конексин 26 и конексин 30 в семейното планиране</b> .....	<b>46</b>
3.5.1	Генетична консултация.....	46
3.5.2	Пренатална диагностика.....	47
3.5.3	Препоръки за провеждане на генетичен слухов скрининг за GJB2.	47
<b>4</b>	<b>Обсъждане</b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Изводи</b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Приноси</b> .....	<b>62</b>

# 1 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. Деца 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 генетичен 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, свързана с 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 скрининг.

## **2 Цел, задачи, материали и методи**

### **2.1.1 Цел**

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

### **2.1.2 Задачи**

1. Клиничен подбор на пациенти с несиндромна 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.

## **2.1.3 Материали**

### **2.1.3.1 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 проведеха 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.

### **2.1.3.2 Критерии за включване на пациентите в изследването**

- Деца и възрастни, независимо възрастта, пола и етническата им принадлежност
- Двустранно звукоприемно намаление на слуха, независимо 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)

### **2.1.3.3 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<sub>3</sub>EDTA като антикогулант. Кръвта се взема от 30 мин. до 1 час след хранене и се съхранява при + 4°C в продължение на максимум 48 часа.

## **2.1.4 Методи на изследванията**

### **2.1.4.1 Клинични методи**

#### *2.1.4.1.1 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 – антибиотици, 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.

#### *2.1.4.1.2 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.

#### 2.1.4.2 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.

##### 2.1.4.2.1 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 kHz. 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 естеството на проучването.

**Табл. 1 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**

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

#### *2.1.4.2.2 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, осигуларната 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.

#### *2.1.4.2.3 Отоакустични емисии*

Въведени са като диагностичен тест в практиката през 1987 година от David Kemp. Използвани са транзитни (случайни) евокирани отоакустични емисии (ТЕОАЕ). 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 ТЕОАЕ и следователно със слухова невропатия.

#### *2.1.4.2.4 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 Interacoustics 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 следствие те взаимно да се интерпретират. ССЕР 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.

#### *2.1.4.2.5 Auditory Steady-State Response testing (ASSR)*

Представява електрофизиологично изследване на слуха. Повърностните електроди измерват фазовия слухов отговор при постоянен непрекъснат тонален сигнал. Стимулт е с усреднени нива на звуковото налягане, по-високи от използваните нива при ССЕР. При ASSR се определят очакваните нива на чувствителност.

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.

#### **2.1.4.3 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.

#### **2.1.4.4 Генетични методи**

За да се извърши генетичният анализ беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. Генетичните изследвания се осъществиха в Центъра по молекулярна 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:

#### *2.1.4.4.1 Изследване за носителство на мутации в connexin 26*

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

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 праимерите 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 праимери (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 денатурираща 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 37°C и 15 минути на 80°C за инактивиране на двата ензима. Пречистените проби могат да се съхраняват на -80 °C или -20 °C.

- ✓ **Секвенционна реакция.** Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1 (Applied Biosystems) включва ДНК – полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията

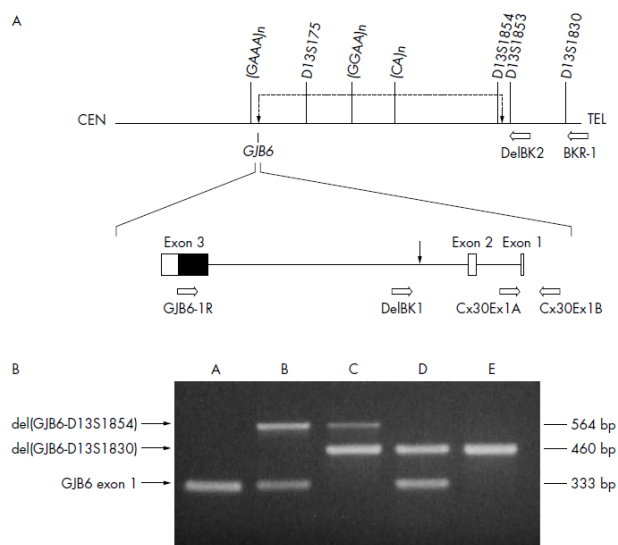
праймери. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация и се провежда при следните температурни условия:

95°C – 3 мин.	}	25 цикъла
95°C – 20 сек.		
55°C – 20 сек.		
72°C – 3 мин.		
72°C – 3 мин.		

- ✓ Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя 3М 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 формаид.

#### 2.1.4.4.2 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. 1** Генетичен тест за детекция на del(GJB6-D13S1830) и del(GJB6-D13S1854). (66)

#### 2.1.4.5 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: Independent Samples T – test, One – Way ANOVA с post hoc tests, Duncan и непараметричните тестове при различно от нормалното разпределение: тест на Kolmogorov – Smirnov, Pearson'  $\chi^2$  - test, тест на Mann – Whitney, тест на Kruscal – Wallis.

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

### 3 Резултати

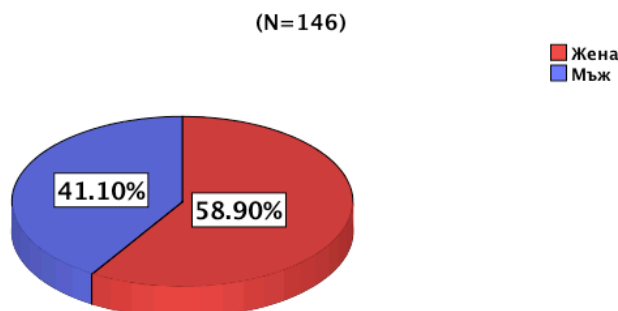
Изследваният клиничен контингент включва 146 пациенти, потърсили лекарска помощ поради проблеми със слуха. За съжаление голяма част от глухите родители отказват да изследват децата си, които също са с увреден слух, дори и да ги лекуват. Така последните остават в средата на глухите.

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

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

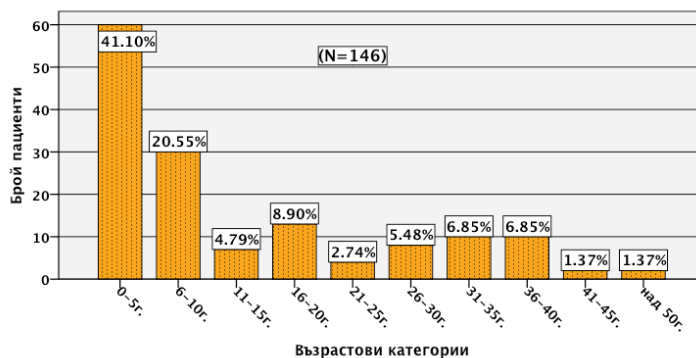
Позовавайки се на критериите за включване, бяха привлечени 146 пациенти с двустанна несиндромна невросензорна загуба на слуха с неясна етиология, без други аномалии в организма и без отклонения в локалния УНГ статус.

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



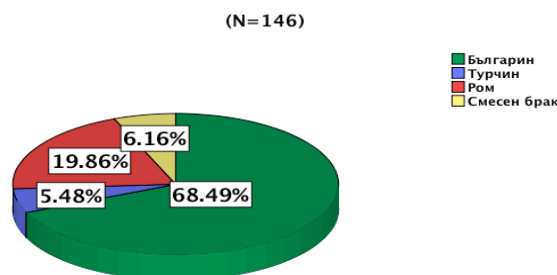
**Фиг. 2** Разпределение на пациентите по пол

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%.



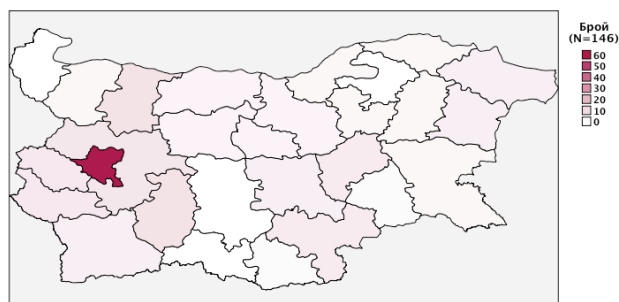
**Фиг. 3** Разпределение на пациентите по възраст

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. 4** Разпределение на пациентите 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%).

