

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

---

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**СОФИЯ**

**2019**

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

---

**Д-Р ВЕНЕРА ТРАЙЧЕВА ДОБРИЯНОВА**

**КЛИНИЧЕН ПОДХОД ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ЛЕЧЕНИЕ**  
**НА НАСЛЕДСТВЕНА ЗАГУБА НА СЛУХА**  
**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

**Научна специалност: оториноларингология**

Научен ръководител: доц.д-р Орлин Стоянов, дм

РЕЦЕНЗЕНТИ: проф.д-р Диана Попова, дмн

проф.д-р Карен Джамбазов, дм

**С О Ф И Я**

2019

# СЪДЪРЖАНИЕ

Увод	5
1. Литературен обзор	7
1.2 Анатомо- физиологични данни	7
1.2 Прелингвална глухота	11
1.2.1 Генетична слухова загуба	11
1.2.1.1 Несиндромална слухова загуба	13
1.2.1.2 Синдромална слухова загуба	20
1.2.2 Негенетична слухова загуба	24
1.3 Аудиторна невропатия	33
1.4 Внезапна психогенна глухота у деца	37
1.5 Възможности за изследване на слуха	39
1.5.1 Отоакустични емисии	39
1.5.2 Тимпанометрия	45
1.5.3 Изследване на акустикус рефлекс	47
1.5.4 Слухови стволови евокирани потенциали	51
1.5.5 ASSR	56
1.5.6 Тонална прагова аудиометрия	58
1.5.7 Детска игрова аудиометрия	63
1.5.8 Визуална аудиометрия	64
2. Цел и задачи	65
2.1 Цел	65
2.2 Задачи	65
3. Материали и методи	65
3.1 Материали	65
3.1.1 Биологичен материал	66
3.2 Методи	66
3.2.1 Клинични методи	66
3.2.2 Аудиологични методи	67
3.2.2.1 Тонална прагова аудиометрия	67

3.2.2.2 Детска игрова аудиометрия	67
3.2.2.3 Тимпанометрия и рефлексометрия	67
3.2.2.4 Транзиентни отоакустични емисии	68
3.2.2.5 Слухови стволови евокирани потенциали	69
3.2.2.6 EARS	70
3.2.3 Образни изследвания	72
3.2.4 Генетични методи	72
3.2.4.1 Полимеразна верижна реакция (Polimerase Chain Reaction – PCR)	73
3.2.4.2 Хоризонтална агарозна електрофореза	74
3.2.4.3 Директно секвениране	74
3.2.4.4 Таргетно новогенерационно секвениране	79
3.2.5 Биоинформатични методи	82
3.2.6 Статистически методи	82
4. Резултати	83
4.1 Демографски анализ	83
4.2 Дескриптивен анализ	87
4.3 Статистически анализ	104
4.4 Генетичен анализ	128
5. Дискусия	144
6. Заключение	153
7. Изводи	154
8. Приноси	155
Библиография	156

## Увод

Невросензорната загуба на слуха, НСЗС (Sensorineural hearing loss, SNHL) е комплексно заболяване, повлияно от взаимодействието на множество ендогенни и екзогенни фактори. Генетичните и свързаните с възрастта промени в слуха могат да предопределят слуха на пациента и всяка потенциална промяна в слуха с течение на времето може да бъде ускорена от множество външни фактори. Тези взаимоотношения стават особено сложни ако пациентът е генетично предразположен към промени в слуха. Възможностите за диагностична оценка и лечение на SNHL в днешно време са увеличени.

Наследствените фактори и факторите, влияещи на развитието, имат ключова роля за проявата на НСЗС [1,2]. Десетки генетични локуси са идентифицирани като причина за синдромна и несиндромна загуба на слуха с различни модели на унаследяване (автозомно- доминантен, автозомно- рецесивен, X- свързан, митохондриален). Доказано е, че някои от генетичните локуси повишават потенциала за проява на трайна НСЗС, причинена от звукова травма или ототоксични медикаменти [3].

Вредното въздействие на шума върху вътрешното ухо е една от най- честите причини за трайна загуба на слуха. Експозицията на огнестрелно оръжие, свързана с професионална и развлекателна дейност, също е значима причина за постоянна загуба на слуха , предизвикана от шум [1].

В зависимост от вида, слуховата загуба се дели на проводна (резултат от аномалии на външния слухов канал и/или на структурите в средното ухо), приемна (резултат от дисфункция на структурите на вътрешното ухо), комбинирана (комбинация на проводна и приемна глухота) и централна слухова дисфункция (резултат на увреда или дисфункция на ниво VIII ЧМН, мозъчния ствол, слуховата част от мозъчната кора). В зависимост от началото на слуховата загуба, тя може да бъде разделена на прелингвална (слуховата загуба започва преди развитието на речта, но не всяка прелингвална глухота е вродена) и постлингвална (започва след развитието на нормална реч).

В зависимост от тежестта на слуховата загуба са обособени следните степени на глухота:

- социално адекватен слух (с минимален праг на слуха от 0 до 30 dB за говорните честоти),
- тежко чуване (праг на слуха от 31 до 60 dB),
- практическа глухота (с прагове на слуха от 61 до 90 dB за говорните честоти) и глухота (тонални прагове над 91 dB).

Прелингвалната невросензорна слухова загуба в развитите страни се оценява на 1 на 500 деца като в 80% от случаите се касае за генетична слухова загуба. Около 80% от засегнатите са с несиндрома загуба на слуха, а останалите 20% - със синдромна. В 80% от случаите несиндромната загуба на слуха е унаследена по рецесивен модел, в 19 процента от случаите унаследяването е автозомно доминантно, а под 1% са митохондриалното, miRNA и X- свързаното унаследяване [4].

Звукоприемното намаление на слуха се дължи на увреда на външните или вътрешните слухови клетки на кохлеата, или и на двата вида клетки едновременно. Истинските слухови клетки, които възприемат и предават звуковото дразнене са вътрешните слухови клетки. Външните слухови клетки се явяват като кохлеарен усилвател, осигуряващ интензитетната характеристика на звука. Те първи реагират на увреждане, причинено от шум, лекарства, кислороден глад и други. От друга страна те осигуряват компресивна функция при сила на звука по голяма от 50 - 60 dB. При цялостно унищожаване на външните слухови клетки, тоналната прагова аудиометрия би изглеждала като звукоприемно намаление на слуха от порядъка на 50- 60 dB, поради липсата на възможност за кохлеарно усилване. При лезия и на вътрешните слухови клетки е налична практическа глухота.

Следователно при липса на регистрация на ОАЕ или променени такива е задължително по нататъшното изследване на слуха чрез стволови слухови евокирани потенциали ССЕР (BERA) или тонална прагова аудиометрия поради възможността от наличието на звукоприемно намаление на слуха [5].

## Литературен обзор

## 1.1 Анатомо- физиологични данни

База за процеса на чуване са физиологичните отговори на кохлеата.

Кохлеата е дълга, лентообразна кухина в темпоралната кост, изпълнена с течност. При млекопитаещи, вкл. и човека, кухината е завита в лека спирала. База или основа е наречена по-широката част, разположена по-близо до средното ухо, а по-тясната част е арех.

Кухината е изпълнена с течност, разделена по дължината на 3 отдела от базиларната и Райснерова мембрани. *Scala vestibuli* е пространството, изпълнено с течност между по-горната стена и Райснеровата мембрана, а пространството между долната костна стена на кохлеата и базиларната мембрана е *scala tympani*. Пространството между двете мембрани е *scala media* или *ductus cochlearis*. Тъй като е обградена от двете страни от мембрани, *scala media* е еластична и реагира на промяна в налягането с движение в определена посока.

Базиларната мембрана, която разделя *scala media* от *scala tympani* се състои от свързани тъканни фибри в безклетъчен матрикс. Върху нея директно са разположени структури, отговорни за основната кохлеарна функция. Това е сензорният епител, известен като Кортиев орган и желатинозната структура-*membrana tectoria*. Заедно с базиларната мембрана те образуват *ductus cochlearis*, особено важен за функцията на кохлеата. Тази част има еднаква структура по цялото протежение на кохлеата, която се променя по характер като прогресира от основата към върха по три пътя, съответни на функцията:

Долната част е около 10 пъти по-широка от горната.

В основата има повече маса отколкото във върха, поради увеличаване броя и обема на подпорните клетки в Кортиевия орган.

Областта на базата е с по-голяма плътност от върха, поради структурните особености на базиларната мембрана (около 100 пъти повече според Bekesy, 1960).

Сензорните клетки на Кортиевия орган са закрепени в *matrix* посредством подпорни клетки.

Сензорните клетки се наричат още “влакнести” или “ресничести”, защото от върха им изхожда *stereocillia*. Те са подредени в няколко реда, с увеличаваща се

височина и цилиндрични групи, изглеждащи като стълба над всяка ресничеста клетка.

Стереоцилите са свързани странично по цялото си протежение чрез фини филаменти нар. “side links” [6]. Върхът на всяка стереоцилия е свързан със следващата, по-висока, чрез по-дълъг филамент “tipe link” [6].

Описани са 2 типа слухови клетки в кохлеата. Кълбовидните, вътрешните слухови клетки, са в единична редица, изцяло заобиколени от опорни/поддържащи клетки, освен повърхността, от която излиза ресничката. Външните слухови клетки са цилиндрични, разположени са в 3 редици и контактуват с опорните клетки само в основата и върха си.

В центърът на кохлеарната спирала е разположено костно образувание с гъбеста субстанция – modiolus. Фибрите на слуховия нерв влизат в кохлеата. Те излизат от отворите във вътрешния край на костната кохлеарна стена и продължават в Кортиевия орган. Около 95 % от тези аферентни влакна достигат до най-близките вътрешни клетки и формират връзки едно с друго, около 20 за една ресничеста клетка [7]. Останалите 5 % кръстосват кортиевия орган, обръщат се и слизат надолу по кохлеата срещу базата на няколко стотици микрометра и контактуват с група външни слухови клетки. Всяко такова влакно контактува с 20 – 50 клетки. Една външна клетка може да получи до 20 аферентни фибри [7]. Така инервационният образец на двата типа слухови клетки е различен и голяма част от информацията, която се предава в мозъка, произхождаща от вътрешните слухови клетки, а не от външните.

Има два типа неврони на VIII ЧМН в ганглия, които кореспондират с двата вида аферентни нервни фибри, които независимо инервират двете групи слухови клетки [7]. По-големи и по-многообразни неврони инервират вътрешните слухови клетки и изпращат големи миелинизирани аксони до кохлеарните ядра в ствола. По-малка група, която инервира външните слухови клетки изпраща малки, немиелинизирани аксони до невроните около периферията на кохлеарните ядра [8]. Малък брой от фибрите са еферентни, т.е. провеждат импулси от мозъка до кохлеата. В кохлеата се определят две популации еферентни влакна, като всяка от тях произхожда от различни клетъчни групи в ствола [9] и се различават по биохимичен състав [10,11]. Едната група контактува с аферентните фибри точно под вътрешните слухови клетки [12, 11]. Другата група завършва директно до външните слухови клетки [9,11].



Ефективен стимул за кохлеарните ресничести клетки е разместването на стереоцилите от индиферентната им позиция [13]. За външните клетки разместването се дължи на това, че точките на окачване, около които базиларната и текториалната мембрана се ротират по време на разместване на кохлеарните течности, са различни. Също така външният край на текториалната мембрана не е плътно долепен до Кортиевия орган. Вертикалното разместване на кохлеарните части дърпа мембрана тектория по повърхността на Кортиевия орган и предизвиква радиални режещи сили по протежение на редицата на външните слухови клетки [14], чиито върхове са свързани с текториалната мембрана. Тъй като стереоцилите са свързани помежду си със странични връзки всички цилии на ресничестите клетки се огъват от режещите сили. Вътрешните слухови клетки, които не са свързани с текториалната мембрана, се стимулират от потока на течностите между двете мембрани. Течностите се раздвижват от релативното раздвижване на текториалната мембрана и Кортиевия орган [14].

Кохлеарните микрофонни и сумационни потенциали се образуват основно от външните слухови клетки. Ако тези клетки се унищожат, докато вътрешните слухови клетки останат интактни, амплитудата на микрофонния потенциал се намалява с около 40 dB [15]. Техният характер се променя по подобие на определени стимулации на вътрешните слухови клетки при движение на флуидите, отколкото тези при актуално разместване на участъците.

Доказателства от различен характер показват, че активни процеси съществуват във външните слухови клетки.

Около 95 % от аферентните фибри на слуховия нерв произлизат от вътрешните слухови клетки, докато екстрацилиарните кохлеарни микрофонии и потенциали са образувани от външните слухови клетки.

Големият екстрацелуларен отговор на външните слухови клетки излиза извън 5% сътрудничество с аферентните неврони на слуховия нерв, което е основание да им се придаде и друга роля. Селективно разрушаване на външните слухови клетки чрез използване на имуноглобулини или шум води до загуба на праговата чувствителност на кохлеата с около 40 dB [12] и драстична промяна в настройката на VIII ЧМН [16].

Важен е фактът, че външните слухови клетки могат да се движат, когато се стимулират електрически. Те се скъсват, когато са деполяризирани и се удължават, когато са хиперполяризирани. Електроподвижността е извънредно бърза и се появява във фреквенции, близо до прага на човешкия слух [17]. Наблюдението върху изолирани ресничести клетки хвърля светлина върху нелинейността в кохлеата и нейния произход. Тя се наблюдава в електроподвижността на отделни външни слухови клетки [18], тези нелинейности като че ли произхождат от електро отговори и е присъща на трансдучер канала, който осигурява възможни промени, предизвикващи подвижността [19, 20].

Откриването на активните отговори на външните слухови клетки е революция в разбирането на кохлеарната механика и трансдукция.

Външните слухови клетки са свързани помежду си в цитоархитектониката на Кортиевия орган и ако много от тях се движат в синхрон, техните механични отговори могат да се сумират. Тъй като най-високата стереоцилия е потопена в текториалната мембрана така може да се повлияе и движението ѝ. Измерването на силата, генерирана от отделните външни слухови клетки показва, че съгласуваното активиране на голям брой клетки трябва да е в състояние да промени механичните отговори на кохлеарните части [21]. Приема се, че един от тези ефекти е усилване на движението на базилярната мембрана в тясно честотна област.

Това е така, защото външните слухови клетки се приемат като кохлеарен усилвател. Основание за това е, че загубата на външните слухови клетки води до променена или липсваща, прагова чувствителност и настройка в кохлеата [12,15].

Допускат се два различни първични модела- електрически и механичен - на взаимодействие между външните и вътрешните ресничести клетки, за да се обясни как външните ресничести клетки, които се смятат за кохлеарен усилвател, амплифицират отговора, като се има предвид, че те са отделени в пространството и в инервацията си.

Тъй като външните клетки продуцират голям извънклетъчен потенциал, няколко изследователи допускат, че именно той повлиява вътрешната слухова клетка [12], но след като са направили вътреклетъчни записи и директно се измерват възможностите на мембраните на ресничестите клетки става ясно, че

съпротивлението на клетъчната мембрана е твърде голямо, за да може екстрацелуларният потенциал да влияе върху вътрешните клетки [22, 23].

И така се допуска, че външните слухови клетки механично влияят върху отговорите на вътрешните слухови клетки.

Подвижността на външните слухови клетки може да усилва сигнала към вътрешните чрез увеличаване движението на кохлеарните части, в частност текториалната мембрана.

Външните слухови клетки могат да функционират изключително като рецепторни клетки с последователна аферентна инервация, което видоизменя кохлеарната микромеханика. Тяхната аферентна инервация може да носи информация за механичното състояние на ductus cochlearis, по-често от отговорите на звук.