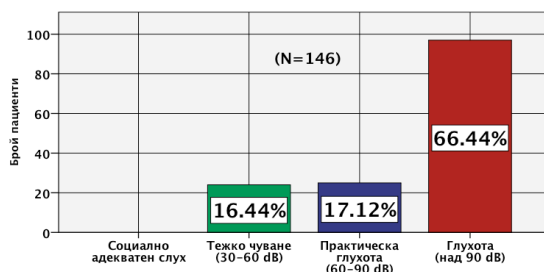


**Фиг. 5** Разпределение на пациентите по региони в България

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

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

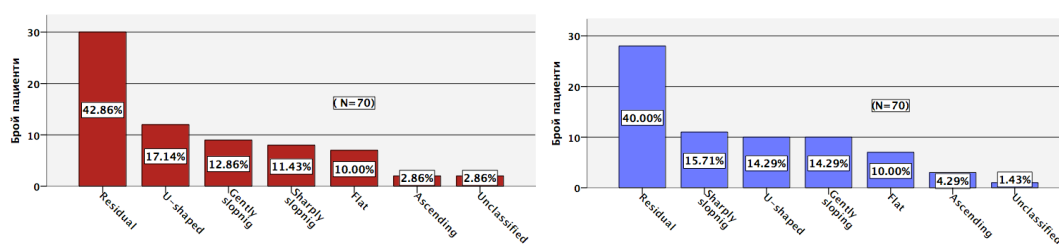
Подбрани са пациенти с различни степени на слухова увреда.



**Фиг. 6 Ниво на слуховата увреда на пациентите според Българската класификация**

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)

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.



**Фиг. 7 Видове аудиометрични криви на дясно (в червено) и ляво (в синьо) ухо – класификация на Liu и Xi**

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.

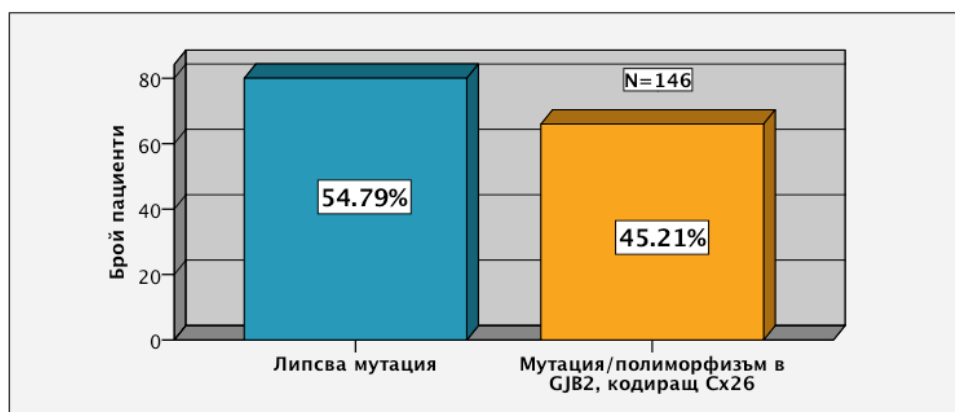
На пациентите с поставен кохлеарен имплант предоперативно е направена компютърна томография. Всичките 68 пациенти са с нормално развито вътрешно ухо, без аномалии.

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

След установяване на слуховата 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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.

### 3.2.1 Генетичен анализ за носителство на мутации и полиморфизми в connexin 26

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. 8 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. 2 Установени мутации и/или полиморфизми в Cx26 (IC1 – интрацелуларна примка 1; IC2 – интрацелуларна примка 2; TM1 – трансмембранен домен 1; TM2 – трансмембранен домен 2)**

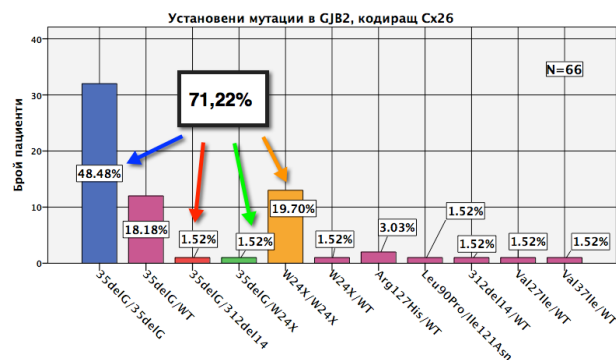
<i>Нуклеотидна промяна</i>	<i>Белтъчна промяна</i>	<i>Алелна честота</i>	<i>Домен (107)</i>	<i>Вид мутация</i>	<i>Truncating (T)/ Nontruncating (NT)</i>
c.35delG	p.G12fsX13	26.71%	IC1	Frameshift	T
c.71G>A	p.W24X	9.5%	TM1	Nonsense	T
c.312del14	p.K105fsX109	0.68%	IC2	Frameshift	T
c.109G>A	p.Val37Ile	0.34%	TM1	Missense	NT
c.269 T>C	p.Leu90Pro	0.34%	TM2	Missense	NT
c.362T>A	p.Ile121Asn	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

**Табл. 3 Установени генотипове в GJB2, кодиращ Cx26**

<i>Вид мутация в гена, кодиращ Cx26</i>	<i>Брой пациенти (N)</i>	<i>Процент от всички пациенти (N=146)</i>	<i>Процент от пациентите с мутации в GJB2 (N=66)</i>
c.35delG/c.35delG	32	21.9%	48.48%
c.35delG/WT	12	8.2%	18.18%
c.35delG/c.312del14	1	0.7%	1.52%
c.35delG/p.W24X	1	0.7%	1.52%
p.W24X/p.W24X	13	8.9%	19.7%
p.W24X/WT	1	0.7%	1.52%
p.Arg127His/WT	2	1.4%	3.03%
p.Leu90Pro/p.Ile121Asn	1	0.7%	1.52%
c.312del14/WT	1	0.7%	1.52%
p.Val27Ile/WT	1	0.7%	1.52%
p.Val37Ile/WT	1	0.7%	1.52%

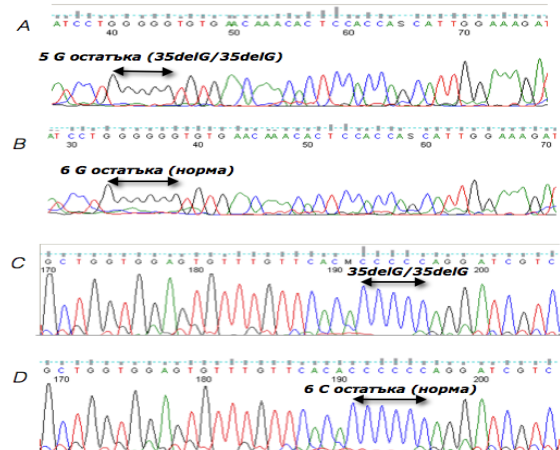
В изследвания контингент е установена (при групата пациенти, събрани при изследването от 2009/2010 година) непубликувана до момента в световен мащаб мутация p.Ile121Asn при пациент с несиндромна слухова увреда и то в хетерозиготно състояние p.Leu90Pro/p.Ile121Asn.