Физиологичните отговори от аферентните влакна, които инервират външните слухови клетки са проучени от Brown [24] и Liberman and Brown [25]. Те могат да отговарят на стимулация на кохлеата, която те инервират, или на тази от другото ухо, или и на двете. Имат по-висок праг от аферентните и се настройват подобно. Те инервират област от кохлеата, която предава най-добрите честоти. Някои еферентни показват спонтанни промени.

## 1.2. Прелингвална глухота

### 1.2.1 Генетична слухова загуба

В повечето случаи загубата на слуха е с мултифакторна генеза като причините са и генетични и резултат от действието на фактори от околната среда. Мутацията в един ген може да доведе до загуба на слуха. В тези случаи загубата на слуха е моногенетично заболяване с автозомно доминантно, автозомно рецесивно, X- свързано или митохондриално унаследяване. Тези моногенетични форми на слухова загуба могат да бъдат синдромни (характеризиращи се със загуба на слуха в комбинация с други аномалии) или несиндромни (характеризиращи се само със загуба на слуха).

Класификация на слуховата загуба:

Слуховата загуба може да бъде класифицирана като генетична или негенетична, прелингвална или постлингвална и синдромална или несиндромална. Загубата

на слуха може да бъде причинена от факторите на околната среда, включително перинатални инфекции, звукова или церебрална травма, засягаща кохлеата или от ототоксични медикаменти като аминогликозидните антибиотици. Тя може да бъде генетична, в резултат на мутация в един ген (моногенна форма), или като комбинация от мутации в различни гени и фактори от околната среда (мултифакторна форма). Слуховата загуба може да има преди развитието на речта (прелингвална) или след това (постлингвална). Повечето прелингвални форми са налични при раждането (вродени), но някои започват в ранна кърмаческа възраст, преди проговарянето. В повечето случаи прелингвалната глухота е тежка, но устойчива- без прогресия. Приблизително 50 процента от случаите се дължат на моногенни форми на слухова загуба. Перинаталните фактори и инфекциите при новородени или травмите са отговорни за другата половина [26,27]. Наследствения модел на моногенетична прелингвална глухота е автозомно рецесивен в приблизително 75% от пациентите, автозомно доминантният е 20%, X- свързаният е приблизително 5% и митохондриалния е по- малко от 1 % [28]. Постлингвалната слухова загуба е по- често срещана от прелингвалната , засягайки 10% от популацията до навършване на 60 години и 50% до навършване на 80 години [29,30]. Повечето случаи на постлингвална слухова загуба имат мултифакторно унаследяване, но моногенните форми съществуват като следват главно автозомно доминантно унаследяване.

Слуховата загуба също може да бъде класифицирана като синдромална и несиндромална. Традиционно терминът „синдромална слухова загуба“ се отнася до комбинации от загуба на слуха с една или няколко специфични други аномалии. Най- цитираните примери включват синдромите на Waardenburg, Usher, Pendred, Alport. Повечето случаи на моногенна слухова загуба са несиндромални.

Първоначално само гени включени в синдромалната загуба на слуха били локализирани и идентифицирани, а след 1994 година само три генни локуса, включени в несиндромалната загуба на слуха са локализирани в човешкия геном. Синдромалните форми могли да бъдат класифицирани на базата на техните придружаващи симптоми в еднородни групи, в които анализ за скаченост и позиционно клониране били осъществими. В контраст, свързването на несиндромална загуба на слуха с един ген е много трудно, тъй като изисква анализ за скаченост в отделни семейства. Поради високата честота на

моногенната несиндромална слухова загуба, много семейства, подходящи за анализ за скаченост са идентифицирани.

### 1.2.1.1 Несиндромална слухова загуба

През последните години анализа за скаченост е картографира много гени за несиндромална слухова загуба към различни хромозоми. Различните генни локуси за многобройни несиндромни форми на глухота са наречени DFN (от deafness- глухота) и са номерирани в хронологичен ред на откриването им. Автосомно доминантните локуси са означени като DFNA, автосомно рецесивните локуси като DFNB, а X- свързаните рецесивни локуси като DFN. В края на 1998, 44 локуса са идентифицирани: 19 DFNA локуса, 21 DFNB локуса и 4 DFN локуса. Мутации в гена за DFNB1 (конексин – 26 гена) са най- честа причина за моногенетична слухова загуба, отговорна за около половината от всички случаи на автосомна рецесивна прелингвална загуба на слуха. Мутацията 35delG представлява делеция на един гуанин от поредица от 6 гуанина близо до amino края на генния продукт и води до изместване рамката на четене и до терминация на трансляцията до 13-та аминокиселина [Maria Bitner-Glindzicz, 2002]. Унаследява се автосомно рецесивно, което означава че две копия на GJB2 гена трябва да са променени във всяка клетка, за да се предизвика увреда на слуха. Мутациите в GJB2 гена вероятно променят плътните връзки (gap junctions), което води до нарушаване на нивата на калиевите йони във вътрешното ухо. Нива на калиевите йони, които са твърде високи могат да засегнат клетките необходими за нормалното чуване.

DFNA9 (*COCH* генът) е вероятно най- често засегнатият генен локус при автосомно доминантна постлингвална загуба на слуха. DFN3 (*POU3F4* генът) е най- често засегнатият X- свързан локус, а митохондриалният малък рибозомален РНК ген (12 рРНК) е мутирал в най- честата форма на митохондриална загуба на слуха. Останалите локуси са свързани със слухова загуба само в една или няколко фамилии. Няколко прегледа на тези генетични проучвания са публикувани [29,30,31,32,33,34,35].

Преди 1996 година, само един ядрен ген (*POU3F4*) и два митохондриални гена (1S rRNA и прехвърлящият РНК ген за серин) били замесени в несиндромалната

слухова загуба. От тогава дванайсет допълнителни гена отговорни за слуховата загуба са идентифицирани [29,32,36,37,38].

Мутации в или около генът за *POU3F4* на Xq21 хромозома са отговорни за DFN3 [39,40], X- свързаната форма на несиндромалната, прогресивна слухова загуба с фиксация на плочката на стремето. Друг *POU* ген, *POU4F3* генът на 5q хромозома, участва в DFNA15, автозомно доминантна форма на прогресивна слухова загуба.

Гените *POU3F4* и *POU4F3* принадлежат към семейството на *POU* гените, които кодират транскрипционните фактори. *POU3F4* генът е експресиран в мезенхима на вътрешното и средното ухо, в който е включен в матурацията на костта. *POU4F3* генът е експресиран само в слуховите клетки, в които той е отговорен за регулацията на транскрипцията на прицелни гени, които са важни за оцеляването на клетките в органа на Корти [41].

Миозиновите гени са членове на голяма фамилия гени, които кодират протеини, упражняващи механични сили. Миозините в ухото могат да използват актинови филаменти като път, по който да транспортират интрацелуларни везикули в слуховите клетки. Миозини има и в стереоцилията, които са запълнени с актин, и в кутикулата, която е обогатена с актин. Следователно, те могат да осигурят опора за актина в слуховите клетки и стереоцилията и да бъдат отговорни не само за обтягането на върха свързващ стереоцилията и техните движения, но също за цялостната организация на клетъчния скелет на слуховите клетки. Мишки с мутация в един от миозините имат абнормни стереоцилии и са глухи.

Пациенти със синдром на Usher тип 1B, синдромална форма на глухота, комбинирана с ретинитис пигментоза и вестибуларни аномалии, имат мутации в миозин 7A генът [42]. Този ген участва също в две форми на несиндромална слухова загуба. Няколко мутации в генът миозин 7A са идентифицирани в семейства с автозомно- рецесивна прелингвална глухота, свързана с хромозома 11q (DFNB2 локус) [43,44]. Същият ген участва в семейства с прогресивна постлингвална слухова загуба на всички честоти (DFNA11 локус) .

Конексините са мембранни протеини, които участват във формирането на канали през плазмената мембрана на много клетки. Шест субединици на конексина се сглобяват в половин канал, който се скачва с негово копие от съседна клетка, за да формира инерцелуларен канал. Струпване на тези канали формира кръстовище (gap junction), което позволява интерцелуларен обмен на

малки молекули и има важна роля в междуклетъчната комуникация [45,46]. Мрежата от конексинови каналчета във фиброцитите и опорните епителни клетки на ухото позволява калиеви йони, влезли в стереоцилията по време на механоелектричната трансдукция, да рециркулират към стрия васкуларис.

Конексиновите мутации, участващи в слуховата загуба, включват мутации в конексин 26 и конексин 30 и 31 гените, в семейства с несиндромална слухова загуба и в конексин 32 гена в асоциирана с X- свързана Charcot- Marie- Tooth синдромална слухова загуба. Конексин 26 генът (наричан gap junction protein beta 2, *GJB2*), е първият ген свързан с несиндромалната загуба на слуха и мутации в този ген са свързани с две форми на несиндромна слухова загуба. Едната е DFNB1, най- често срещаната форма на несиндромална автозомно-рецесивна слухова загуба, която отговаря за приблизително 20 процента от случаите на прелингвална глухота. Този тип слухова загуба обикновено е вродена и стабилна, с малък прогрес, и нейната тежест варира от умерена до практическа глухота. Една мутация на конексин 26, делеция на гуанин в 30 позиция (30delG), е открита в повечето пациенти из целия свят със слухова загуба свързана с локус DFNB1 [47,48,49,50,51]. Приблизително 1 до 3 процента от всички бели хора са носители на тази мутация [50]. За друга конексин 26 мутация, делеция на тимин в позиция 167 (167delT), е открито че е особено честа сред евреите Ашкенази, с носеща честота от приблизително 4% [49]. Следователно, молекулярният скрининг за конексин 26 мутации е важно средство в диагностицирането на вродена прелингвална глухота.

Конексин 26 мутациите са идентифицирани в рядък тип автозомно- доминантна загуба на слуха свързана с 13q хромозома (DFNA3) [52]. Друг конексинов ген 31, е място на мутация отговорна за автозомно- доминантна форма на несиндромална високочестотна загуба на слуха [53]. Други мутации в конексин 31 гена причиняват еритрокератодермия- автозомно-доминантно кожно заболяване с хиперкератоза и преходни червени петна- слухът при тези пациенти е нормален[54].

DFNA2 регионът на хромозома 1p34 е въвличен в несиндромалната прогресивна загуба на слуха, започваща във високите честоти във фамилии от различен етнически произход [53,55,56]. Поне два, а вероятно и три гена са локализирани в този регион. Конексин 31 генът е мутирал в някои фамилии [53] и *KCNQ4* генът е мутирал в други [55,56,57]. *KCNQ4* генът е член на суперфамилия от

гени, кодиращи калиеви канали. Тази суперфамилия включва *KCNQ1* и *KCNE1* гените, мутации в които също причиняват слухова загуба. Калиевите канали, кодирани от тези три гена, допринасят за калиевата хомеостаза в кохлеата чрез медиране на реполяризация и нулиране на електричния потенциал на слуховите клетки.

*KCNQ4* генният продукт най-вероятно формира калиевите канали на базолатералната страна на слуховите клетки, което позволява калиевите йони да преминават от слуховите клетки към опорните клетки. След това калиевите йони рециркулират през конексиновите каналчета между опорните клетки към стрия васкуларис, където те се отделят в ендолимфата през калиевите канали формирани от *KCNQ1* и *KCNE1* генните продукти. Тези протеини също са включени в поддържането на калиевата хомеостаза в сърцето, така че пациенти с *KCNQ1* и *KCNE1* генни мутации могат да имат синдром на дълъг QT интервал, самостоятелно (Romano- Ward синдром) или в комбинация с глухота (Jervell и Lange- Nielsen синдром).

Единственото известно семейство с *DFNA1* (diaphanous gene) мутация е голяма фамилия от Коста Рика с прогресивна, предимно ниско тонова глухота [58]. Мутираният ген кодира човешки хомолог на дрозофила протеин диафанос, който е член на фамилията формин [59]. Тези протеини участват в цитокинезата и клетъчната поляризираност чрез взаимодействие с актин. Диафанос е наличен в много клетки и в ухото участва в поддръжката на актиновия цитоскелет на слуховите клетки чрез възстановяването на профилин в клетъчната мембрана. Профилин е актин-обвързан протеин, който индуцира полимеризацията на актин и регулира актиновата динамика.

Мутации в пендрин гена на хромозома 7q водят до синдрома на Pendred, синдромна форма на автозомно рецесивна слухова загуба, свързана със структурни аномалии на вътрешното ухо и с гуша [60,61,62,63]. При повечето пациенти горните две витки на кохлеата са сляти (деформация на Мондини) и акведуктус вестибули и ендолимфатичния сак са уголемени (синдром на големия вестибуларен акведукт) [64]. У повечето пациенти гушата се проявява през второто десетилетие и се характеризира с увредена органификация на йод в щитовидната жлеза, въпреки че повечето пациенти са еутироидни. Някои от пациентите с пендрин мутации нямат тироидно заболяване, но имат загуба на слуха и увеличен вестибуларен акведукт [65,66]. Мутациите в пендрина могат



също да доведат до несиндромални форми на прелингвална глухота (DFNB4 локус) [67,68]. Мутациите в пендрин гена са следователно отговорни за поредица от аномалии, които могат да възникнат заедно в частична или пълна форма на синдрома на Pendred. Въпреки че са описани много мутации в пендриновия ген, много пациенти имат една от четири мутации [60,61,62].

Продукт на пендриновия ген се е смятало, че е сулфатен транспортър [60], но е по-характерно да транспортира йодни и хлорни йони [69]. Дефектният транспорт на йод може да обясни тироидните аномалии в тези пациенти, а дефекта в транспорта на хлоридни йони би могъл да обясни абнормното развитие на кохлеата и увреждането на слуха. Увреденият хлорен транспорт може да доведе до аномален поток на флуидите в кохлеата, водещ до голям вестибуларен акведукт и глухота.

Мутации в  $\alpha$ -текторин гена в хромозома 11q са открити в семейства с автозомно-доминантна (в DFNA8 и в DFNA12 локусите) и автозомно-рецесивна (в DFNB21 локус) загуба на слуха.  $\alpha$ -текторин гена кодира кохлеа-специфичен протеин [70], който взаимодейства с  $\beta$ -текторин. Двата протеина съставляват приблизително 50 процента от общото протеиново съдържание на текториалната мембрана в Кортиевия орган.  $\alpha$ -текторин се експресира само в текториалната мембрана на кохлеата и във вестибуларния епител [70]. Мембрана тектория представлява основен елемент за механоелектричната трансдукция по органа на Корти, тъй като тя се движи срещу Кортиевия орган по време на звуковата стимулация, като по този начин огъва връхчетата на стереоцилияте. Мутациите в гена текторин инхибират функцията на текториалната мембрана като резонатор.

Ген в DFNA5 локус на хромозома 7p15 е въввлечен в голямо холандско семейство с автозомно-доминантна невросензорна загуба на слуха, особено на високите тонове [71,72]. Позиционно клониране на този ген показва, че има обратна корелация с гена за експресията на естрогенови рецептори (ICERE-1), който е свръхекспресиран в естроген-рецептор отрицателния рак на гърдата [73,74].

СОСН генът на хромозома 14q1-13 е често е включен в автозомно-доминантна несиндромна форма на глухота (DFNA9 локуса), характеризираща се с постлингвално прогресивно слухово увреждане, започващо от високите честоти, с вариабилно вестибуларно участие, включващо световъртеж и Мениер-

подобни симптоми [75,76,77,78]. Отлагането на кисели мукополизахариди се открива в кохлеата и във вестибуларния апарат у пациенти с този тип слухова загуба [75].

Ген, локализиран на DFNB9 локуса на хромозома 2p се нарича отоферлин, защото продуктите му показват хомология към дисферлин, протеин, който е дефектен при някои миопатии. Мутация, която е идентифицирана в четири наследствени ливански фамилии с тежко чуване до глухота [79]. Генът отоферлин се експресира във вътрешните слухови клетки, утрикулуса и сакулуса. Той най-вероятно участва в транспортирането на мембранни везикули към плазмената мембрана.