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:

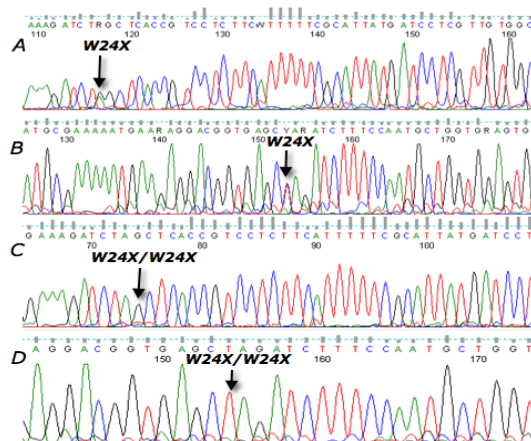


**Фиг. 9 Видове мутации и/или полиморфизми, установени в GJB2, кодиращ Cx26. Посочените със стрелки мутации водят до генетична несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Cx26**

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



**Фиг. 10 Електрофореграми, показващи пациент с мутацията с.35delG в хомозиготно състояние и пациент без мутацията. А) и С) секвенции, показващи мутацията с.35delG с праймер Cx26 1F и Cx26 2R съответно; В) и D) секвенции на пациент, при който не се наблюдава мутацията с.35delG, направени с Cx26 1F и Cx26 2R**



**Фиг. 11** Електрофореграми на пациент с мутацията p.W24X в хетерозиготно (А и В) и в хомозиготно (С и D) състояние. А) и С) Секвенция получена с Sx26 1F праймер; В) и D) Секвенция получена с Sx26 2R праймер

Двама от пациентите с генетична, Sx26 свързана глухота, се оказаха комплексни хетерозиготи, съответно с c.35delG/c.312del14 (1.52%) и c.35delG/p.W24X (1.52%).

Двата полиморфни варианта p.Arg127His и p.Val27Ile нямат значимост за клиничното протичане.

### **3.2.2 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 Sx30. 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.

### **3.3 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.

### **3.3.1 Клинико – генетични корелации на несиндромната слухова загуба, свързана с 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

#### **3.3.1.1 Разпределение на пациентите с несиндромна слухова загуба, свързана с увреда на Cx26 по пол**

57.4% пациентите са жени, а 42.6% са мъже. Анализът на разпределението на пациентите по пол, използвайки метода  $\chi^2$ , не установи връзка между наличието на мутации и/или полиморфизми в Cx26 и пола на пациентите (Pearson chi square  $p=0.469$ ).

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

#### **3.3.1.2 Разпределение на пациентите с несиндромна слухова загуба, свързана с увреда на Cx26 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. 4** Разпределение на пациентите в зависимост от вида установена мутация и/или полиморфозъм в Сх26 и етническата принадлежност

	<i>Етническа принадлежност</i>				<i>Общ брой (% от общия брой)</i>
	<i>Българин (n=100)</i>	<i>Турчин (n=8)</i>	<i>Ром (n=29)</i>	<i>Смесен брак (n=9)</i>	
<i>c.35delG/c.35delG</i>	25 (17.1%)	4 (2.7%)	0	3 (2.1%)	32 (21.9%)
<i>c.35delG/WT</i>	12 (8.2%)	0	0	0	12 (8.2%)
<i>c.35delG/c.312del14</i>	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
<i>c.35delG/p.W24X</i>	0	0	1 (0.7%)	0	1 (0.7%)
<i>p.W24X/p.W24X</i>	0	0	13 (8.9%)	0	13 (8.9%)
<i>p.W24X/WT</i>	0	0	0	1 (0.7%)	1 (0.7%)
<i>p.Arg127His/WT</i>	0	0	2 (1.4%)	0	2 (1.4%)
<i>p.L90P/p.Ile121Asn</i>	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
<i>c.312del14/WT</i>	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
<i>p.Val27Ile/WT</i>	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
<i>p.Val37Ile/WT</i>	1 (0.7%)	0	0	0	1 (0.7%)
<i>Липсва мутация</i>	58 (39.7%)	4 (2.7%)	13(8.9%)	5 (3.4%)	80 (54.8%)
<i>Общо:</i>	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 ѝ вариант води до генетична глухота, поради увреда на Сх26 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 доказва делеции при този пациент.

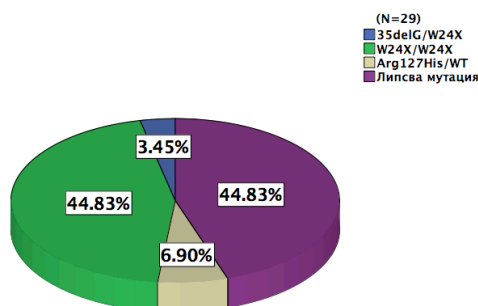
Мутациите p.Leu90Pro (1%) и p.Ile121Asn (1%) установихме едновременно при един пациент от български произход. Той е комплексен хетерозигот. Най – вероятно тези две мутации са причина за глухотата при него. Необходимо е да бъдат извършени молекулярни изследвания на новооткритата p.Ile121Asn мутация, доказващи връзката ѝ 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.

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

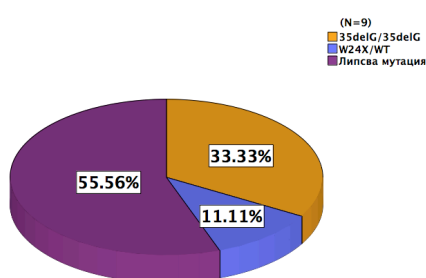
В настоящето изследване са включени 29 пациенти от ромски етнически произход. Мутациите, която бяха наблюдавани при тях са p.W24X, c.35delG и p.Arg127His. Генетична причина за възникването на несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Sx26 в тази група се откри при 48.2% (14/29). Това са пациентите с p.W24X/p.W24X, както и комплексният хетерозигот c.35delG/p.W24X. Другите двама са носители на полиморфния вариант p.Arg127His/WT.



**Фиг. 12** Резултати от генетичното изследване сред пациентите с ромски етнически произход

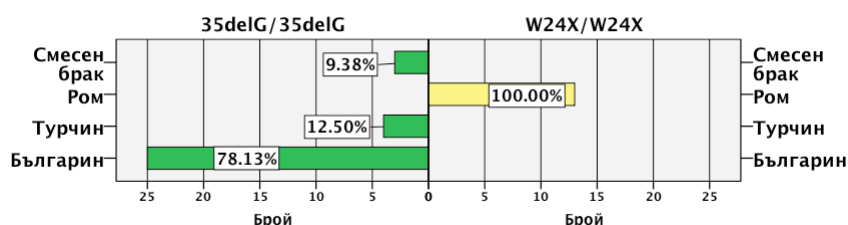
Втората по честота мутация в ромската група е p.Arg127His. Доказана е при двама души (при 6.9% от ромската група или 1.4% от цялата ни популация) и то в хетерозиготно състояние.

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 Sx26, 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).



**Фиг. 13** 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.

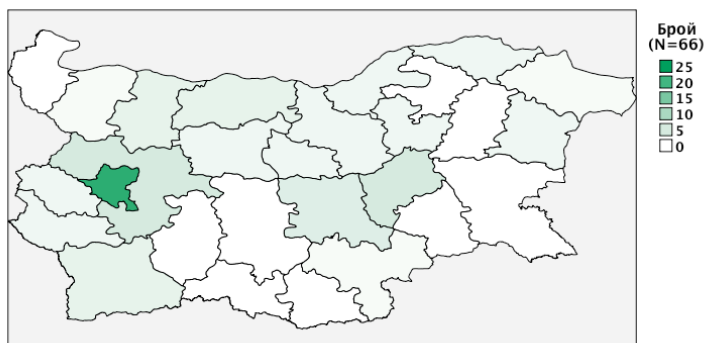


**Фиг. 14** Сравнение между пациентите с c.35delG/c.35delG и p.W24X/p.W24X по етническа принадлежност

### 3.3.1.3 Разпределение на пациентите по региони в България

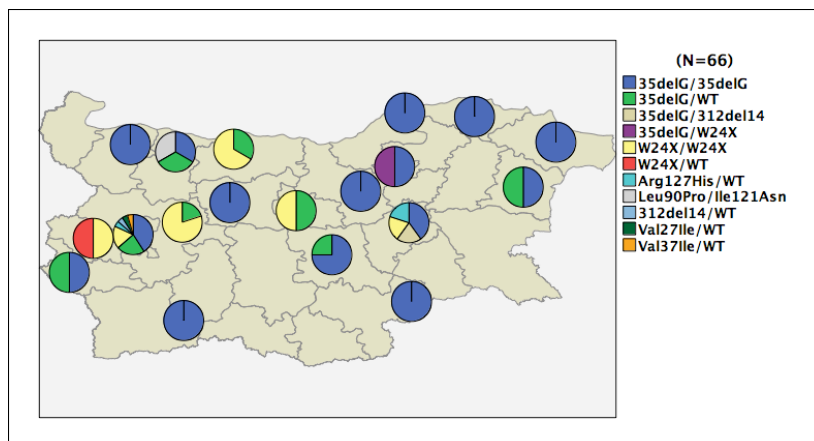
Събраният контингент за това изследване е от цялата страна, но най – голям е броят на пациентите с мутации и/или полиморфизми в Sx26 от София – град 22

(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. 15** Разпределение на пациентите с установени мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26 по региони в България

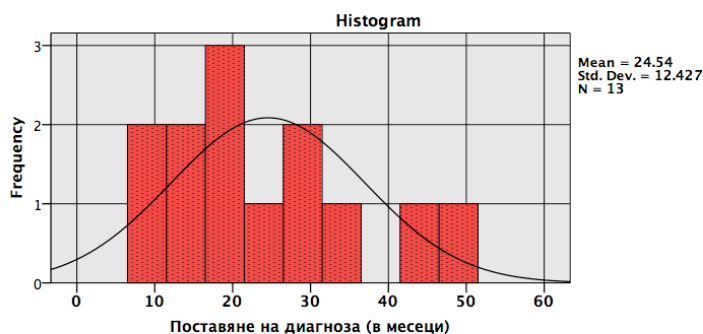
Докато мутацията с.35delG/c.35delG е почти равномерно разпределена на територията на нашата страна, като челно място заема София – град, следван от Стара Загора и Благоевград, то р.W24X/p.W24X се среща предимно в София – град, София – област, Плевен, Габрово, Перник и Сливен. Двамата комплексни хетерозиготи с.35delG/p.W24X и с.35delG/c.312del14 са съответно от Търговище и Сливен.



**Фиг. 16** Разпределение на пациентите с мутации и/или полиморфизми в GJB2, кодиращ Cx26 по региони в България

### 3.3.1.4 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. 17 Възраст на поставяне на диагнозата генетична слухова загуба, резултат от увреда на Сх26**

Средната възраст на поставяне на диагнозата слухова загуба без генетични увреди в Сх26 (n=13) е 18.69 месеца.

**Табл. 5 Възраст на поставяне на диагнозата несиндромна слухова загуба при пациентите с и без генетични увреди в Сх26**

	<i>Пациенти с несиндромна СЗ, резултат от увреда на Сх26</i>	<i>Пациенти със СЗ, но без установени генетични промени в Сх26</i>
<i>N</i>	13	13
<i>Средна възраст (в месеци)</i>	24.54	18.69
<i>Поставяне на диагноза (в месеци)</i>		
<i>Минимум</i>	9	3
<i>Максимум</i>	50	44
<i>Медиана</i>	21.00	12.00
<i>Мода</i>	20	12
<i>Стандартно отклонение</i>	12.427	11.996

Представената по – горе таблица показва забавеното откриване 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.

### 3.3.1.5 Начало на слуховата увреда, свързана с увреда на Cx26

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).

**Табл. 6 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	<b>78.9%</b>	4	<b>21.1%</b>		
обясняващи слуховата загуба	47	27	<b>57.4%</b>	20	<b>42.6%</b>		

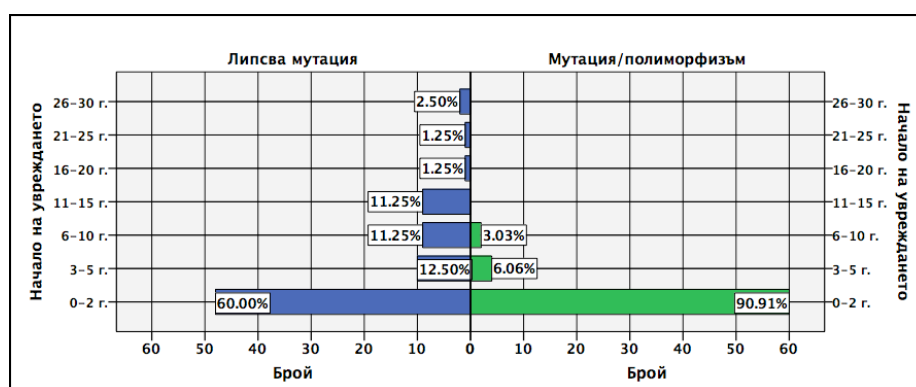
63.6% от пациентите с промени в Cx26 съобщават за вродено увреждане (n=66), а 71.3% от пациентите без мутации в Cx26 началото на слуховата загуба е от раждането до 30 годишна възраст. Констатирахме статистически значима разлика (p=0.000) в началото на слуховата увреда при пациентите с (n=66) и без мутации (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 предизвикват ранна увреда на слуховата функция.

При 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 скрининг в България би спестило време и разходи на тези родители и на държавата и най – важното навременно лечение на глухите деца.

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. 18** 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%.

Анализирайки данните по вид мутации, 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.

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

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

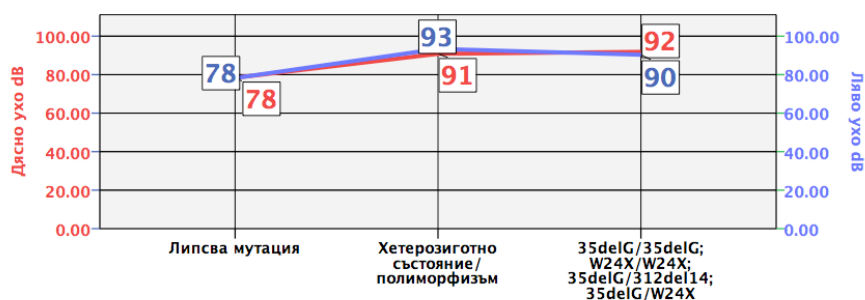
### **3.3.1.6 Начало на слуховата увреда, свързана с увреда на Cx26 спрямо говорното развитие**

Анализът на този показател е направен на база на анамнестичните данни от пациентите. 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)

### **3.3.1.7 Средна слухова загуба в dB**

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



**Фиг. 19 Средна слухова загуба в dB на дясно (в червено) и ляво (в синьо) ухо на изследваните 146 пациенти, разделени в зависимост от резултатите от генетичните изследвания**

Средната слухова загуба на по – добре чуващото ухо при пациентите със слухова загуба, свързана с 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. 7 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

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 с.35delG/с.35delG, както и двамата комплексни хетерозиготи с генетична глухота с.35delG/с.312del14 и с.35delG/р.W24X, имат средната слухова загуба над 91dB, докато при р.W24X/р.W24X едва 61.6%. Използвайки теста One way ANOVA test 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 ( $p = 0.027$ ).

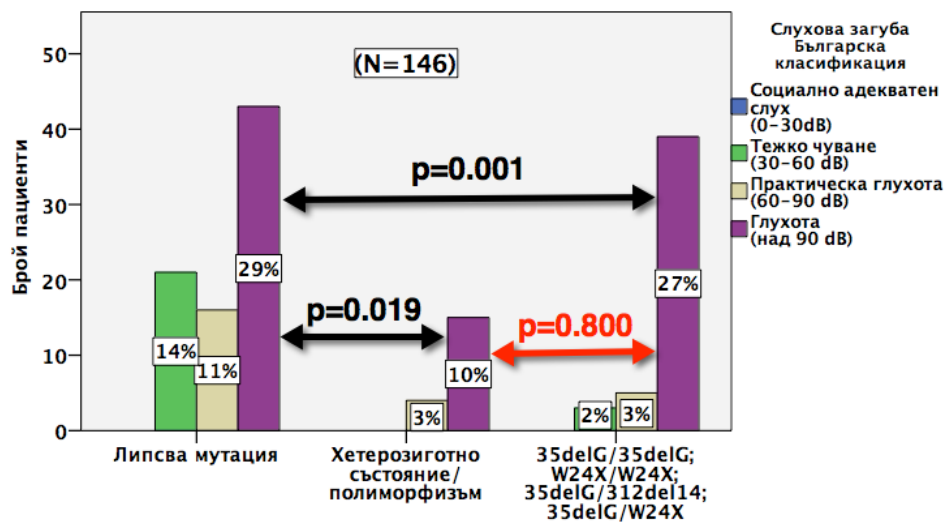
В нашата популация пациентите с c.35delG/c.35delG имат по – тежко засягане на слуховата функция (mean=93.38dB) от носителите на p.W24X/p.W24X (mean=81.85dB). Средна слухова загуба над 94.58dB имат и хетерозиготните пациенти с c.35delG/WT.