Протеинът отоанкорин, принадлежащ към групата от неколагенови гликопротеини, кодиран от ОТОА гена, е специфично експресиран във вътрешното ухо и е разположен между апикалната повърхност на вътрешния слухов епител и надлежащата ацелуларна структура/гел. Предполага се, че този протеин е включен в прикрепването на ацелуларната структура към апикалната повърхност на основните/подпорни несензорни клетки. Мутациите в този ген са свързани с автозомно рецесивна глухота тип 22 (DFNB22). Открити са алтернативни варианти на транскрипция за този ген, които кодират различни изоформи. [предоставя се от RefSeq, сеп 2009]. Zwaenepoel et al. (2002) „претърсили“ 200 големи засегнати семейства, за да установят дали локусът на глухота във всяка карта е 16p12.2. В едно палестинско семейство е установено, че умерено до тежката прелингвална невросензорна глухота сегрегира с локус, наречен DFNB22 (607039) върху хромозома 16p13.1-q11.2. Те идентифицира T-към-C преход при екзон 12 / интрон 12 на свързване на ОТОА гена в хомозиготно състояние в 1 засегнато дете от това семейство. Установено е, че мутацията косегрегира със слуховото увреждане в този род и не е открита в 417 йордански, ливански, палестински и еврейски (предимно сефарадски и йеменски) индивиди с нормален слух. В засегнати сиблинги от друго палестинско семейство с автозомно рецесивна прелингвална глухота Shahin et al. (2010) идентифицирали хомозиготна 500-kb делеция, която води до пълно заличаване /делеция на ОТОА гена. Делецията е оградена от сегментарни дупликации при хромозома 16q, предполагайки неалелна хомоложна

рекомбинация като механизъм. Делецията е наблюдавана в хетерозиготно състояние в 3 (1.0%) от 288 неродствени палестински контроли.

Мутациите в митохондриалния геном, молекула на 16,569 bp кодираща 13 митохондриални протеина, 22 типа тРНК и два типа рРНК, са отговорни за много клинични аномалии, включително различни форми на невропатии, миопатии и кардиомиопатии; ретинална дегенерация; захарен диабет и глухота. Митохондриите са от съществено значение не само за продукцията на клетъчна енергия, но също и за контрола на апоптозата и следователно митохондриалните мутации могат да доведат до слухово увреждане чрез няколко механизма. Прогресивна загуба на слуха възниква при много пациенти с класически митохондриални заболявания, като миоклонална епилепсия и отчупени червени влакна (ragged-red fibers), митохондриална енцефалопатия с лактатна ацидоза и подобни на инсулт епизоди, синдром на Kearns- Sayre [80,81].

В някои семейства глухотата е само симптом на митохондриалното заболяване, което предполага, че чуването е строго зависимо от митохондриалната функция. Несиндромалната загуба на слуха, дължаща се на митохондриални мутации е необичайна. Два митохондриални гена, тРНК<sup>SER</sup> и 12S рРНК гена, се асоциират с несиндромалната глухота. А7445G (заместващ гуанина за аденин на 7445 позиция) в тРНК ген за серин (тРНК<sup>SER</sup>) могат да причинят несиндромална загуба на слуха, въпреки че повечето пациенти също имат палмоплантарна кератодерма [82,83,84]. Мутацията в А7445G води до намаляване на стабилното състояние на нивото на тРНК<sup>SER</sup>. Друга мутация в същия ген, инсерция на цитозин на 7472 позиция, също може да доведе до несиндромална загуба на слуха и малцина от пациентите с тази мутация също имат атаксия и миоклонус [85]. Третата мутация в тРНК<sup>SER</sup> гена, заместване на тимин с цитозин на 7511 позиция, също може да доведе до несиндромална глухота [86].

Вторият митохондриален ген, участващ в несиндромална глухота, е малък рРНК ген (12S рРНК). А1555G мутация в този ген често се открива при пациенти с несиндромална загуба на слуха, дължаща се на аминокликозидна ототоксичност [87,88]. Втората патогенна мутация в този ген, делецията на тимин на 961 позиция, е открито, че предразполага пациентите към аминокликозидна токсичност и загуба на слуха [89].

Кохлеарната имплантация е най-важното лечение съществуващо към момента за дълбока невросензорна слухова загуба (> 81 dB). В проучване проведено сред

японци, което изследва етиологията на слуховата загуба у пациенти с кохлеарна имплантация са сравнени резултатите между участвалите [90]. Анализирано чрез таргетно екзомно секвениране използвайки масивно паралелно ДНК секвениране (massively parallel DNA sequencing, MPS).

Генетичните фактори са най-честата причина за тежката към дълбока слухова загуба. Те са един от ключовите фактори за резултатите от кохлеарната имплантация, КИ. Ако генетичния фон включва „интракохлеарна етиология“, то тогава добрият резултат от КИ е силно вероятен [91]. Следователно важно е да се определи засегнатата област спрямо кохлеата (във или извън кохлеата) чрез идентифициране на отговорния за слуховата загуба ген. От проведено проучване [90] става ясно, че генетичното изследване на пациенти с тежка към дълбока слухова загуба е полезно за предсказване на резултатите от КИ, както и за вземането на решение за избор на лечение [92,93,94,95,96,97,98]. Поради богатата генетична хетерогенност на глухотата клиничното приложение на генетичната информация продължава да води до редица трудности. Известно е, че над 80 гена се свързват с несиндромалната наследствена слухова загуба. Напредъкът в таргетното екзомно секвениране на избрани гени, използвайки масивно паралелно ДНК секвениране позволяват успешното идентифициране на мутациите в относително редки гени [99].

### 1.2.1.2 Синдромална слухова загуба

Описани са повече от 400 генетични синдрома, които включват глухота. Въпреки че увреждането на слуха при синдромалната прелингвална глухота представлява над 30% от прелингвалната глухота, относителният ѝ принос към глухотата общо е много по-малък.

Синдромът на Waardenburg тип I е слухово-пигментно разстройство, включващо вродена невросензорна загуба на слуха и пигментни нарушения на ириса, косата, кожата заедно с дистопия на очния ъгъл (латерално изместване на вътрешния очен ъгъл). Загубата на слуха, наблюдавана в приблизително 60% от засегнатите, е вродена, непрогресивна едностранна или двустранна, невросензорна. По-често глухотата е двустранна и пълна (> 100 dB). Болшинството от засегнатите индивиди имат кичур бяла коса или косата на скалпа им рано посивява- преди да навършат 30 години. Класическият бял

кичур, срещащ се при 45 % от засегнатите е най- честата пигментна аномалия. Болните могат да имат пълна или частична хетерохромия на ирисите, хипопластични или брилянтно сини ириси. Вродената левкодермия често се среща в областта на лицето, трупа, крайниците.

Синдромът на Waardenburg трябва да се подозира у индивиди, притежаващи няколко от големите или малките критерии. Към големите критерии се отнасят: вродена невросензорна загуба на слуха, бял кичур или хипопигментация на косата, аномална пигментация на ириса, дистопични очни ъгли ( $W$  индекс  $> 1,95$ ), роднини от първа линия. Към малките критерии се отнасят: хипопигментация на кожата (вродена кожна левкоплакия), синофрис, широк корен на носа, ниско висяща колумела, недоразвити носни крила, преждевременно побеляване на косата ( $< 30$  год.) .

Диагнозата се подозира в изследвания при медицински преглед, когато са налични два големи критерия, или при наличие на един голям и два малки критерия, както е предложил Консорциумът на Waardenburg. [100]. Идентификацията на хетерозиготните патогенетични варианти в *PAX3* чрез молекулярно- генетично тестване потвърждава диагнозата ако клиничните характеристики са неубедителни. Молекулярно- генетичните тестове могат да включват изследването на един ген (*single-gene testing*), изследване на панел от гени (*multi-gene panel*), и по- цялостно геномно изследване. Такова изследване може да докаже диагноза, за която не е мислено – като резултат от мутация на различен ген или гени би могъл да даде подобна на синдромът на Waardenburg фенотипна изява.

Фенотипът на Синдромът на Waardenburg тип I е непостоянен дори и в едно семейство. Различни автори са работили върху това да обобщават клиничните характеристики и пенетрантността им [101,102]. Невросензорна загуба на слуха се наблюдава в 47%- 58% от засегнатите, хетерохромни ириси в 15% - 31%, хипопластични сини ириси в 15%-18%, бял кичур- в 43%- 48%, ранно посивяване на косата в 23%- 38%, левкодермия в 22% - 36%, висока основа на носа в 52%- 100%.

Латералността на глухотата показва междугрупови и върешногрупови вариации. Различни аномалии на темпоралната кост са идентифицирани в пациенти със синдрома на Waardenburg тип I [103]. Аномалиите на темпоралната кост включват уголемен акведуктус вестибули, стеснение на вътрешния слухов

канал, хипоплазия на модиолуса. Описана е дефектна миграция или функция на меланоцити, водеща до дефектно развитие на стрия васкуларис и невросензорна загуба на слуха [104].

Друг срещан сред изследваните деца с прелингвална глухота синдром е синдрома на Usher, който бива три различни вида: при тип I има вродена, пълна невросензорна загуба на слуха и вестибуларна дисфункция; при тип II се наблюдава влошаваща се невросензорна загуба на слуха; при тип III – прогресивна невросензорна загуба на слуха и вариабилна вестибуларна дисфункция. При всички типове се наблюдава прогресивна загуба на зрението.

Синдромът на Usher тип I се характеризира с вродена двустранна невросензорна загуба на слуха, вестибуларна арефлексия и ретинитис пигментоза, насъпващ в юношеска възраст. Ако на детето не е поставен кохлеарен имплант, то няма развитие на реч. Вестибуларната арефлексия е причина децата със синдрома на Usher тип I да прохождат по-късно – на възраст 18 - 24 месеца. По-големите деца могат да изглеждат тромави и често претърпяват наранявания или имат трудности с дейности, изискващи баланс, като например каране на колело или други спортове. На тези деца често е поставяна грешна диагноза като несиндромална глухота, докато не се появи ограничено зрително поле и нощна слепота, ранни симптоми на ретинитис пигментоза, и станат достатъчно изразени, за да бъдат забелязани. Ретинитис пигментоза (прогресивна двустранна симетрична дегенерация на функциите на пръчиците и конусчетата на ретината) води до постепенно свиване на зрителното поле и нарушена зрителна острота. Промените в ретината са двустранни, прогресивни, симетрично дегенеративни, започващи в периферията [105].

Диагнозата синдром на Usher тип I се поставя след изследване функцията на слуха и ретината. Идентифициране на биалелен патогенетичен вариант в един от шестте гена – *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2* – потвърждава диагнозата.

Хетерозиготните индивиди са асимптоматични. При тях могат да се наблюдават леко отклонени стойности на електроокулографията и аудиограмата, които не са достатъчно специфични, за да се мисли за диагнозата.

Генотип- фенотипна корелация съществува в индивиди с *CDH23* патогенетични варианти.

Синдромът на Usher тип I е отговорен за 3% до 6% от глухотата при деца и за близо 50% от комбинираната слепота и глухота. През 1989 година, синдромът е подразделен на тип I и тип II [106]. Специализираните образователни изисквания към вродената глухота правят популацията със синдром на Usher тип I по-достъпни за изучаване. Индивидите със синдром на Usher тип II и тип III, които комуникират вербално и посещават обикновени училища, не участват в проучванията.

Кохлеарната имплантация е метод на избор за лечение на глухотата при синдрома на Usher тип I, особено при малки деца [107,108,109].

Синдромът на Usher е наследствено автозомно-рецесивно заболяване. Немоногенното унаследяване е рядко. Обичайно засегнатите индивиди са с два патогенни варианта в *USH1* и друг патогенен вариант във втори ген, свързан със синдрома, който може да модифицира фенотипа [110-113].

Загубата на слуха при синдрома на Usher тип II е вродена и двустранна, възникваща във високите честоти и варираща от социално адекватен слух до глухота. Степента на слухова загуба варира в и сред семействата. „Полегатата“ аудиограма е характерна за синдрома на Usher тип II. Загубата на слуха се възприема като прогресивна от засегнатите индивиди с течение на времето, тъй като възприемането на речта намалява вероятно като резултат от намаленото зрение, което пречи на подсъзнателното четене по устните.

Диагнозата се поставя след тестване на слуха и функционирането на ретината. Идентифицирането на биалелен патогенен вариант в един от три гена – *ADGRV1*, *WHRN (DFNB31)*, *USH2A* потвърждава диагнозата. Наблюдава се клинична вариабилност на слуховия фенотип [114,115].

Ретинитис пигментоза е прогресивна, двустранна, симетрично дегеративна за ретината, започва в периферията, пръчиците (фоторецепторите, активни в тъмното) са засегнати първо, причинявайки нощна слепота и стеснявайки зрителното поле. Конусчетата (фоторецепторите, активни на светлина) също могат да бъдат засегнати.

Хетерозиготните индивиди са асимптоматични. Те могат да покажат неспецифични аномалии в аудиограмата, слабо променена електроокулография.

Слуховите апарати при синдрома на Usher тип II имат приложение. Малките деца могат да се възползват от ранно поставяне на слухов апарат и да тренират говора до нормализиране на езика. Слуховата травма и генетичната податливост

в допълнение към вродения устойчив дефицит на USH2 могат да доведат до глухота у възрастни индивиди . При тях кохлеарната имплантация е препоръчителна.

Синдромът на Usher тип II е с автозомно- рецесивно унаследяване. Всяка следваща бременност на двойка, която има дете с този синдром, има 25% вероятност да има отново засегнато дете, 50% вероятност за здраво дете, което е носител и 25% вероятност за здраво дете, което не е носител.

Синдромът на Usher тип III се дължи на хомозиготна или на комбинирана хетерозиготна мутация в гена *CLRN1*, локализиран на 3q25 хромозома. Мутация в този ген могат да причинят форма на несиндромна ретинитис пигментоза. Синдромът се характеризира с постлингвална прогресивна слухова загуба, вариабилна вестибуларна дисфункция и начални симптоми на ретинитис пигментоза.

Други синдроми, водещи до прелингвална глухота са бранхио-ото-ренален синдром, неврофиброматоза тип 2, синдром на Stickler, синдром на Pendred, синдром на Jervell и Lange-Nielsen, Болест на Refsum, Alport синдром.

## 1.2.2 Негенетична слухова загуба

Идентифицирането на причините довели до глухота могат да осигурят прогностична и образователна информация и да помогне за съставяне на план за рехабилитация. Причините за слухова загуба често се разделят на вродени и придобити. Много от вродените причини са били „придобити“ по време на вътреутробното развитие и могат да се проявят по- късно.

През последните 40 години неонаталните интензивни отделения представят нарастваща популация от новородени с глухота. През 60те и 70те години на миналия век, когато разпространението им е било ограничено, ниското тегло и перинатални фактори са били отговорни за около 2% от децата със загуба на слуха [116]. Ефективната терапия на респираторния дистрес синдром навлязла през 70те години на миналия век, увеличава броя на оцелелите, усложнени и изложени на риск деца с повишен риск за слухова загуба. През следващите десетилетия процентът на тези деца нараства- до 27% [116].

Неонаталните интензивни отделения обособяват група деца, които имат рискови фактори за глухота като индикаторите за риск от раждането през следващите 28



дни включват: 1. Заболяване или състояние, изискващо приемане за 48 часа или повече в неонатално интензивно отделение; 2. Клиничен белег или находка, свързани със синдром, за който да е известно, че включва невросензорна или проводна загуба на слуха; 3. Фамилна анамнеза за дълготрайна детска невросензорна загуба на слуха; 4. Краниофациални аномалии, включително такива с морфологични аномалии на ушната мида и външния слухов канал; и 5. Интраутеринна инфекция, например CMV, херпес, токсоплазмоза, рубеола. От проведени проучвания става ясно, че най-честите рискови фактори за глухота в неонатално интензивно отделение са ототоксичните медикаменти (44,4%), ниското тегло при раждане (17,8%), асистирана вентилация в продължение на 5 дни (16,4%), нисък резултат от теста на Апгар (13,95%) [117].

Хипоксията, хипербилирубинемията и в по-малка степен експозицията на ототоксични медикаменти определят причината за слуховата загуба в неонаталното интензивно отделение.

Хипоксия варира от апнея, нисък Апгар скор или по-често документирано като стойност на  $pO_2$  по-ниска от 50 mm Hg [118].

Хипербилирубинемията е фактор, свързан с невросензорната загуба на слуха в неонаталните интензивни отделения, а също свързан и с аудиторната невропатия. При наличието на хипербилирубинемия са демонстрирани специфични отклонения в слуховите евокирани отговори, ABR (auditory brain stem responses). Тези аберации изчезват след обменна трансфузия и установяване на нормални билирубинови нива [119,120]. DeVries и съавтори [121] откриват, че по-високата средна продължителност на хипербилирубинемия (48 часа срещу 24 часа) и ниското тегло при раждане са свързани с повишен риск за невросензорна загуба на слуха.

Персистиращата белодробна хипертензия и екстракорпорална мембранна оксигенация са индикатори за слухов мониторинг на всеки шест месеца до навършване на три годишна възраст, тъй като има съобщения за късно начало на невросензорната загуба на слуха [122].

Инфекциозните причини за глухота могат да възникнат преди и след раждане. Исторически токсоплазма, други инфекции, рубеола, цитомегало вирус, херпес вирус и сифилис (toxoplasmosis, other infections, rubeolla, CMV, herpesvirus, syphilis- TORCHES) са описани като често причини за вродена загуба на слуха, в резултат на пренатално заразяване. Тъй като през последните

десетилетия епидемиологията на тези микроорганизми се измени, само CMV към момента е съществена причина за вродена глухота в много страни. Всяка от TORCHES инфекциите може да доведе до подобна клинична изява преди и след раждането, както и до подобни вродени дефекти. Това включва редуциран интраутеринен растеж на плода, микроцефалия, припадъци, умствена изостаналост, дефекти в зрението, церебрална парализа [123,124]. TORCHES са една от основните причини за глухота, която води до кохлеарна имплантация при деца [124].

Причинителят на токсоплазмоза е протозойният паразит *Toxoplasma gondii* и в случай на пренатално заразяване на плода може да доведе до невросензорна загуба на слуха. Хората се заразяват с паразита поглъщайки ооцистите му, хранейки се с контаминирано не добре термично обработено месо, от котешки фецес, от почва или от контаминирана с паразита вода. По-рядко заразяването става чрез кръвопреливане или при трансплантация на орган. Случаите на вродена токсоплазмоза се оценяват на 1/1000 до 1/10000 [125]. През 2000 година Центърът за контрол и превенция на заболяванията докладва, че за Съединените Щати са регистрирани 400 до 4000 случая на вродена токсоплазмоза, базирайки се на сероконверсията при бременни [126]. Майки, инфектирани първично с *Toxoplasma gondii* имат приблизително 30% до 50% вероятност да предадат инфекцията на плода. 85% от новородените с вродена токсоплазмоза са асимптомни. При раждането 90% от новородените с вродена токсоплазмоза нямат видими белези на заболяването [127].

Класическите симптоми на вродена токсоплазмоза са хориоретинит, хидроцефалия и интракраниално калцифициране. През 2009 година от проведеният от Brown и колеги систематичен преглед става ясно, че при новородените, при които е проведено адекватно лечение, няма случаи на загуба на слуха [128], други автори съобщават за инциденти на слухова загуба от 0% до 20% след проведено лечение [129].

Причинителят на рубеола е от групата на тога- вирусите, от род *Rubivirus*. Преди въвеждането на ваксината срещу нея, рубеола вирусът е бил най- честото вирусно заболяване водещо до вродена невросензорна загуба на слуха- 0,1% до 0,4% от всички новородени деца са имали вродена рубеола. Слуховата загуба, която засяга 68% до 93% от децата с вродена рубеола, е най- често срещаната постоянна проява. Процентът на вроденият рубеолен синдром у новородени,

родени от майки, инфектирани по време на първите 11 седмици от бременността, е 90%. Ако инфектирането се е случило през първите 20 седмици от бременността, размерът спада на 20%. Невросензорната загуба на слуха често е пълна- над 90 dB и двустранна, засягаща всички честоти, в някои случаи- прогресивна [130]. Липсата на централно слухово възприятие може да усложни оценката и санирането на слуховата загуба [131]. Характерни белези на вроденият рубеолен синдром са катаракта, сърдечен дефект, увреждане на слуха, изоставане в развитието, тромбоцитопения, характерен обрив [132].

Докато механизмът на индуцираната от рубеола глухота не е напълно изяснен, вирусът причинява директна увреда на кохлеата и клетъчна смърт в Кортиевия орган и стрия васкуларис [133]. Описани са и промени в състава на ендолимфата, в резултат на стриалната увреда [134]. В зависимост от тежестта на слуховата загуба, методите на лечение включват употребата на слухов апарат и кохлеарна имплантация [124].

Пренатално излагане на CMV ,  $\beta$ - херпесвирус, е най- честата вродена вирусна инфекция и понастоящем най- честият вирусен причинител на вродена невросензорна загуба на слуха. Разпространението на вродената CMV инфекция е приблизително 0,4% до 2,3% от всички новородени. Проучване, проведено през 2008 година от Stehel и колектив [135] документира 5% на вроден CMV в бебета с потвърдена глухота. Ако майките са с първична CMV инфекция по време на бременността, има 40% вероятност новородените да се инфектират; ако у майката се реактивира инфекцията по време на бременността, има приблизително 2% вероятност за инфектиране на новороденото. Възможността за трансмисия на инфекцията от майката на плода е 25% в първия триместър, 50% във втория и 75% в третия. Въпреки че 90% от новородените с вродена CMV са асимптоматични при раждането, 10% до 15% развиват загуба на слуха, докато 65% до 70% от новородените с изявена CMV инфекция при раждане също развиват слухова загуба. В проучването на Stehel и колектив [135], 75% от новородените с вродена CMV инфекция били диагностицирани, поради наличната вече глухота. Тъй като CMV- свързаната глухота може да не се прояви до късно през детството, диагнозата лесно може да бъде пропусната [136]. Диагнозата на вродена CMV инфекция се поставя през първите 2 до 3 седмици от живота на бебето чрез вирусна култура или PCR на слюнка, урина, кръв.

Проучвания на темпоралната кост демонстрират възпаление и оток на кохлеата и ganglion spiralis и вирусни антигени в органа на Корти, ganglion spiralis, scala media и Райснеровата мембрана [137,138]. Представянето, тежестта, прогресията и аудиографският модел на НСЗС, резултат от вродена CMV инфекция са много вариабилни [137,139]. След идентифицирането на SNHL в деца с CMV, е необходимо те да бъдат проследени поради честата прогресия [140,141]. Обикновено SNHL в деца с асимптоматична CMV инфекция включва високите честоти и флукутира. Загубата на слуха в деца, които са асимптоматични, обикновено е двустранна, по-тежка и склонна към прогресиране [123,142].

Херпес симплекс вирус тип 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2) са ДНК вируси от семейство Herpesviridae, които често засягат човека [143]. Неонатални HSV инфекции възникват в приблизително 1/3200 раждания в Съединените Щати, с преобладаване на HSV-2 [143]. Kimberlin [144] съобщава, че 85% от предаването се случва около момента на раждане, 10% е постнатално и 5% е вътреутробно, с първична инфекция на майката последвана от по-висока трансмисия у плода в сравнение с трансмисията при реактивиране на инфекцията. HSV-1 инфекциите се свързват със загуба на слуха след инфекция или реактивация на инфекцията след ранно детство. Случаите на глухота в деца с неонатален HSV не са изчислени, но с глухота в резултат на HSV-1 са по-чести от случаите в резултат на HSV-2. Преглед на случаите на невросензорна загуба на слуха у новородени, изложени на HSV, открива че невросензорна загуба на слуха възниква рядко в новородени изложени на HSV и няма доказателства на забавено начало на невросензорна загуба на слуха в бебета с асимптоматична перинатална HSV инфекция [145]. При потвърдена HSV инфекция изследването на слуха е препоръчително.

Трансплацентарната трансмисия на сифилиса е позната още от петнадесети век. Вроденият сифилис и придобитият след раждането сифилис се причиняват от *Treponema pallidum*, грам негативна спирохета. По света около 2 милиона майки имат положителен тест за инфекция с *Treponema pallidum* по време на бременността, включваща 1,5% от всички бременности. Загубата на слуха е едно от късните прояви, възникваща от 10 до 40 годишна възраст (Американската педиатрична академия, 2000). Вроденият сифилис може да се прояви като класическа триада на Hutchinson с интерстициален кератит, резци с бъчвовидна форма и невросензорна загуба на слуха, но може и да се прояви само с глухота.

За новородените с вроден сифилис, идентифициран след раждането, лечението с пеницилин обикновено води до оздравяване. В 3% от децата с вроден сифилис, невросензорната загуба на слуха се проявява заедно със световъртеж и започва във високите честоти и прогресира по тежест и обхват [130]. За диагнозата трябва да бъде мислено и при прогресивна загуба на слуха, внезапна загуба на слуха, вертиго- при придобит в постнаталния период сифилис.

Аудиологична и вестибуларна симптоматика може да възникне в деца, инфектирани с човешки имунодефицитен вирус (Human immunodeficiency virus, HIV). Това включва проводна загуба на слуха (често дължаща се на остър среден отит), невросензорна загуба на слуха, тинитус, вертиго, атаксия [146,147,148]. Глухота може да настъпи в резултат на директна инфекция на вътрешното ухо с HIV или вторично след развитието на опортюнистична инфекция (напр. с CMV, сифилис, туберкулоза, криптококов менингит) или ототоксична лекарствена терапия.

HIV може да засегне и централната и периферната част на слуховата система, като вирусът е засечен в слуховите и вестибуларните сетивни клетки, в стриалните клетки и в текториалната мембрана [149]. Пациентите с HIV инфекция имат абнормни ABRs, което предполага ангажиране на слуховия нерв [150].

Епидемичен паротит се причинява от *Virus parotitidis* принадлежащ към семейство Paramyxoviridae и се характеризира с едностранно или двустранно засягане на околоушните жлези и усложнения, едно от които може да бъде невросензорна загуба на слуха. Случаите на глухота след епидемичен паротит според проучване проведено през 2009 година в Япония предполага 0,1% случаи с едностранна загуба на слуха тежко чуване до глухота. Центърът за контрол и превенция на заболяванията в Съединените Щати посочва, че инцидентите са под 1% [151]. Глухотата, свързана с епидемичен паротит, може да възникне преди или след инфекцията и в асимптоматични пациенти. Глухотата, свързвана със заушка, морбили и рубеола, намалява след широкото разпространение на живата атенюирана ваксина [152].

Морбили вирусът принадлежи към семейството на парамиксовирусите. Загубата на слуха е често усложнение на инфекцията с морбили. Преди широкото разпространение на ваксината, морбили е причина за 5 до 10% от случаите на

глухота в Съединените Щати [153]. Понастоящем продължава да бъде честа причина за пълна глухота в райони, в които ваксинацията е рядкост [154].

Глухотата в резултат на инфекцията с морбили е типично двустранна, умерена до тежка (тежко чуване до пълна глухота) и може да последва морбилен енцефалит [153]. Морбили инфекцията е свързана с висока честота на средни отити (до 8,5- 25% от инфектираните), дължащи се на преходен спад в имунитета [155]. Последствие от бактериална суперинфекция може да доведе до някои случаи на глухота, свързана с инфекцията [156].

SNHL свързана с ваксиниране варира по тежест и може да бъде едностранна или двустранна и е докладвана и при възрастни и при деца. В някои от тези пациенти симптоми като температура, обрив, главоболие, атаксия са изявиени след поставяне на ваксината преди началото на слуховата загуба, като се смята, че е възможно глухотата да е резултат на индуциран от ваксината енцефалит [157,158].

Варицела зостер вирусът, VZV, е част от семейство Herpesviridae. VZV първо причинява първична инфекция, която може да бъде с изразена симптоматика или да протече асимптоматично. Вирусът впоследствие може да остане латентен в невроните в различни части на тялото за дълго време, реактивирайки се години по-късно. Реактивирането на латентния VZV в ganglion geniculi причинява синдрома на Ramsay Hunt или херпес зостер отикус чрез развитието на възпаление на ганглия и на лицевия нерв. Въвличането на осмият ЧМН е резултат на прехвърлянето на вирусът от близо разположеният ганглион или директно от лицевия нерв във вътрешния слухов канал. Симптомите включват парализа на лицевия нерв, херпетиформени везикули, тежка оталгия, SNHL (24% от засегнатите болни), тинитус, вертиго [159].

SNHL е едностранна и може да бъде от слаба, високочестотна до пълна глухота, като обикновено е слаба до умерена. Понякога SNHL може да възникне внезапно като първа проява на херпес зостер отикус, HZO [160]. Болни с HZO имат промени в ABR последвани от кохлеарна и ретрокохлеарна дисфункция [161].

Хеморагия на кохлеарния нерв и деструкция на апекса на Кортиевия орган могат да бъдат наблюдавани. Налични са загуба на клетките на ganglion geniculi с невронален оток и хроматолиза, периваскуларна лимфоцитна инфилтрация, невронална демиелинизация, аксонална загуба [162]. Загуба на слуха след HZO

може да бъде възстановена след проведена терапия, докато възстановяването на лицевата парализа се съобщава по-рядко [163,160].

Тежестта на лицевата парализа не винаги корелира с тежестта или прогнозата на слуховата и вестибиларната симптоматика [164].

Перманентното увреждане на слуха възниква в около 5% от случаите на НЗО [165,160]. В тези случаи SNHL е резултат от увреждане в кохлеата и в по-проксималните части на слуховите пътища [161,166]. Слухови апарати могат да бъдат използвани за саниране на слабо до умерено тежка SNHL(социално адекватен слух до практическа глухота).

И други вирусни инфекции като западно нилският вирус, човешкият парвовирус В19, лимфоцитния хориоменингитен вирус са потенциално свързани или с вродената или с постнатално придобитата глухота, включително и с внезапната загуба на слуха.

Загубата на слуха е добре документирано усложнение на бактериалния менингит. Систематичен преглед и мета-анализ на 132 статии докладват за 33,6% честота на загуба на слуха, дължаща се на бактериален менингит с различни причинители (Str. Pneumoniae, H.influenzae B, Neiss. meningitides, др.)[167]. Въпреки че H.influenzae тип В менингита е най-често срещан, глухота възниква с най-висока честота след пневмококов менингит у деца над едномесечна възраст [130].

Дали точното място на увреда при слуховата загуба в резултат на менингит са слуховите клетки, терминалните клончета на слуховия нерв или самият слухов нерв е предмет на спорове. Слуховите клетки, терминалните клончета на слуховия нерв и клетъчните тела на нервните влакна са обградени от перилимфна и ендолимфна течност. Медикаменти и/или бактериални инфекции са най-вероятните причини за увреждането на слуховите клетки и нерва [168]. Серия записи на ВАЕР (brainstem auditory evoked potential), започващи през първите 48 часа от началото на влиянието им, демонстрират ранното възникване на слуховата загуба [169,170,171]. Всички промени в ВАЕР приключват в рамките на две седмици от проследяването, без регистрирани случаи на по-късна глухота или възстановяване [172]. Това предполага, че функционалният статус на периферните неврони на слуховите пътища е непокътнат при децата с вродена глухота, спрямо тези изгубили слуха си след прекарана менингитна инфекция.