### **3.3.1.8 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 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.

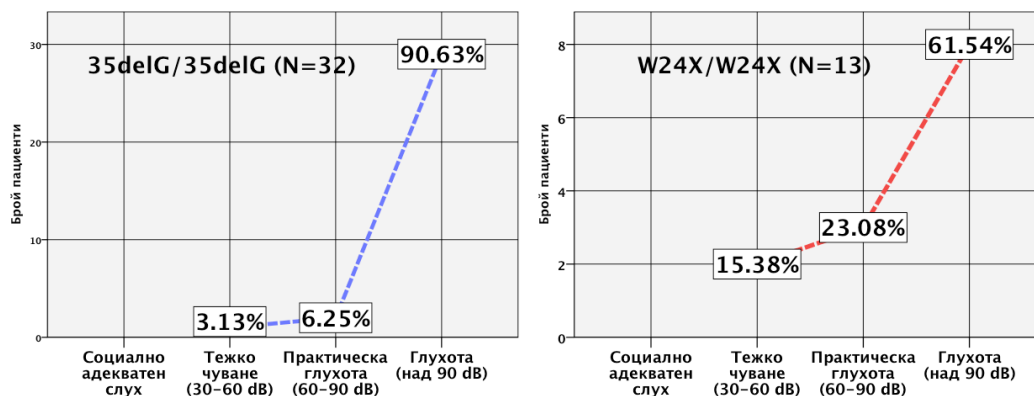
В представеното изследване тежестта на слуховата уреда е изчислена спрямо четирите посочени класификации, но за анализа и съпоставката с проучвания на чужди автори е използвана класификацията на Европейската работна група по генетични слухови увреждания (European Working Group on genetic hearing impairments), 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  $p=0.019$ ).



**Фиг. 20** Ниво на слуховата загуба според Българската класификация

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



**Фиг. 21** Разпределение на пациентите с с.35delG/с.35delG и р.W24X/р.W24X според нивото на слуховата увреда спрямо Българската класификация

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

**Табл. 8** Разпределение на пациентите с и без увреда в Cx26 спрямо тежестта на слухова загуба според European Working Group on genetic hearing impairments

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

Установихме статистически значима разлика в тежестта на слуховата увреда между пациентите с генетична слухова загуба, свързана с 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.

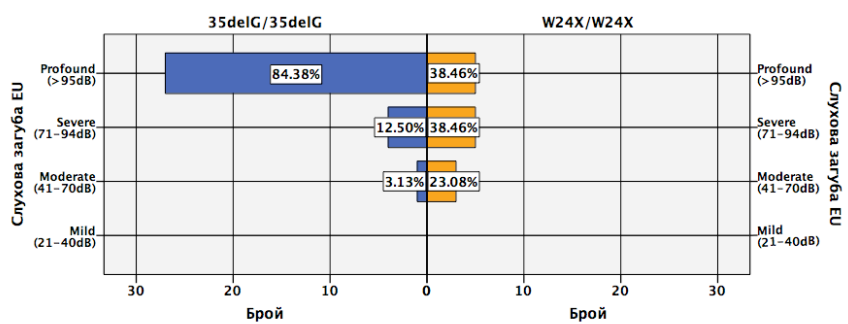
В групата на c.35delG/c.35delG 96.9% са с тежка към дълбока слухова загуба (severe 12.5% to profound 84.4%). Само един (3.1%) от нашите пациенти от тази група е с умерена (moderate) слухова загуба от 58.75dB.

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

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

Установихме статистически значима разлика в степента на слухова увреда между хомозиготните с.35delG и p.W24X. (p=0.002)



**Фиг. 22** Сравнение на степента на слуховата загуба според класификацията на European Working Group on genetic hearing impairments при двете хомозиготни мутации с.35delG и p.W24X в изследваната популация

### 3.3.1.9 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. 9** Симетричност на слуховата увреда при пациентите с увреди в Сх26

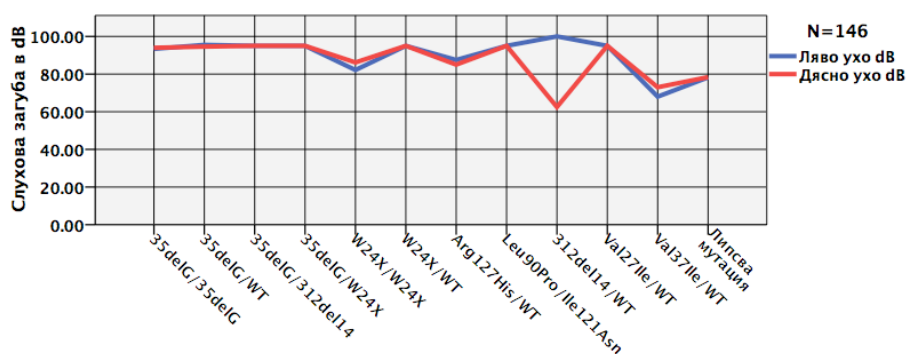
N=66	Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower				Upper
Средна слухова загуба Дясно ухо dB – ляво ухо dB	.33712	6.87533	.84629	-1.35305	2.02729	.398	65	.692

Асиметрична слухова загуба установихме при пациента с с.312del14/WT, с разлика между двете уши 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 при 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 Sx26 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 ѝ.

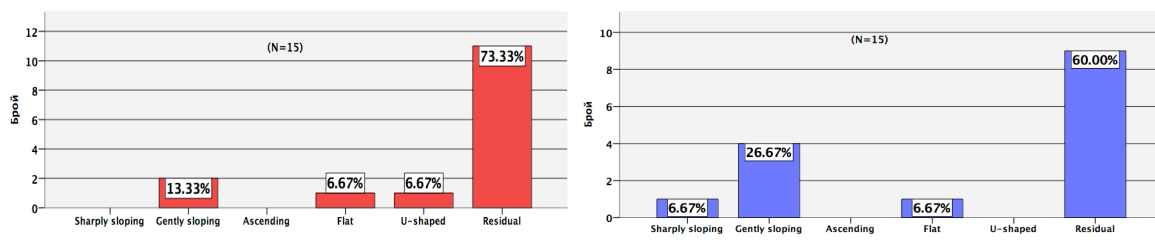


**Фиг. 23** Слухова загуба в dB за лявото (в синьо) и дясното (в червено) ухо при всички изследвани пациенти. Най – голяма асиметрия между двете уши се установява при пациента с c.312del14/WT – 37.5dB

### 3.3.1.10 Вид аудиометрична крива

От всичките 47 пациенти с несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на Sx26, 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. 24** Разпределение на пациентите с увреда на Сх26 в зависимост от вида на аудиометричната крива според класификацията на Liu Xi. Дясно ухо в червено, ляво ухо в синьо

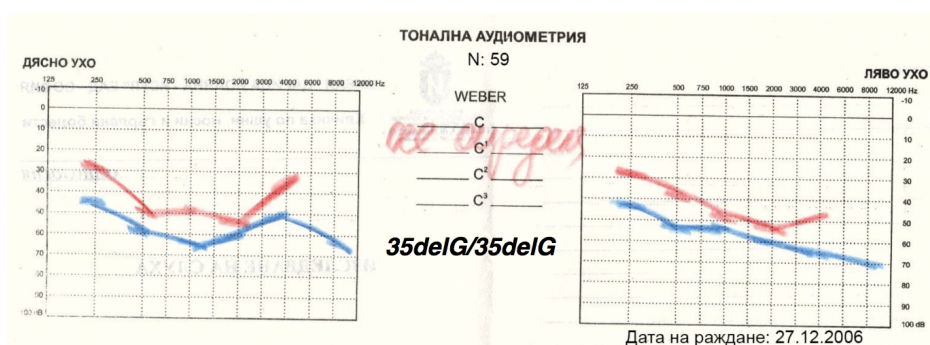
Установихме, че при 66.7% (10/15) от пациентите с генетична слухова загуба, свързана с увреда на Сх26, аудиометричните криви от тоналната прагова аудиометрия са симетрични за двете уши, като засягането на слуха е предимно за сметка на високите честоти.