Свързаната с бактериални менингити глухота има начало по време на заболяването- менингита- и случаите на глухота не намаляват при прилагането на специфична антибактериална терапия. Въпреки че острият среден отит с директно разпространение през лабиринтното прозорче може да предхожда началото на заболяването в някои случаи, по- вероятно е бактериалните токсини да пенетрират през акведуктус кохлее или през вътрешния слухов канал, в резултат на което възниква периневрит или неврит на осмия ЧМН и/или гноен лабиринтит. Други патофизиологични механизми участващи в загубата на слуха включват серозен или токсичен лабиринтит, тромбофлебит или емболизация на лабиринтните съдове, хипоксия или аноксия на осмия ЧМН и централните слухови пътища.

За децата с двустранна невросензорна загуба на слуха след бактериален менингит кохлеарната имплантация е успешно средство за слухова рехабилитация. Хирургичното лечение трябва да се изпълни бързо, поради появата на лабиринтна осификация като усложнение след менингита.

У деца загубата на слуха в резултат на ототоксични медикаменти, като гентамицин, и токсични субстанции, като олово, е рядка и предотвратима причина на невросензорна загуба на слуха. Приемът на някои лекарства причинява необратима глухота, докато на други – обратима слухова загуба след спиране на приемът им. Изглежда че има и идиосинкратична и генетично обусловена възприемчивост към ототоксични медикаменти [173]. Слуховите увреждания, причинени от медикаменти, обикновено са двустранни, симетрични, с вариабилна тежест. Загубата на слуха обикновено е прогресивна, засягаща първоначално високите честоти.

Приемът на ототоксични лекарства от бременни би могъл да доведе до глухота в поколението. Периодът, в който е най- вероятно да се получи увреждане на слуховата система при прием на ототоксични медикаменти, е първият триместър, особено в шестата и седмата седмица. При слухова загуба в резултат на ототоксични медикаменти, отологичните аномалии включват аплазия на вътрешното ухо, увреда на вътрешните и външните слухови клетки, аномалии на средното ухо, липса на седми и осми ЧМН, дисплазия на Кортиевия орган, понижен брой на ганглийни клетки. Проводната слухова загуба, приписвана на ототоксични медикаменти, може да бъде причинена от малформации в костниците на средното ухо [174].



На новородените, лекувани в неонатално интензивно отделение, често са прилагани антибиотици и диуретици, които са ототоксични. Според различни проучвания на факторите, свързани с глухотата в тази популация, употребата на аминогликозиди не е значим предиктор за слухова загуба [175,176,177]. Borradori и колектив [178] откриват ототоксичност тясно свързана с удължения прием и високата доза на ототоксичните медикаменти, особено на аминогликозидите и фуросемида. Salamy и колектив [177] откриват висок риск за слухова загуба, когато фуросем се използва в неонаталния период в големи дози за продължително време и в комбинация с аминогликозиди.

Извън неонаталния период децата също могат да бъдат изложени на риск от глухота, в резултат на прием на ототоксични медикаменти, например децата със злокачествени новообразувания, третирани с цисплатина. Други медикаменти, за които е известно, че причиняват невросензорна загуба на слуха, са ацетилсалициловата киселина, хлорамфеникол, хлороквин фосфат, дихидрострептомицин, неомицин, нортриптилин, фармацетин, полимиксин Б, стрептомицин, ванкомицин [130]. Загуба на слуха е описана във връзка с пренатална експозиция на алкохол, триметадион, метил меркури, както и при пренатален йоден дефицит [179]. Тежкият йоден дефицит по време на бременността води до фетален дефицит на йод, което състояние се характеризира с психически дефицит, невросензорна загуба на слуха, спастична диплегия, страбизъм, нистагъм [179].

### 1.3 Аудиторна невропатия

Аудиторната невропатия, АН, е нарушение на слуха, при което звукът навлиза нормално във вътрешното ухо, но трансмисията на сигналите от вътрешното ухо към мозъка е увредена. Тя може да засегне хора от всички възрасти. Засегнатите индивиди могат да имат нормален слух или загуба на слуха- от слабо изразена-социално адекватен слух- до пълна глухота. Те винаги имат лоши способности да възприемат реч ясно. Често разбирането на речта е по-лоша от това, което се предвижда от степента на загуба на слуха.

За първи път описана 1996 година, аудиторната невропатия (АН) е констелация от находки, в които ОАЕs са налични, но изследването на слуховите отговори от мозъчния ствол разкрива абнормални или липсващи отговори. Децата с аудиторна

невропатия показват лоша говорна дискриминация, свързана с нивата на отговор на чистия тон. Тази констелация предполага, че в такива деца кохлеата не е увредена, но е налично смущение в свързването на слуховите пътища със слуховата част от кората. Често децата с аудиторна невропатия показват само слаба слухова загуба при провеждане на тонална прагова аудиометрия, а се представят много слабо при провеждане на тестове за разпознаване на говор. Поради този факт терминът „аудиторна дис- синхрония“ също се използва за да опише това състояние.

Спектърът от разстройства при аудиторната невропатия наброява до 10- 14% от децата диагностицирани с невросензорна загуба на слуха [180].

Децата с аудиторната невропатия често имат други съпътстващи заболявания като когнитивни нарушения, които затрудняват рутинното изследване на слуха.

В миналото, при регистриране на нормални отоакустични емисии се предполагало, че цялата кохлеа е здрава и се подразбирало, че има проблем по-проксимално. Напредвайки с изучаването на заболяването става ясно че това не е така.

Rance и съавтори [181] описват различни локации на лезии, които могат да причинят аудиторна невропатия и обобщават причините за всяка засегната локация. Спектърът от заболявания при аудиторната невропатия може да бъде резултат от селективен дефицит във вътрешните слухови клетки със запазена функция на външните слухови клетки; дефицит в невротрансмитерите, свързан с мутации в гена ОТОФ; аномалии в дендритните клетки, дължащи се на генетични мутации (OPA1) или на слухова травма; увреждане на слуховите ганглийни клетки в резултат на хипербилирубинемия; вродена липса или хипоплазия на слуховия нерв; нарушение в синтеза на миелин, в резултат на генетични мутации, както при болестта на Charcot- Marie- Tooth; патология на слуховия нерв като лезия на ъгъла на малкия мозък и понса или мултиплена склероза.

Тези лезии водят до диссинхрония в обработката на слуха в централните пътища, което може да доведе до необичайни проблеми.

Поради тонотопиката на кохлеата, честотни звукови знаци са кодирани в нея. Интензитетът на звука също се обработва в кохлеата и по този начин пациентите с аудиторна невропатия, често имат добри резултати от аудиограмата в сравнение със способността им да възприемат реч.

Времеви качества на звука се кодират и обработват в невроните на слуховия път и са от основно значение за нормалното разбиране на речта. Обикновено този процес на кодиране е изключително чувствителен и може да обработва синхронно и времеви звукови качества до отклонение от 50  $\mu$ s [182]. Когато този фин процес е увреден, разбирането на речта е силно засегнато. Рисковите фактори за развитие на аудиторна невропатия включват някои вродени фактори и придобити перинатално увреди.

Преждевременно родените деца са в риск от развитие на заболявания, повишаващи риска за аудиторната невропатия. Прекарана тежка жълтеница е рисков фактор за аудиторна невропатия и при преждевременно родените и при родените на термин деца [183].

Хипоксията в неонаталния период също може да индуцира аудиторна невропатия. Вътрешните и външните слухови клетки показват, че са различно чувствителни към хипоксично увреждане и по такъв механизъм хипоксията уврежда вътрешните слухови клетки, а външните слухови клетки продължават да функционират нормално [184].

Има регистрирани няколко случая на автозомно-доминантна наследственост в семейства. Автозомно-рецесивно унаследяване също е идентифицирано. Почесто този модел на унаследяване се свързва с мутации на отофериновия ген, основно при нормална функция на вътрешните слухови клетки. GJB2 мутации, причина за невросензорна загуба на слуха, може също да допринесат за АН [185].

При новородени поставянето на диагнозата АН не създава трудности. Децата, които дадат отрицателен резултат на слуховия скрининг за новородени, подлежат на последващо изследване на АBR, което потвърждава диагнозата. При изследването на ОАЕ в деца с АН, тестът дават положителни резултати, следователно с изследването единствено на ОАЕ диагнозата може да бъде пропусната.

Измеренията чрез трансстимпанален мембранен електрод сумиращи потенциали могат да премерят и оценят функцията на вътрешните слухови клетки. Обединеното действие на потенциалите измерени чрез трансстимпанален електрод или чрез конвенционална АBR като I вълна, показва отговорът на слуховия нерв. Изследването на слуховите отговори от мозъчния ствол показва

пет връхни точки, корелиращи с осмия ЧМН, кохлеарните ядра и латералните лемнискуси [186].

Освен изследването на слуха, децата с АН трябва да бъдат проследявани за това как възприемат говора и придобиват езикови умения. Развитието на речта играе важна роля в определяне успеха на лечението на слуха и необходимостта от осигуряване на последваща терапия.

При около 20% от децата с АН слухът се подобрява спонтанно без каквито и да е интервенции [187]. Методи на лечение, които могат да бъдат използвани са FM системи (frequency modulation, честотно модулирани), слухови апарати, кохлеарна имплантация.

FM системите се използват при слабо намаление на слуха/ социално адекватен слух при деца с АН, с дискретни промени в разбирането на речта- само в шумна обстановка.

Употребата на слухови апарати е дискутабилна при АН. Усилването не преодолява дефицита на разбиране на говор, а в някои случаи може да увреди слуховото възприятие. Verlin и съавтори [188] съобщават, че от 95 пациента, на които са поставени слухови апарати, само 11 придобиват задоволително разбиране на речта и се справят добре в училище.

Противоречащо на това съобщение е по-ново проучване [189], което сравнява резултатите от използване на слухов апарат в деца с АН и деца с невросензорна загуба на слуха. В него няма разлика в езиковите резултати между двете групи, предполагайки, че слуховите апарати са достатъчно ефективни и могат да бъдат лечение на първи избор за аудиторната невропатия.

След като вече е поставен слухов апарат, детето подлежи на мониториране за придобиване на речеви и езикови умения. Ако детето няма подобрения на тези умения, използвайки слухов апарат, трябва да се обмисли кохлеарна имплантация като следващо ниво в лечението.

Въпреки че лечението на АН с кохлеарна имплантация е прието, данните за кохлеарна имплантация в случаи с АН са все още ограничени. Много от проследените случаи на КИ са с успешни резултати [190,191,192]. Едностранната аудиторна невропатия се среща рядко и обичайно се дължи на едностранна аномалия на осмия ЧМН. Това са неподходящи за кохлеарно имплантиране деца [193].

## 1.4 Внезапна психогенна глухота у деца

Педиаричната неорганична загуба на слуха (non- organic hearing loss, NOHL) позната още като детска психогенна глухота (childhood psycogenic hearing loss, PHL) е категоризирана като психологически защитен механизъм или разстройство на конверсията. Използвайки изследвания на слуха като ABR, DPOAE и изследване на акустичния рефлекс, осигурява обективно оценяване на слуховите функции на пациента преди започването на клинични интервенции. Важно е не само да се избегне неправилното използване на медикаменти, но и диагнозата NOHL осигурява възможност за пациентите да получат психологичната помощ, от която се нуждаят.

Епидемиологичната информация е оскъдна. Според литературните данни PHL представлява 1- 3% от внезапно започналата глухота у деца [194]. Оценява се, че PHL е причина за 1% от консултациите в аудиологията [195]. Има две възрастови групи , в които проявите на PHL започват: 8-9 и 12 години.

Обикновено пациентите са от женски пол, с нормална или над средното ниво интелигентност, тревожни и амбициозни. У деца контекстът и механизмите на PHL се различават от класическата симулация описана у възрастни, като детската психогенната глухота не е резултат на планирана стратегия.

Деца с PHL се консултират от аудиолог по различни причини, например при провеждане на скрининг в училище; след като са съобщили за намаление на слуха или след като близките са забелязали проблем при възприемането. Парадоксално, в повечето случаи няма повлияване в училище. Свързаните симптоми са характерни за детската възраст: тинитус, усещане за хипакузис, оталгия [196].

Някои елементи са подозрителни за диагнозата още преди да бъдат извършени аудиологичните тестове- при снемане на анамнезата децата са способни да отговорят на въпроси, зададени с тих глас, без да четат по устните- например при провеждане на микроотоскопия, когато главата на детето е отведена в противоположната посока. Гласът на детето е нормален, недеформиран.

PHL не засяга деца под 5 годишна възраст, следователно методите за изследване на слуха съвпадат с тези при възрастни. При провеждане на тонална аудиометрия с чисти тонове някои елементи говорят за PHL, например невъзпроизводими слухови прагове при дадена честота, плоска аудиометрична

крива и поне една степен на несъответствие в загубата на слуха между двете уши.

При унилатерална или при твърде асиметрична слухова загуба, е лесно да се мисли за и постави диагнозата PHL. Например при едностранна пълна глухота при интензитет 100 dB, ако здравото ухо не е заглушено, PHL се подозира ако липсва фантомна крива в „глухото ухо“ при 50 dB. Също при говорна аудиометрия, при незамаскирано здраво ухо, трябва да има някаква разбираемост при 75 dB в „глухото“ ухо.

Импедансметрията с оценяване на стапедиус рефлекса е прост и бърз обективен аудиометричен метод. Стапедиалният рефлекс при стимулация на ухото, за което се твърди че е глухо, разкрва симулация.

Отоакустичните емисии и дисторшън продъкта се адаптират добре ако тъпанчевата мембрана е нормална. Присъствието им индикира, че слуховите прагове са поне 30 dB или още по-добри [198]. Ако средното ухо не е нормално, трябва да бъдат изследвани слуховите отговори от мозъчния ствол, ABR.

ABRs не винаги се измерват лесно в деца с PHL. Измерването им изисква пълна мускулна релаксация. ABRs потвърждават нормални прагове на 30 или 20 dB във високочестотния диапазон. Използването им се ограничава при социално адекватен слух/ слабо намаление на слуха или при намаление на слуха със зъбец в средните честоти. В някои случаи ASSRs (auditory steady-state responses) могат да бъдат използвани. Тяхно предимство е, че пациентът е буден и осигуряват слухови прагове за всяка честота и особено 1000 Hz, изключвайки загуба на слуха в средните честоти, което не е осъществимо при ABRs и OAEs.

При затруднение в диференциалната диагноза между PHL и слабо изразено намаление на слуха- социално адекватен слух- или невросензорна загуба на слуха със зъбец, обективните изследвания на слуха не винаги са достатъчно информативни. В тези случаи повторни аудиометрични изследвания на равни интервали трябва да бъдат провеждани, комбинирани с психологични консултации на децата и родителите. За флукуираща глухота и АН също трябва да бъде мислено в диференциално диагностичен план.

## 1.5 Възможности за изследване на слуха

### 1.5.1 Отоакустични емисии.

Известни са четири типа отоакустични емисии:

1. Спонтанни отоакустични емисии (Spontaneous otoacoustic emissions, SOAEs). Това са звуци излъчени без акустичен стимул;
2. Транзиентни/преходни отоакустични емисии (Transient otoacoustic emissions, TOAEs) или транзиентни евокирани отоакустични емисии (ТЕОАЕs)- звуци излъчени в отговор на акустичен стимул с много кратка продължителност – обикновено клик или звуков стимул (tone bursts);
3. Дисторзионни или деформирани отоакустични емисии (Distortion product otoacoustic emissions, DPOAEs) – звуци регистрирани в отговор на два едновременно подадени тона с различни честоти.
4. Отоакустични емисии с продължителна честота (Sustained-frequency otoacoustic emissions, SFOAEs)- звуци излъчени в отговор на продължителен тон.

ОАЕ е метод на изследване, който е напълно атравматичен и неинвазивен, бърз и не изисква скъпоструващи консумативи. От друга страна методът е напълно обективен и напълно приложим за неонатален скрининг.

За разлика от тоналната прагова аудиометрия отоакустичните емисии отразяват функцията само на периферната слухова система. ОАЕ могат да бъдат използвани за детерминиране наличието или отсъствието на кохлеарно функциониране, въпреки че анализ може да бъде направен само за определен честотен интервал.

Спонтанните отоакустични емисии представляват непредизвикан отговор регистриран в теснолентови ( $< 30$  Hz) честоти. За регистрирането му не се изискват допълнителни звукови стимули. Изисква многократно записване, за да се подsigури повтораемост и различаването му от базовото ниво на шум. Записите обикновено обхващат честоти от 500 до 7000 Hz.

За ТОАЕ най- често използваният стимул са кликовете. Клинично най-често се прилат стимули от 80 до 85 dB SPL. Скоростта на стимулиране е до 60 стимула в секунда. ТОАЕ се записват приблизително до 20 милисекунди. Когато са налични ТОАЕ възникват при честоти от 500 до 4000 Hz.

Стимулите необходими, за да се регистрират DPOAE, се състоят от два тона в две честоти (т.е.  $f_1, f_2$  [ $f_2 > f_1$ ]) и две нива на интензитет ( $L_1, L_2$ ). Връзката

между L1 и L2 и  $f_1 - f_2$  определя честотната характеристика. Настройка на 65/55 dB SPL L1/L2 често бива използвана. Записаните отговорите обикновено са най-силни при честота на излъчване  $2 f_1 - f_2$ .

Отоакустичните емисии (OAEs) са акустични сигнали, които се регистрират в слуховия канал. Те се появяват спонтанно като теснолентови тонални сигнали. OAE се появяват и по време на и след стимулация на ухото и се смята, че се дължат на вибрации, произведени на различни места в кохлеата. Те се регистрират в резултат на това, че вибрациите пътуващи към основата на кохлеата, причиняват преместване на костичките и ефекта от това преместване е движение на тъпанчевата мембрана (TM), наподобяващо движението на мембраната на високоговорител. Откриването на OAE от David Kemp през 1977 година води до промяна в представите за функционирането на слуховата система и преосмисля характера на слуховите увреди в кохлеата.

Съвременните теории за слуха предполагат, че здравата кохлеа ползва ефикасен механичен процес, за да усилва моделите на движение свързани с прага на стимулация до нива, сравними с чувствителността на сетивните елементи в Кортиевия орган. Този процес е наречен кохлеарен усилвател от Hallowell Davis през 1983 година. При нормални условия, усилвателната система произвежда финна чувствителност и честотна селективност [199]. Поведенческите прагове, от една страна, и директното измерване на отговорите на базиларната мембрана към нискочестотни стимули, от друга страна, разкриват ранимостта при исхемии, за които се знае, че водят до трайна загуба на слуха. Трайното увреждане на кохлеарния усилвател се смята за основен фактор за невросензорната загуба на слуха. Смята се, че емисиите се дължат на отделяне на енергия, продуцирана от кохлеарния усилвател към слуховия канал. Следователно кохлеарната увреда и слуховата загуба се отразяват с промяната в характеристиката на OAE.

Измерването на OAE осигурява на изследователя и клинициста поглед върху динамиката на кохлеарното функциониране в отговор на звуци с нисък и умерен интензитет. OAE са уникални в няколко отношения. При определени условия на стимулация, енергията, регистрирана като OAEs може да превиши енергията, използвана за стимулация. Следователно, отговорът може да бъде много силен при стимули с умерен интензитет.



ОАЕ ни дават информация за функцията на вътрешното ухо, която може да се оцени, чрез използването на неинвазивни техники, които не изискват седация. Тази акустична отоскопия позволява сканирането на кохлеарния епител от основата до върха и възпроизвежда акустични образи [200].

ОАЕ се генерират и могат да бъдат регистрирани само когато органът на Корти и средното ухо функционират нормално. Звукът, генериран в кохлеата е тих, но може да бъде записан, понякога в размер на 30 dB SPL. ОАЕs могат да възникнат спонтанно, защото звукът, който вече е достигнал кохлеата, постоянно циркулира, но по-често са резултат от акустична стимулация. Не са необходими електроди, за да бъдат наблюдавани ОАЕ. Те нямат електрическа природа, а са вибрационни отговори. За да бъдат доловени, се използват микрофони, и така те се превръщат в електрически, за да бъдат обработени по-лесно.

ОАЕs са създадени от движението на тъпанчето, задвижено от кохлеата посредством слуховата верига. За да бъдат записани ОАЕs, е необходимо здраво средно ухо с добра звукова проводимост.

По-силни ОАЕ дават по-голяма увереност, че слухът в съответното ухо е нормален. Съществува значима взаимовръзка между силата на ОАЕ и прага на чуване в смесена популация от индивиди с нормален и увреден слух.

Сигурно е, че здравата кохлеа има механизъм, способен да върне звука към средното ухо, а при значително увредена кохлеа това е невъзможно. Това прави ОАЕ уникално ценен клиничен инструмент.

ОАЕ инструментариум се състои от акустична сонда, която се поставя във външния слухов канал, съдържаща високоговорител, за да стимулира ухото; от микрофон, който да записва звуците в слуховия канал; от сепарираща сигнала технология. Последната може да различи звуците, генерирани в кохлеата, от други звуци- такива като стимули и шумове, да извлече, да анализира и покаже уникалните кохлеарни звуци [201].

Честотно специфична информация може да бъде получена чрез ОАЕ, предизвикана от стимули без честотна специфика, каквито са преходните. Кохлеарните отговори са честотно специфични и тази честотна специфика се запазва в случаите на преходна или тонална стимулация. Всяка част от кохлеата отговаря най-силно на определена честота. Това се отнася и за ОАЕ отговор. Уникалната характеристика на ОАЕ, е че отговорът на всяка част от кохлеата

може да бъде отделен от ОАЕ сигнал след неговото възникване в ухото, чрез инструментален честотен анализ. Има действаща разлика между употребата на широколентова (клик) стимулация и теснолентова (тонална) стимулация. С тонална стимулация (например DPOAE запис) се тества само част от кохлеата, така че е необходимо серия от измервания да бъдат направени, които да покрият целия честотен диапазон. С клик евокирани ОАЕ се събира информация от значителна дължина от кохлеата едновременно, и отговорът след това се разбива на отделни честоти.

Твърденията, че един вид ОАЕ технология е съществено по-добра от друга, трябва да бъдат изоставени. Техниките са различни и всяка от тях има предимства и недостатъци. Основната разлика между DPOAEs (distortion product otoacoustic emissions) и TEOAEs (transient otoacoustic emissions) техниките е в това какво кохлеата прави по време на изследването и в това кои части от целия ОАЕ отговор са уловени и кои части не са регистрирани.

DPOAE методът не регистрира всички ОАЕ честотни стимули, присъстващи в отговора. TEOAE методът улавя всички компоненти на ОАЕ - и линейни и нелинейни - но нелинейният процес на утвърждаване жертва линейната част ОАЕ, водейки до загуба в сигнала за шум

ТЕОАЕ са показали, че могат да разграничат нормален от увреден слух при 20 до 30dB HL. Информацията се събира едновременно в широк честотен диапазон и може да бъде анализирана ретроспективно по честота. Информацията може да бъде групирана и осреднена в честотни ленти, както се изисква когато се сравнява информация. TEOAE може да се наблюдава в реално време (20мс) и дори при клинични условия скрининг тест може да бъде проведен за по-малко от минута. Средното време, необходимо за провеждането на теста, дори и при новородени, е около две минути. Теста има много висока специфичност (+95%) при новородени с чисти сухи уши.

Недостатъкът на TEOAE техниката е, че не успява да извлече отговори във високо честотната част, поради стробиращото време използвано да раздели стимулите от ОАЕ. Високочестотните ОАЕ имат най-късо латентно време и се губят. TEOAE специфично намаляват с възрастта, вероятно поради чувствителността на TEOAE към клинично незначителните промени в кохлеата. Този ефект може да бъде компенсиран до някаква степен чрез повишаване

интензитета или скоростта на стимулите. Природата на клик стимулите предопределя че лимита на инструменталното обурудване бързо се достига.

Тоналните стимули, използвани в записите на DPOAE, предлагат по-широк обхват за подсигуряване на кохлеата със стимули с по-голям интензитет. Нивата на типичният постоянен стимул, използван за клиничното измерване на DPOAE (60- 70 dB SPL) съставляват по-интензивно стимулиране от средното ниво използвано по време на стандартния TEOAE запис. Това може да е за сметка на по-високата отсечна точка за DPOAEs (35- 45 dB) и по-ниската чувствителност при загуба на слуха. Основното предимство на DPOAE техниката е способността ѝ да възстанови OAE отговори над 6k Hz, въпреки че външният слухов проход при възрастни пациенти може да причини трудности в калибрирането в тази област.

DPOAE и TEOAE техниките се оказва, че са по-скоро допълващи се. TEOAE са най-добри в откриването на високи прагове под 3 k Hz. DPOAEs са най-добри над 3 k Hz [202]. TEOAE могат да бъдат твърде чувствителни при възрастни, а DPOAE могат да бъдат твърде нечувствителни. TEOAE дават осреднен поглед за кохлеарната функция. DPOAEs са бързи и специфични към набор от параметри на стимула. TEOAE осигуряват поглед над кохлеарната активност при слаба стимулация; DPOAE се наблюдават при умерени и високи нива на стимулация. И двата вида OAE- DPOAR и TEOAE са отлично средство за скрининг.

Нивото на OAE може да бъде изключително чувствителен индикатор за промени в кохлеата. Много са факторите, които могат да повлияят нивата на OAE и попречат на количествената интерпретация. Промени в средното ухо или в състоянието на кохлеата се отразяват в OAE ниво. Контралатералното активиране на медиалната еферентна система намалява OAE нива с 10 до 20%. Излагането на шум подтиска OAE емисии значително. Бримковите диуретици също подтискат OAE.

Спонтанните отоакустични емисии, SOAE (Spontaneous otoacoustic emissions- SOAEs) са тонални сигнали с ниско ниво, измерени във външния слухов канал, в отсъствието на стимул. Те са недоловими за човешкото ухо и наличието им предполага, че кохлеарната слухова чувствителност е нормална близо до честотата на SOAE.

СОАЕ са постоянни и теснолентови с честотна ширина около 1 Hz [204]. Те се появяват при относително стабилни амплитуди и честоти, така че усилването на сигнала и усредняването на спектъра на шума във външния слухов канал е всичко, което е необходимо, за да се установи наличието на спонтанни емисии. Те са раними при исхемия- известно е че тя засяга външните клетки, а именно хипоксия, ототоксични медикаменти, шум [205].

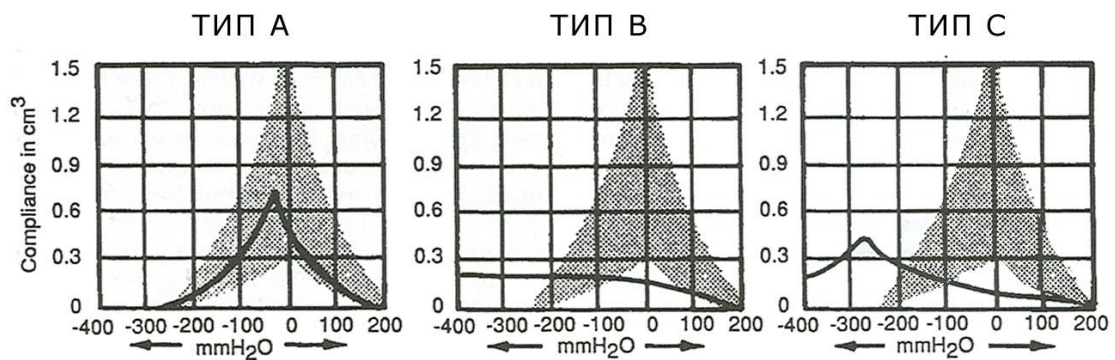
СОАЕ не се записват, когато е налична загуба на слуха по-голяма от 25 до 30 dB HL [206], въпреки че могат да бъдат регистрирани и при слабо звукоприемно намаление на слуха. Когато се касае за подобен случай, ухото трябва да има средна загуба на слуха повече от 25 dB HL [206, 207] и СОАЕ се свързват с честотен регион, където има запазване на слуховата чувствителност (>15 dB HL). СОАЕ възникват с една и съща честота у новородени, деца и юноши [208]. Не са открити разлики в разпространението между едномесечно новородено и възрастни. За хора над 60 години, разпространението на СОАЕ изглежда намалява, дори когато слухът остава нормален. В контраст разпространението на останалите видове отоакустични емисии не се променя значително с напредване на възрастта, когато слуховата чувствителност е контролирана [206].

Ефектите от дисфункцията на средното ухо върху ОАЕ са комплексни. Дисфункциите на кавум тимпани намаляват измерените амплитуди на емисиите и понякога елиминират изцяло отговора. Промените в характеристиките на ОАЕ, дължащи се на дисфункция на средното ухо, са резултат от промени в трансмисията към кохлеата и обратно-от кохлеата към слуховия канал. Различни увреждания на средното ухо засягат по различен начин трансмисиите. Например перфорация на тъпанчевата мембрана може да повлияе предимно трансмисията напред, към кохлеата, а други състояния като цикатрикс на тъпанчевата мембрана – ще повлияе предимно трансмисията назад, към слуховия канал. Следователно за клинично приложение е важно да се изследва и оцени функцията на средното ухо, за да се разграничат аномалиите в средното ухо от кохлеарна дисфункция. Състоянията на външното и средното ухо се смята, че значително повлияват на резултатите на скрининговите програми при изследване на слуха на новородени. Успехът или провалът на такива програми зависи от възможността да бъдат минимизирани фалшиво положителните резултати от скрининга, които се дължат на преходни състояния на външното и средното ухо.

В съвременната аудиометрия основните изследвания, които се извършват са измерване на динамичния импеданс. Това са тимпанометрията и акустичния рефлекс.

### 1.5.2 Тимпанометрия

Тимпанометрията е обективно изследване, което измерва промяната на комплайнса, вследствие на промяната на налягането приложено във външния слухов проход. Промяната на приложеното налягане варира от  $-200$  до  $+200$  daPa (паскала), приложението на тона в сондата е с честота 226 Hz. Резултатите от получените измервания могат да се систематизират и класифицират според Jerger / 1970 / [209] в три типа криви: тип А, тип В, тип С



Фигура 1. Видове тимпанограми.

Тип А или нормалната тимпанограма притежава пик отговарящ на максималната проводимост на средното ухо, близка да нормалното атмосферно налягане ( $0 - 100$  daPa).

Тип В тимпанограма няма пик на максимална проводимост, като налягането във външния слухов проход варира в зависимост от проводимостта на средното ухо. При тимпанограма тип В има постепенно повишаване на проводимостта с

промяна на налягането от + 200 до – 400 daPa без поява на пик. Най – често тип В отговаря на наличието на излив в средното ухо.

Тип С тимпанограма при която има точка на максимална проводимост, като пикът на налягането във външния слухов проход се получава около – 100 daPa. Тази тимпанограма обикновено отговаря на дисфункция на Евстахиевата тръба и може да предхожда появата на течност в средното ухо и този тип тимпанограма може да премине в тип В.