При 48 пациенти (96 уши) без мутации в Сх26 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), неклассифицируеми (2.1%, едно ухо със зъбец на 4000Hz и едно с намаление за ниските и високите честоти и норма за средните).

**Табл. 10** Вид и честота на аудиометричните криви при пациентите с и без увреда в Сх26

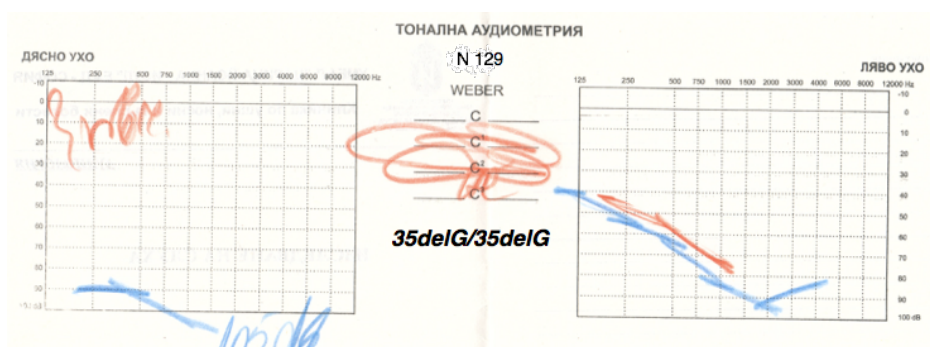
<i>Вид аудиометрична крива</i>	<i>Пациенти с Сх26 свързана СЗ (n=15, 30 уши)</i>	<i>Пациенти без увреда в Сх26 (n=48, 96 уши)</i>
<i>Residual</i>	66.67% (20 уши)	32.3% (31уши)
<i>Sharply sloping</i>	3.34% (1 ухо)	14.6% (14 уши)
<i>Gently sloping</i>	20% (6 уши)	11.45% (11 уши)
<i>Ascending</i>	-	5.25% (5 уши)
<i>Flat</i>	6.67% (2 уши)	12.5% (12 уши)
<i>U – shaped</i>	3.34% (1 ухо)	21.85% (21 уши)
<i>Unclassified</i>	-	2.1% (2 уши)

На 78.1% (25/32) от носителите на хомозиготната мутация c.35delG са направени ССЕРП, 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%).



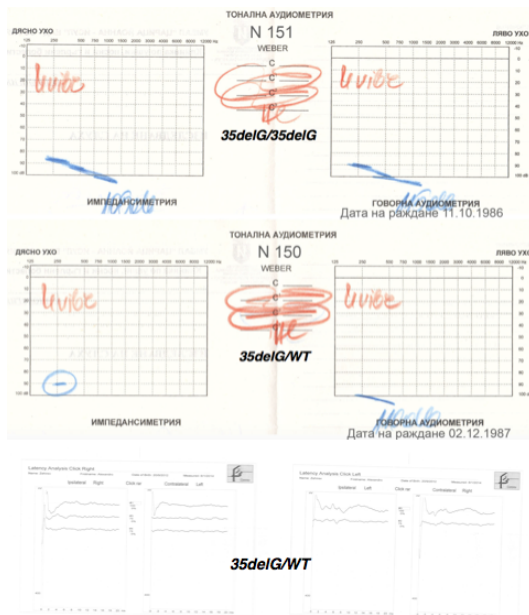
**Фиг. 25 Тонална прагова аудиометрия на пациентка от български произход с c.35delG/c.35delG**

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.



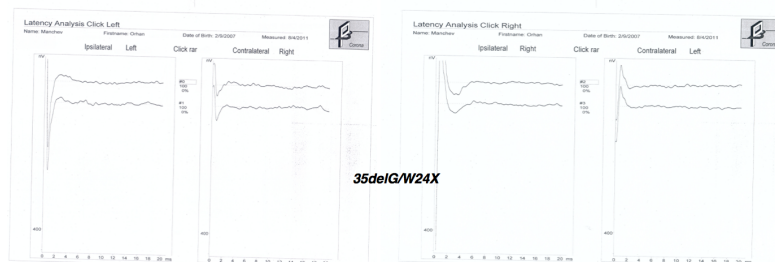
**Фиг. 26 Тонална прагова аудиометрия на пациент с c.35delG/c.35delG**

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. 27 ТПА на мъж с с.35delG/WT (№ 150) и жена с с.35delG/c.35delG (№ 151) и ССЕР на тяхното дете с с.35delG/WT (№ 149). Обяснения в текста.**

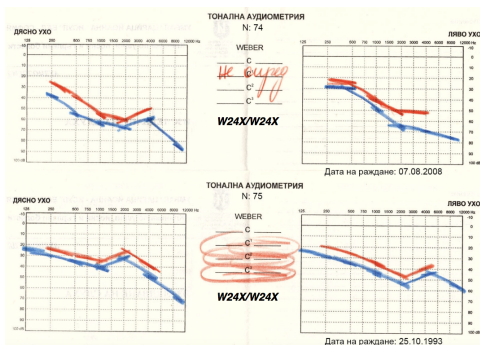
При дете от ромски произход с датираща от раждането глухота и глухоняма майка, беше установен комплексният хетерозиготен вариант с.35delG/p.W24X. Тези промени в Sx26 водят до генетична глухота при детето.



**Фиг. 28 ССЕР на момче от ромски произход с с.35delG/p.W24X**

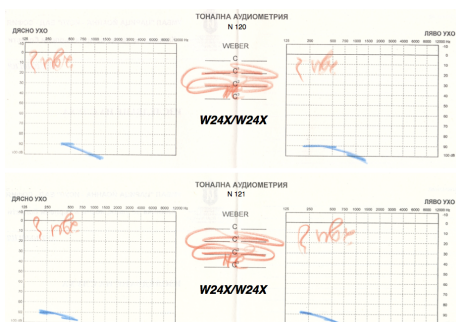
При 38.46% от пациентите с p.W24X/p.W24X (5/13) слуховият праг се диагностицира със ССЕР, а при останалите 61.5% (8/13) с тонална прагова аудиометрия. От тези 8 пациенти (16 уши) 50% (8 уши) са с аудиометрична крива, показваща остатъчен слух (residual), 31.25% (5 уши) са с плавно спускаща се за високите честоти (gently sloping), плоска при 12.5% (2 уши) и при 6.25% (едно ухо) 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, а при № 75 от около 10 годишна възраст. Следващата фигура показва нивото на слуховата им увреда .



**Фиг. 29 Тонална прагова аудиометрия на две момичета от ромски произход с р.W24X/р.W24X**

При изследването на друго ромско семейство беше установено, че причината за глухотата и на трите им деца е именно увреда на Sx26 – хомозиготната мутация р.W24X. При две от децата началото на увредения слух е от раждането (№ 120, 121), а при третото (№ 119) след 1 годишна възраст.



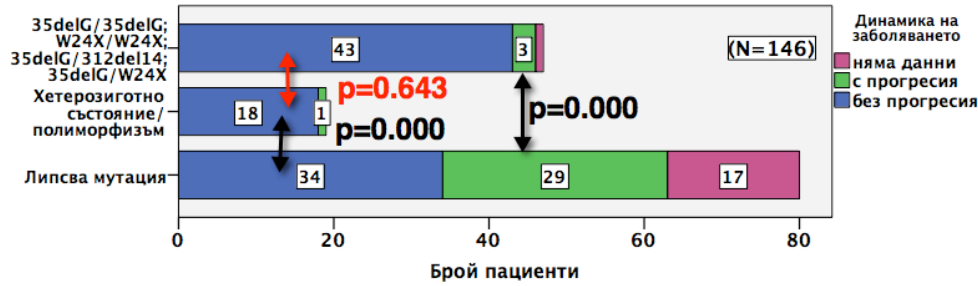
**Фиг. 30 Тонална прагова аудиометрия на брат (№ 120) и сестра (№ 121) от ромски произход с р.W24X/р.W24X**

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

### 3.3.1.11 Протичане на заболяването

Протичането на заболяването – с или без прогресия – беше интерпретирано на базата на амнестичните данни от 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 Sx26 съобщават за липса на прогресия в заболяването, докато при пациентите без мутации в Sx26 само 42.5%.