Естествено може да има вариации на тези тимпанограми дължащи се на различна патология в средното ухо / намалена подвижност на слуховата верига, прекъсване на слуховата верига и др./.

Поради провеждане на тези изследвания предимно върху деца, е необходимо да се отбележат и някои особености при тимпанметрията произтичащи от матurationта на средното ухо и нервните пътища. Разликите между свойствата и особеностите на средното ухо в неонаталния период и при възрастните хора, са описани от Holte (1991) [210] и съавтори; Keit ( 1975), Himmelfard (1979) [211] и съавтори. Някои от особеностите са наличие на двоен пик, дължащ се на преобладаващото значение на масата на слуховите костици и доминиращото значение на съпротивлението, увеличената подвижност на стената на външния слухов канал и увеличена подвижност на тъпанчевата мембрана, особено до 4 месец. Свързаните с възрастта особености на тъпанчевата мембрана могат да се систематизират по следния начин;

- масата и устойчивостта на тъпанчевата мембрана;
- увеличаване на ъгъла на фазата се увеличава в зависимост от възрастта, където основна роля има комплайнса на средното ухо;
- резониращата честота се увеличава, като функция на възрастта;
- амплитудата на проводимостта се увеличава с възрастта;
- при по-малките от един месец деца се наблюдава и колапс на външния слухов проход;
- в някои случаи се наблюдава необяснима промяна на проводимостта при здрави деца.

Поради тези причини изследванията в аудиологията е необходимо да се интерпретират взаимосвързано и в този ред на обсъждане тимпанметрията при възможност трябва да се подкрепи с рефлексометрия, а в ранна детска възраст и с отоакустични емисии. По този начин в неонаталния период те могат да имат

скринингова или диагностична стойност, и да се диференцира наличието на промени в средното ухо от тези на кохлеарната дисфункция. В много страни тимпанометрията е задължителна при скрининга в училищна възраст, заедно с тонално прагова аудиометрия.

Използването на тимпанометричното изследване при кохлеарната имплантация е за да се определи функционалното състояние на средното ухо и функцията на евстахиевата тръба и позволява да се проведе импедансметрията. При повишено съпротивление в средното ухо е възможно неточно определяне на прага на слуха, например тежко чуване да се приеме като практическа глухота.

### 1.5.3 Акустикус рефлекс

Интерпретацията на състоянието на *musculus stapedius*, чрез измерване на рефлекса му е една от основните техники в съвременната аудиология. След публикуване на класическата монография на Metz /1946/ и последвалото приложение на метода в аудиологичната методика се наблюдава значително подобряване на качеството и прецизността на диагностиката на състоянието на слуховия анализатор. По този начин се спомага да се отдиференцират звукопроводното от звукоприемното намаление на слуха, акустикус рефлекс спомага и при диагностиката на парализата на лицевия нерв при пациенти с едностранна тотална глухота и наличие на рекруитман феномен. Разработката на Metz стимулира развитието на изследванията върху функцията на мускулите в средното ухо и клиничното приложение на акустикус рефлекс.

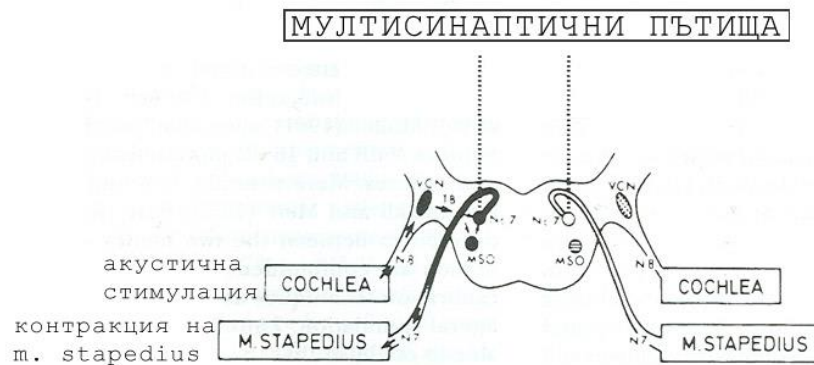
Според Simmons /1964/ три са основните функции на рефлексната активност:

- непрекъснато променящ се мускулен тонус ;
- контракция под въздействието на звуков стимул;
- контракции свързани с други двигателни реакции, като движение на главата, говор, дъвкане и др., които спомагат да се намали ниско честотното шумово въздействие на тялото, които имат заглушаващо въздействие върху външните високо честотни звуци.

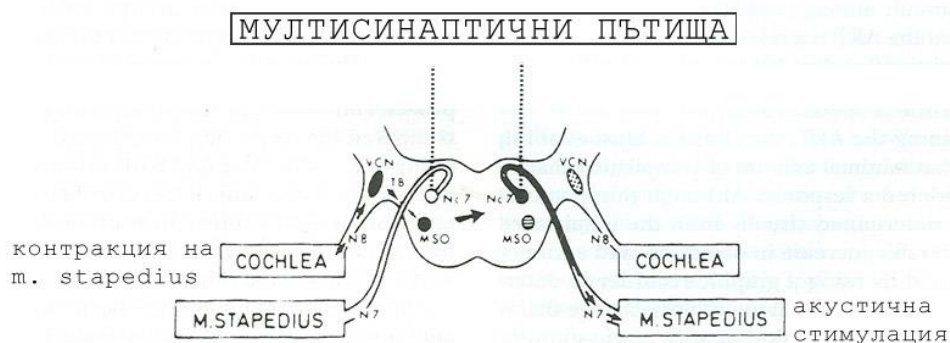
Когато ухото е стимулирано от достатъчно силни звуци и двата стапедиални мускула / ипси- и контра- латерално/ се съкращават Фиг.9. Акустичният рефлекс зависи от адекватната физиологична функция на цялата рефлексна дъга, включваща сензорните рецептори / кохлеа / и аферентните неврони / осми нерв/ ,

интерневрони / мозъчни / , еферентни неврони / седми нерв / и ефекторни органи / Musculus stapedius /. Специфичните страни на патологичните промени при акустичния рефлекс се определя при сравняване на затворения стапедиален рефлекс / контралатерален / и отворения такъв / ипсилатерална стимулация / .

### А | ИПСИЛАТЕРАЛЕН РЕФЛЕКС НА М. STAPEDIUS



### В | КОНТРАЛАТЕРАЛЕН РЕФЛЕКС НА М. STAPEDIUS



Фигура 2. а) ипсилатерален рефлекс на m.stapedius; б) контралатерален рефлекс на m.stapedius

Прагът на реакция при акустичния рефлекс е едно от необходимите изследвания при определяне състоянието на слуховия анализатор, като изследването е напълно обективно. Акустичният рефлекс представлява звукова стимулация (контра или ипсилатерална) , като необходимо условие е състоянието на средното ухо да е с нормален импеданс и акустичната стимулация да е



достатъчна по сила за да предизвика рефлекс на стапедиалния мускул. При подаване на звука от сондата се намалява съпротивлението на тъпанчевата мембрана. В аудиологичната практика проследяването на рефлекса при контралатерална стимулация, сравняването на резултатите от ипси и контра стимулация се оказва особено полезно в много диагностични ситуации. Измерването на прага на получения рефлекс се определя от минималното количество звуков стимул, който предизвиква промяна в средното ухо и по този начин може да се измери промяна на комплайнса. Изследванията проведени върху голяма група от нормално чуващи пациенти установяват, че необходимия минималния праг за да се предизвика акустикус рефлекс е от порядъка на 70 до 100 dB HL. Средната стойност за контралатерална стимулация на стапедиалния рефлекс е приблизително 85 dB за чистите тонове и около 65 dB HL за теснолентов шум. Прагът на детекция при ипсилатералната акустична е малко по – нисък, той се определя чрез увеличаване или намаляване с минимална стъпка от 5 dB за да се определи минималния интензитет предизвикващ промяна на комплайнса в средното ухо и предизвикващ контракция на musculus stapedius. Обикновено измерването на контракцията на musculus stapedius се извършва за честотите от 500, 1000, 2000 и 4000 Hz. Определянето на стапедиалния рефлекс е относително стабилна характеристика на слуховата система.

Диагностичното приложение на стапедиус рефлекс, трябва да се разглежда като част от основния набор от изследвания установяващи, както състоянието на средното ухо, така и цялостната функция на слуховия анализатор, / Jerger and Hayes, 1980; Northern, 1984/[212]. Импедансметрията е следващата стъпка след тимпанометричното изследване и допринася за определяне на статичния комплайнс, като част от тестовете за определяне на акустичното съпротивление. Ясно е, че акустичният рефлекс не може да се разглежда изолирано, а като основна и неразделна част от цялостния набор от тестове за определяне на състоянието на слуховия анализатор. Самостоятелната интерпретацията на липсата на праг на акустичния рефлекс е затруднена, поради факта че може да е причинена от различни патологични условия. Например липсата на акустикус рефлекс при контралатерална стимулация, може да се дължи на:

- тежко звукоприемно намаление на слуха;
- значимо звукопроводно намаление на слуха;

- тумор на осмия черепномозъчен нерв;
- лезия на нервните влакна при прекръстосването на рефлексната дъга в централните отдели на главния мозък;
- контралатерални нарушения на лицевия нерв;
- контралатерални нарушения в средното ухо.

Използването на импедансметричните тестове при определяне на звукопроводното намаление на слуха е напълно обективно и се регистрират и при най- малките промени в състоянието на средното ухо, без да има аудиометрични данни за тези патологични промени. Липсата на акустичния рефлекс при ипси и контра стимулация е симптом на патологични промени в средното ухо. Трябва да се отбележи, че акустичният рефлекс се изследва само при нормален импеданс на средното ухо. Както, и че при определени патологични състояния на средното ухо не се подтилка, а се регистрира стапедиус рефлекс. Например при някои форми на прекъсване на слуховата верига, при които е запазена връзката между стапеса и стапедиалния мускул; при холестеатом, който не е нарушил целостта на слуховата верига; при някои форми на негативно налягане в средното ухо и др.

При нарушения, засягащи звукоприемната част на слуховия анализатор, основното предизвикателство е с помощта на тези тестове да се отдиференцират кохлеарната и ретрокохлеарна патология, което е задължително преди кохлеарната имплантация. В този аспект основната диагностична цел е базирана на:

- взаимоотношението на прагът на стапедиалния рефлекс и степента на слуховото нарушение;
- времето необходимо за предизвикване на стапедиалния рефлекс;
- взаимоотношението между контра и ипсилатералния рефлекс.

Най - ранното приложение на акустикус рефлекс е свързано с кохлеарните промени в слуховия анализатор, Metz / 1952/ установява , че при нормална слухова функция е необходима сила на звука от порядъка на 60 dB, за да се предизвика контракция на мускула. Следователно сравняването на прага на тоналната прагова аудиометрия по въздушен път с прагът на акустичния рефлекс ни информира за степента на рекруитмана и настъпилата кохлеарна увреда. Този тест е напълно обективен за наличие на кохлеарна увреда.

Внимателното интерпретиране на резултатите получени от стапедиалния рефлекс, едновременно с останалата диагностична информация ни помагат да установим ретрокохлеарна патология.

Приложението на акустичния рефлекс при мозъчни лезии се базира на сравняването на ипсилатералните с контралатералните прагове на рефлекса. Липсата на контралатерален рефлекс при нормален ипсилатерален и нормална тонално прагова аудиометрия може би е свързана с мозъчни нарушения. Слуховият нерв, кохлеарното ядро и горният оливарен комплекс са свързани с пътя на рефлексната дъга.

При нарушения настъпили в седмия черепно мозъчен нерв, с изследването на акустичния рефлекс се определя страната на увредата, както и нивото му (дали е дистално или проксимално от стапедиалното клонче на седмия черепномозъчен нерв). Интерпретацията на нарушената моторна функция на лицевия нерв е функция на еферентния нервен път. Необходимо е проследяването на промяната на акустичния рефлекс във времето.

Трябва да се отбележи, че измерванията на акустичния рефлекс не са тестове за пряко определение на нивото на слуха и не замества тонално праговата аудиометрия по костен и въздушен път. Този тип изследвания се използват в клиничната практика, за да се определи вида на слуховите нарушения. Тези тестове заедно с тестовете за прагова и надпрагова аудиометрия, които са част от психоакустичния набор от тестове, се допълват взаимно и обективизират наличието на кохлеарна патология, степента на слуховата загуба, лезия в областта на осмия или седмия черепномозъчни нерви и др. Използването на стапедиус рефлекс е необходим метод на изследване, както непосредствено след операцията, така и по време на настройката на импланта. Чрез този тест се определя обективно реакцията на слуховия нерв при електрическото дразнене.

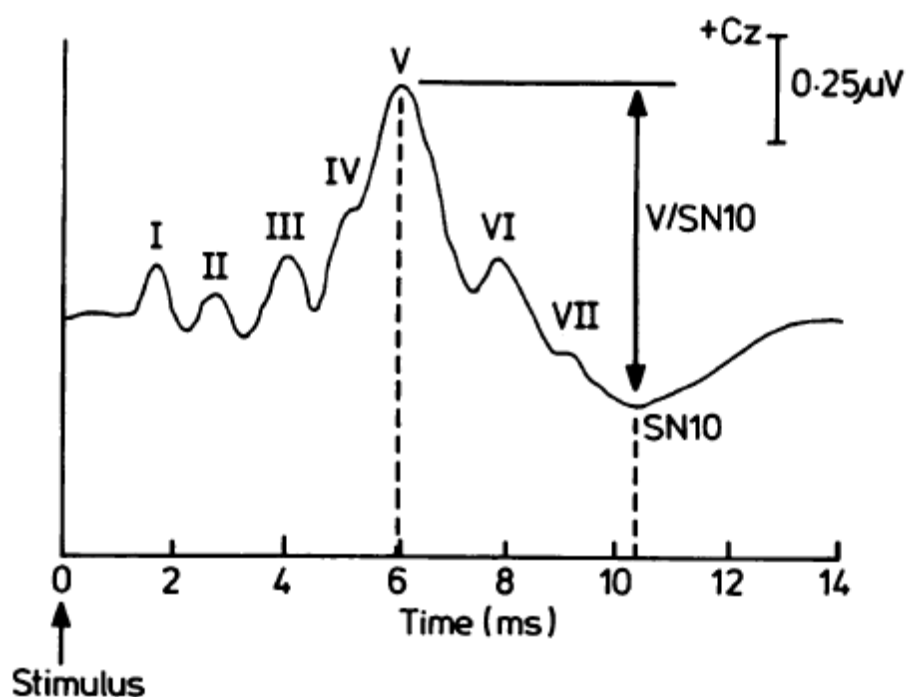
#### 1.5.4 Слухови стволови евокирани потенциали, ССЕР

Първите записи на евокирани слухови потенциали са направени от Davis през 1939 год. при спящи пациенти. Той и неговите съавтори идентифицират “К комплекс”, който отговаря на V отвеждане. През 1961 година Clark и съавтори правят възможно усредняването и сумацията на потенциалите на базата на компютърните технологии, като конвертират аналоговия сигнал в цифров и тези

данни могат да се записват и манипулират. Първите потенциали, които са записвани и използвани в клиничната практика са кодовите , които се генерират през период от 50 – 500мл (секунди след стимула) Davis and Yoshie, 1963 . Първите открития в областта на слуховите стволони евокирани потенциали са свързани с Sohmer and Feinmesser / 1967/, Jewett and Williston / 1971 /.