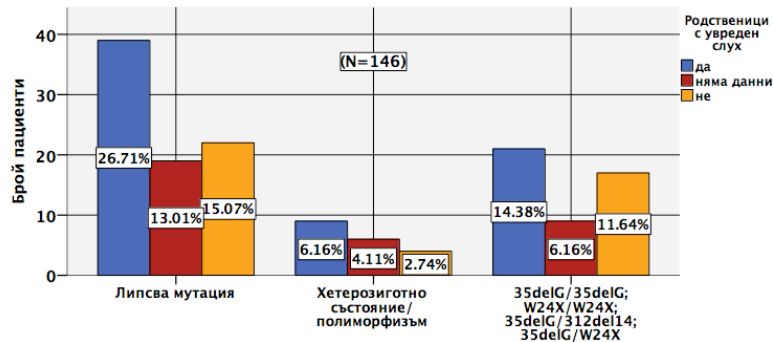
**Фиг. 31** Протичане на заболяването при пациентите с и без мутации и/или полиморфизми в Cx26

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

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

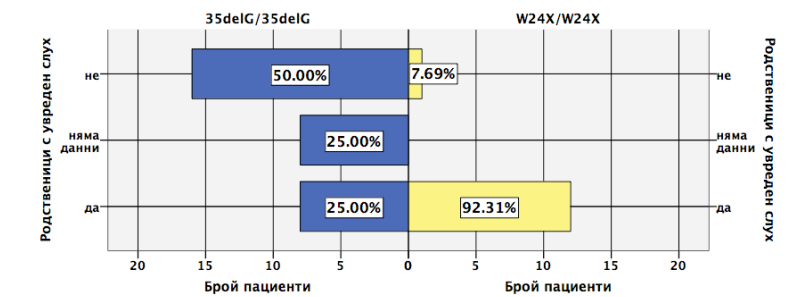
### 3.3.1.12 Родственици с увреден слух

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. 32** 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 с.35delG/c.35delG отричат или нямат точни данни за това.

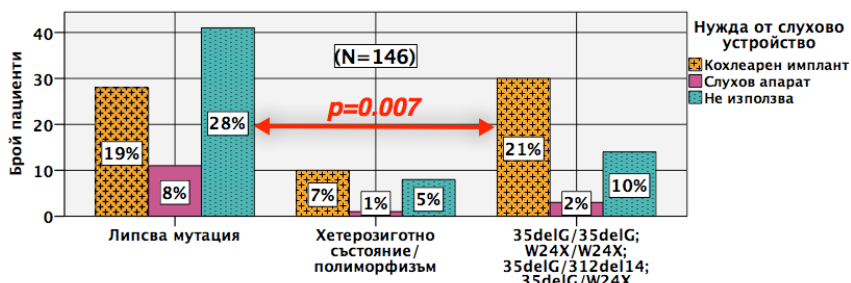


**Фиг. 33** Наличие на родственици с увреден слух при пациентите с с.35delG/с.35delG и р.W24X/р.W24X

### 3.3.1.13 Използване на кохлеарен имплант или слухов апарат

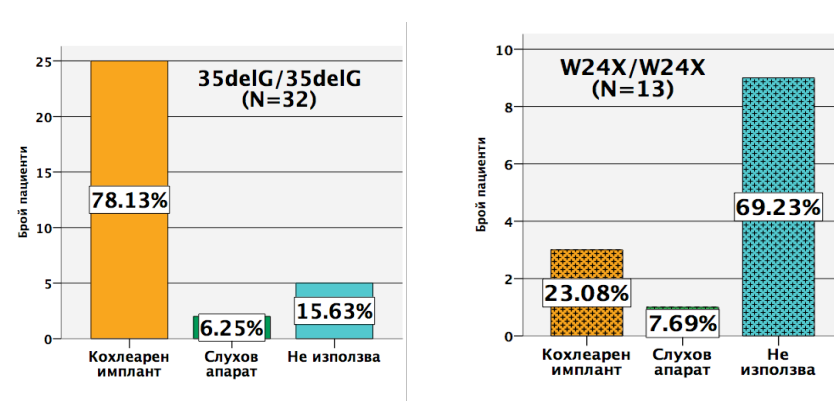
Тежкото засягане на слуховата функция при несиндромната слухова загуба, поради увреда на Сх26 предполага и употреба в по – голям процент на слухови апарати и кохлеарни импланти.

В изследваната популация се доказва статистически значима разлика между пациентите с и без увреди в Сх26 ( $p=0.007$ ) по отношение на нуждата от употреба на кохлеарен имплант или слухов апарат. Такава разлика, обаче не се установи между хетерозиготните и хомозиготните за Сх26 мутации ( $p=0.634$ ).



**Фиг. 34** Употреба на слухов апарат или кохлеарен имплант сред трите групи изследвани пациенти

По – тежкото засягане на слуха при нашите пациентите с с.35delG/с.35delG очаквано довежда до по – висок процент употреба на кохлеарни импланти (78.13%), докато при пациентите с р.W24X/р.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 р.W24X/р.W24X (едва 38.5% са със средна слухова загуба над 95dB, за разлика от 78.1% при с.35delG/с.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. 35** Употреба на кохлеарен имплант или слухов апарат при пациенти с хомозиготни мутации с.35delG и р.W24X

### 3.3.2 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 Сх30, 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.

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

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 с.35delG/c.35delG, както и при комплексните хетерозиготи с.35delG/p.W24X и с.35delG/c.312del14 се проявява най – късно до 2, а при р.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 с.35delG/c.35delG (90.6%) и за комплексните хетерозиготи с.35delG/p.W24X и с.35delG/c.312del14, а при р.W24X/p.W24X само за 61.5%.

Средната слухова загуба на по – добре чуващото ухо е 90.26dB, като пациентите с с.35delG/c.35delG (mean=93.38dB), с.35delG/c.312del14 и с.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 с.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 флукуации или прогресия при 96.6% от пациентите с с.35delG/c.35delG и при 76.9% от 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 Sx26 за нашата популация. То 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 с.35delG/c.35delG. 75% от пациентите с с.35delG/c.35delG отричат или нямат точни данни за това.

Тежкото засягане на слуховата функция при пациентите с увреда на Sx26 предполага и по – честата употреба на слухови апарти и/или кохлеарни импланти при 70.2%.

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

#### **3.5.1 Генетична консултация**

В изследваната от нас популация изследвахме няколко семейства със слухова увреда, при които впоследствие доказахме Sx26 свързана слухова загуба. На всички беше направена генетична консултация.

На един от пациентите с глухота от ранна детска възраст (№ 45), поради установена хомозиготна мутация c.35delG/c.35delG, направихме 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 доказва c.35delG, но в хетерозиготно състояние.

### **3.5.2 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 Sx26 и Sx30.

### **3.5.3 Препоръки за провеждане на генетичен слухов скрининг за GJB2**

От анализа на получените резултати установихме при 45.21% от пациентите промени в гена кодиращ Sx26. При 1/3 от изследваната популация причината за слуховата увреда са именно мутации в GJB2. Тежкото засягане на слуховата функция изисква ранна диагноза на тази увреда. Ето защо можем да дадем следните препоръки за провеждането на генетичен слухов скрининг:

- ✓ 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 предимно на високите честоти
- ✓ Други членове на семейството с намален слух (незадължително)

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.

## 4 Обсъждане

Несиндромната автозомно – рецесивна слухова загуба, свързана с увреда на Sx26 и Sx30 (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. (120)

В нашата популация увредата на Sx26 води при 32.19% от пациентите до слухова загуба в различна степен.

Над 220 мутации в Sx26 са асоциирани с глухота. c.35delG е най – срещаната мутация в Кавказката популация. По литературни данни тя може да достигне 70% от всички мутации в GJB2. (88) Може да се установи в хомозиготно или в комплексно хетерозиготно състояние (едновременно с друга мутация в GJB2 или GJB6).

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. (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% и Италия 2 – 4%. (56, 121-125)

c.35delG е най – срещаната мутация и сред нашите пациенти, поради увреда на Sx26 gap junction каналите в кохлеята. Откриваме я с алелна честота 26.71%. Единственото предходно българско изследване сред пациенти с несиндромна слухова увреда представя честота на хомозиготните за c.35delG 39% (20/51). (99) Причината за това е, че в началото са подбирани пациенти само с тежка и дълбока слухова загуба. Ние разширихме извадката, като включихме пациенти и с умерено и леко намаление на слуха. Събирането на по – разнородна група доведе до честота на хомозиготните c.35delG от 21.9% сред цялата популация (32/146).

Втората по честота мутация в Sx26, установена от нас е p.W24X. Тя води при 8.9% от пациентите до слухова загуба в различна степен. Високият процент се дължи най – вероятно на по – големия брой роми включени в изследването (29/146), тъй като тази мутация се среща при хора от ромски произход.

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 произхождат 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) Установяването 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. р.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 р.W24X носители от Европа и Азия ще помогне за разбирането на еволюционните корени на тази мутация.

Подобно на нашите резултати Lazar и сътрудници също установяват най – висока алелна честота за с.35delG (33%) и р.W24X (5.3%). В Централните и Югоизточните Европейски страни най-честите мутации отговорни за конгенитална загуба на слуха са с.35delG и р.W24X (15-55.8% и 2.5-4.3% съответно) (116)

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

с.312del14 е била докладвана и в други проучвания. В Словашката популация честотата ѝ е 1.89% (139), в Иранската популация е 1.94% (140). В нашето изследване алелната ѝ честотата е едва 0,68%. Установена е при двама пациенти, като единият е комплексен хетерозигот с.35delG/с.312del14 с генетична глухота, а при другия с.312del14/ WT.

Мутацията р.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 р.V37I. първоначално е докладвана от Kelley и сътрудници. (56) Авторският колектив е смятал, че този вариант е полиморфен и не води до развитието на слухова загуба. В последствие е бил описан от други изследователи като патогенна мутация. (107) Gallant et al. установява р.V37I при китайци, японци, вьетнамци, 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.

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 Sx26.

От проведено изследване 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 скрининг във френския регион Champagne – Ardenne, обхващаща всички родилни отделения в посочената област. Слуховият скрининг е проведен на две нива – ТЕОАЕ и автоматизирани ССЕР (АССЕР). 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 интервенират 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 – гинекологични клиники след заплащане.

В много държави, поради високата честота на несиндромната слухова загуба в резултат на увреждания на Sx26, 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 най – вероятно на ниската им честота у нас. Разширяването на извадката би доказало това. Според Hoefsloot скрининг за

носителство на мутации в гена, кодиращ Cx30, трябва да се осъществи за пациентите с открита само една или нито една мутация в GJB2. (142)

Предвид получените резултати, 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 скрининг ще улесни и отсее пациентите за генетичния.

GJB2 вариантите на слухова увреда в повечето изследвания се описват като прелингвални. Често обаче е невъзможно 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 загуба, свързана с увреда на Cx26, засяга възрастта под 10 години и показва, че началото на генетичната глухота е най – често в ранна детска възраст. 97.9% от 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 и генетичен слухов скрининг ще спомогнат да се диагностицира навреме несиндромната слухова загуба, свързана с увреда на Sx26 и Sx30. 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.

Слуховата загуба, асоциирана с различни увреди в Sx26, 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 мутации.

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

Truncating мутациите включват nonsense мутации, делеции, инсерции и дубликации, 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 nontruncating 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, свързана с 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 по – 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 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.35delG 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. 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 хомозиготната 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)

Изследването на Попова и колектив от 2012 година сред 51 пациенти с тежка към дълбока слухова загуба за мутации в GJB2, c.35delG е установена при 39% в хомозиготно състояние, а при 8% в хетерозиготно. По – високата честота се свързва с подбора на пациентите – всички те са с тежка или дълбока слухова увреда, която се оказва и 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 изследването на Nuculak 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)

В нашето изследване пациентът, при когото се открива мутацията p.V37I в хетерозиготно състояние е с умерена слухова загуба. Не открихме мутации в Sx30, 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)

През 2014 година Chai представя данни, че 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 представените по – горе. В наблюденията от нас контингентът 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 ѝ 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. (144)

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 аудиометрична 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 Sx26 тя се доказва два пъти по – често. Това можем да обясним с по – тежкото засягане на слуховата функция в тази група. Освен това при 66.7% аудиометричните криви на двете уши са симетрични. При пациентите без мутации в Sx26 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 Sx26 свързана слухова загуба са с остатъчен слух и намаление на слуха за високите честоти 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.

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 мутации в Sx26.

Тежкото засягане на слуховата функция, поради увреда на Sx26, 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 показва, 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 проучване информацията за протичането на заболяването (стабилно, прогресивно, с флукуации) 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 Martin прогресивното протичане на слуховата увреда е по – характерно за доминантните форми на несиндромната слухова загуба. (106)

В изследване на Kenna сред 128 деца с биалелни мутации 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. (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)

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 флукуация 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 ѝ 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 тежка към дълбока).

Необходимостта от по – продължително наблюдение на пациентите с различна степен на слухова увреда и ограничените данни в тази област до момента, предполагат Сх26 слухова увреда предимно с непрогресивно протичане.

Тежкото засягане на слуховата функция при пациентите с несиндромна слухова загуба, свързана с увреда на Сх26 и Сх30, 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 по – често е поставян кохлеарен имплант (78.1%) от p.W24X/p.W24X (23.08%).

Green установява, че пациентите с кохлеарен имплант, поставен поради слухова загуба дължаща се на увреда на Сх26, имат по – голямо подобрене в сравнение с пациентите с други конгенитални увреди на слуха. Това се обяснява с факта, че уврежданията са ограничени само във вътрешното ухо. (157)

За първи път в България беше изследван GJB6 гена, кодиращ конексин 30. Липсата на открити делеции 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 Сх30 варира от умерено до дълбоко (66, 79), а едновременното носителство на мутации в GJB2 и GJB6 води до по – тежко засягане на слуховата функция. (83, 161) Feldmann отбелязва също прогресия в слуховата увреда при генотип с делеция в GJB6. (83)

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 хетерозиготни пациенти с несиндромна слухова увреда имат делеции в гена GJB6, кодиращ Сх30. Хомозиготните или комплексните хетерозиготи за GJB6 са рядко срещани. (162)

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.

## 5 Изводи

1. Честота на мутациите и/или полиморфизми в гена GJB2, кодиращ конексин 26 е 45.21% сред изследваните пациенти с увреден слух. Установени са с.35delG, p.W24X, с.312del14, p.Leu90Pro, p.Val37Ile, както и два полиморфни варианта p.Arg127His и p.Val27Ile. Откритите хомозиготни мутации с.35delG и p.W24X са с честота 21.9% и 8.9%. съответно. Установена е нова, непубликувана в световната литература мутация при пациент с несиндромна слухова загуба – p.Ile121Asn. Мутацията с.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-D13S1854) 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 флукутация 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 Сх26 е невросензорна, ангажираща всички честоти, но с предимство за високите. Слуховата функция е засегната двустранно, симетрично, предимно в 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 слуховата загуба, поради увреда на Сх26. 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 Sx26.

## 6 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 клиничното протичане на несиндромната слухова загуба, резултат от увреда на Сх26 и Сх30.
3. В изследваният контингент за първи път в световен мащаб е установена мутацията p.Le121Asn 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 несиндромна слухова загуба, резултат от увреда на конексин 26, приложими в клиничната практика.
6. Предложени са практически критерии за провеждане на генетичен слухов скрининг 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.

***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