Jewett и Williston през 1971 на базата на експериментите с животни на Sohmer I Feinmesser доказават за първи път, че стволова активност може да бъде записана неинвазивно през човешкия скалп [213]. Това откритие дава базата за създаването на аудиометрията със слухови стволони евокирани потенциали (Auditory brainstem response (ABR) audiometry / Brainstem evoked response audiometry). ABR аудиометрията представлява неинвазивно измерване на евокирани потенциали генерирани от кратък „клик“ или тон излъчени от акустичен трансдюсер (различни форми на слушалки). Предизвиканите биоелектрични сигнали се улавят с помощта на електроди, които типично се поставят на вертекса на скалпа и ушните лобули. Амплитудата, измервана в микроволтове, се усреднява и се записва в координата спрямо времето в милисекунди, подобно на електроенцефалография. ССЕРП стават един от най-широко използваните методи за обективно изследване на слуховия анализатор, естествено доста е усъвършенстван и обогатен с разнообразни приложения. Апаратурата за анализ и измерване се променя паралелно с развитието на компютърните технологии и сензитивни датчици.

Слуховите евокирани потенциали се разделят на такива с ранна, междинна и късна латенция (закъснение) на отговора, в зависимост от времето на поява на потенциала върху записа след пускане на стимула (звуковия сигнал). Всеки от тези класове съответства на електрическата активност на все по-високо ниво от пътя на слуховия анализатор. Електрическата активност изхождаща от слуховия нерв и ствола се дефинира като слухови стволони потенциали (auditory brainstem response). Те са в групата на потенциалите с ранна латенция и се появяват в първите 10 милисекунди след звуковия сигнал. Първото дефинитивно описание на слухови стволони потенциали при човек е дадено от Jewett и Williston през 1971 [214]. Те представят евокирани отговори след високо интензитетен „клик“ стимул и записват от вертекса и ипсилатералния мастоид чрез електроди седем вълни (означени от I до VII с римски букви) [фигура 3].



Фигура 3. Слухови стволони потенциали.

Тези вълни са далечни записи на електрическа активност от последователно активирани неврони на асцендиращия път на слуховия анализатор. Счита се, че вълна I представлява акционния потенциал на слуховия нерв и е аналогична на акционния потенциал записван при електрокохлеография [215]. Вълна II произхожда преобладаващо от проксималните региони слуховия нерв, а вълна III от кохлеарното ядро. За източник на вълна IV се счита горния оливарен комплекс, вълна V – *lemniscus lateralis* [216]. Вълни VI и VII са считани за отражение на електрически потенциали основно в *colliculus inferior*. На фона на тези бързи индивидуални вълни на слуховите стволони потенциали Jewett описва и бавни вълни, които имат пик приблизително по същото време, както вълна V и преминават на десетата милсекунда. Това затихване на 10 милсекунда се нарича бавна негативна компонента и се означава SN10 по Davis и Hirsh [217]. Произхода му вероятно е от средния мозък вследствие на постсинаптична активност в *colliculus inferior* [218]. Фактът, че вълна V и SN10 компонентата могат да бъдат записани след стимул близък до прага на чуване, дава възможността тази методика да бъде използвана като обективно изследване на слуха при различни честоти. Допълнителна положителна характеристика на методиката ѝ е, че тя не се потиска при анестезия или сън.

Слуховите стволови потенциали се измерват чрез един електрод позициониран върху област на висока активност (активен електрод) и втори електрод върху област със слаба активност (референтен). Оптималния звуков стимул трябва да бъде относително рязък, така че да провокира отговор, който има висока степен на синхрон при активирането на деполаризацията на нервните окончания, поради което най-често се използва „клик“ стимул. Последният се генерира чрез 100 микросекунден електрически пулс през слушалки и се калибрира на децибели над слуховия праг на нормално чуване. Резултатът е акустичен стимул, който има достатъчна синхронна енергия в голяма част от честотния спектър на чуване. Това води до стволотен отговор, който се генерира основно от базалната витка на охлюва (високите честоти). Нормалният праг на стволотите потенциали записани при „клик“ кореспондира с прага на нормално чуване в честотите от 2 kHz до 4 kHz [219]. Други автори обаче не са на същото мнение и считат, че има индивидуални разлики и не може да се твърди за индивидуалния пациент [220].

Слуховите стволови потенциали са много слаби на фона на биоелектричния шум на нервната система и неколкостепенни повторения са необходими, за да може отношението слухови потенциали/шум да се подобри чрез т.нар. усредняване на сигнала. При аудиологичните изследвания записите се правят при различна сила на стимула до момента на липса на отговор, което показва и ориентировъчния праг на чуваемост. Обикновено се използват стъпки с по 10 dB. Необходим е опит и разбиране на същността на метода, за да може да се интерпретират правилно слуховите стволови потенциали.

Евокираните потенциали с „клик“ ни дават относително добра информация на чуваемостта при по-високите честоти, но не и при ниските. Така едно нарушение на чуването в ниските честоти не би могло да се идентифицира, както и намаление на слуха само във високите честоти може да бъде интерпретирано като много по-тежко намаление от реалното. Използването на тонални „пиукания“ (pips) с честота около 1 kHz могат да ни дадат допълнителна информация за състоянието на прага на чуваемост в ниските честоти, но въпреки това стволотите потенциали индуцирани с „пиукания“ не са така добре отчетливи, както тези индуцирани с „клик“.

Узряването в различните параметри на слуховите стволови потенциали е добре документирано още седемдесетте години [213]. Типично то включва промени в

латенцията и амплитудата на отговора като функция на възрастта . Преди 35 седмица от зачеването потенциалите често са по-слаби, вариращи и по-мъгляви като конфигурация . След 35 седмица добре дефинирани, три-пикови отговори са обикновено налични . След 3-ти месец от раждането потенциалите започват да приемат характеристиката на тези при възрастните и на 1 и 3 години вече почти напълно приличат на нея .

Критериите за диагностициране на намаление на слуха включват времето на забавяне на потенциалите спрямо нормалните стойности, промени в амплитудата на регистрираните вълни и промени в праговете на отговор [221].

При налично проводно намаление на слуха, потенциалите показват удължена латенция и промени в прага на отговор, съответстващи на степента на намаление на слуха [222]. Разбира се основна роля за отдиференцирана на приемно от проводно намаление на слуха се използва костната и въздушната проводимост.

При чисти плоски кохлеарни лезии липсват отмествания в латенцията, а само промени в прага на чуваемост . Важно е също да се отбележи, че “стръмни“ високо-честотни кохлеарни намаления на слуха произвеждат също забавяния в латенцията поради факта, че е необходимо време вълната да премине през нефункциониращия базален регион на охлюва и да достигне до работещи структури на кортиеви орган в по-горните отдели на охлюва [223]. Скоростта на бягащата механична вълна на звука се движи с максимална скорост в областта на базалната витка – 30 m/s и впоследствие експоненциално намалява своята скорост отивайки към апекса на охлюва. Съответно експоненциално би се увеличавала латенцията. Например намаление във високите честоти започващо на 4 kHz би имал малък ефект върху латенцията на потенциалите, но при спад в слуха започващ от 2 kHz резултиращото забавяне (латенция) би било около 1 ms, при спад започващ от 1 kHz – 2ms, 0,5 kHz – 4 ms. Допълнително намалява амплитудата на отговора в тези случаи – нормално начално високата скорост на звуковата вълна води до възбуда на много повече клетки от базалната витка за кратък период от време (синхронно) и съответно голяма част от приноса за амплитудата на вълната идва от този сегмент на охлюва, докато при високо-честотни намаления на слуха амплитудата се „захранва“ само от по-слабото и десинхронизирано възбуждане на клетки от апекса на охлюва.

Болести на нерва се характеризират със забавяне на времето между кохлеата и ствола [224], т.е. удължена латенция между отговора на кохлеата (вълна I) и

отговора на ствола (вълна V). Критериите за диференциране между кохлеарна и невродегенеративна увреда е във времето забавяне между кохлеата и ствола. Вълна I (кохлеарния отговор) се презентира с нормална латентност, докато вълна V (отговора на ствола) се забавя в зависимост от степента на неврална увреда. Това забавяне може да се свързва с директно нарушение в миелиновата обвивка (напр. Неврином на n. vestibulocochlearis) или индиректно притискане от друга маса в понтоцеребеларния ъгъл. На базата на тези факти Steinhoff и съавтори изгражда алгоритъм за диагностика .

Други автори обаче отричат тази абсолютизация на диагностичната специфичност на тези критерии [225]. Те описват два основни типа патологични модела на отношението латенция/интензитет на сигнала. При първия тип вълна V има нормална латенция при висок интензитет на стимулите, но с намаляването на интензитета започва да се отмества, т.е. да проявява латенция. Този модел често, но не винаги [226], е характерен за кохлеарна загуба на слуха. Вторият модел е характерен с цялостно отместване наляво (пролонгиране) на латенцията. Типично това се свързва с проводно намаление на слуха, но стръмни високо-честотни приемни намаления на слуха, както и/или ретрокохлеарни увреди могат да бъдат причина . Всъщност всяко невросензорно намаление на слуха може да даде забавяне в латенцията на V вълна . Това се свързва с широкия спектър на възбуда, който осъществява „клик“-а. Когато увреда е свързана само с един регион от честоти, ABR аудиометрията с не-маскирани кликове често пропуска или подценява тези загуби. Такива ситуации се наблюдават при високо-честотни, ниско-честотни и средно-честотни намаления на слуха (“cookie-bite losses”). Авторы съветват използването допълнително на ABR аудиометрия с кратки тонове (brief tones) с цел подобряване на чувствителността на метода [225].

### 1.5.5 Auditory Steady-State Response testing (ASSR)

ASSR е обективен тест, използван за оценка на слуховите способности на деца, които са твърде млади, за да бъдат изследвани с традиционните аудиометрични тестове. Повечето деца се насочват за провеждане на ASSR след проведения слухов скрининг в неонаталното отделение при раждане, който индикира увреждане на слуха. Тестът се провежда под обща анестезия или по време на сън



при деца под 6 месеца. Резултатите се получават чрез измерване на мозъчната активност докато изследваният слуша тонове с различна честота и интензитет. ASSR са електрофизиологични отговори на бързи слухови стимули. Целта на ASSR е да създаде аудиограма, която може да даде информация за слуха, загуба на слуха и звукова рехабилитация. ASSR позволява на аудиолозите да създадат статистически валидни аудиограми при пациентите неспособни или нежелаещи да участват в традиционните тестове. ASSR разчита на статистически методи, за да определи кога и дали е наличен праг на слуха.

В някои аспекти ASSR е подобен на ABR. Например и двата теста записват биоелектричната активност с електроди подредени в сходни зони; са слухови евокирани потенциали; използват акустични стимули.

Както при ABR, ASSR се използват за определяне на слуховите прагове при пациенти, които не могат или не желая да съдействат при извършване на аудиометрия. Следователно основната група кандидати за извършване на изследването ще включва: новородени- за провеждане на скрининг и последваща диагностична оценка, новородени в интензивни неонатални отделения, несътруднически и/или коматозно болни, ототоксичен мониторинг и други.

Няма универсален стандарт за ASSR оборудването. Стимулите, параметрите за запис и методите се проектират от всеки производител. ASSR могат да бъдат записани използвайки или широколентов или честотно- специфичен стимул. Широколентовите стимули включват кликове, шумове, амплитудно модулиран шум и писукащи звуци. Честотно специфичните шумове включват филтрирани кликове, тесно лентови шумови излъчвания, tone bursts, амплитудно модулирани теснолентови шумове, амплитудно и честотно модулирани чисти тонове.

Честоти от 500, 1000, 2000 и 4000 Hz са често използвани. Тези честоти се модулират във връзка с амплитудата и честотата.

По- високите честоти на модулация генерират биоелектрични отговори получени от мозъчния ствол (като ABR) и следователно са по- малко чувствителни. По- ниско честотни модулации могат да бъдат използвани (напр 40Hz), но не включват компоненти на отговора за средна латентност (middle latency response, MLR) и следователно се повлияват от изследвания субект. Подобно на традиционните аудиометрични тестове, прагът на слуха се определя като най- ниското ниво за всяка честота, при която е налице отговор.

Анализът на ASSR се основава на факта, че свързаните биоелектрични събития съвпадат с честотата на повторение на стимула. Следователно анализът е математически базиран.

Мозъчната активност се записва чрез електроди. Ползването на електроди елиминира нуждата от активно участие на изследвания. Местата за поставяне на електродите при ASSR често са същите или подобни на традиционните записващи монтаж, използвани за ABR записи. Двата активни електрода се поставят върху или близо до вертекса и на ипсилатералния мастоид, докато заземяващият електрод се поставя върху челото. Ако апаратът събира данни едновременно от двете уши, се използва двуканален усилвател; когато се използва едноканална записваща система за откриване на активност в двете уши, общ референтен електрод може да бъде разположен в областта на тила. ASSR е надежден и ефективен метод за определяне праговете на слуха.

### 1.5.6 Тоналната прагова аудиометрия, ТПА

ТПА е стандартна процедура за определяне степента на слуховата чувствителност. Последната се изследва по костен и въздушен път, като сравняването на прага по костен и въздушен път ни дава основна представа за функционалното състояние на слуховия анализатор. Общо прието е прагът по въздушен път да се приема като стандарт при определяне на степента на слуховата загуба. Поради тази причина е необходимо точно спазване на правилата при провеждане на изследването. Това се обуславя от факта, че праговата аудиометрия не е напълно обективен метод и при нея съществува определена субективност от страна на изследвания и изследващия. Много стратегии са използвани в старанието за максимално обективизиране на метода. При взимане на конкретното решение се преценяват: околната среда, тествания сигнал, използваната апаратура, характеристика на изследвания пациент, оценка на използваните тестове и опита на изследващия. Много е важно да се спазват винаги необходим минимум от изисквания, с цел получаване на максимално точни резултати.

Прагът на чуваемост е дефиниран от ANSI / American National Standards Institute – 1973, така: минимума от ефективното звуково налягане на акустичния сигнал предизвикващ слухово усещане в определената честотна фракция. Проблемата е,

че минимума от слуховата чувствителност е доста променлива величина, а прагът трябва да се определя като приблизително стабилна величина. Прагът на слуха обикновено се определя като най - ниския интензитетен сигнал, при който се регистрират 50 % от подадените сигнали за определено време. В някои случаи промяната на прага зависи от външни фактори за изследвания пациент, тези външни влияния могат да се контролират при лабораторни условия. Физичните фактори като температура, влажност, светлина, заобикалящо шумово ниво също влияят на прага на слуха. Необходимо е апаратурата да бъде калибрирана, за да се работи стабилно и да се избягват неточности от промяна на нивото на сигнала. Методологията и инструкциите към изследвания трябва внимателно да се определят.

Поради тази причина и стъпката за намаляване на силата на сигнала е приета да е 5 dB, тази разлика в налягането се усеща достатъчно добре от пациента и е напълно информативна за отолога, и получените резултати са напълно задоволителни.

В нашата практика използваме конвенционалната прагова аудиометрия, при която се използва ръчен контрол върху подавания сигнал и останалите параметри от страна на изследващия. Прагът на слуха може да се получи освен чрез слушалки, също и чрез използване на високоговорители в свободно звуково поле ( аудиометрия в свободно звуково поле). Използваните аудиометри са съобразени с международните стандарти, ширината на честотната характеристика е от 125 до 12000 Hz и с усилване до 120 dB.

Може да се приеме, че тези критерии са в основата и на съвременните аудиометрични изследвания. Различни са стандартите за първоначалното запознаване на пациента с изследващата честота. Данните от аудиометричните тестове се нанасят на аудиометрична таблична бланка. Съществуват определени различия между препоръките на ASHA от 1990 година и използваните символи в нашата страна.

Винаги трябва да се преценява и състоянието на изследвания пациент; емоционална мотивация, общо физическо състояние, както и слуховата патология. Някои заболявания като инфекции на средното ухо, болестта на Мениер, ототоксичност, съдова недостатъчност и други, променят не в малка степен състоянието на минималния праг в различните часове на деня и се влияят от нивото на наличния субективен шум. При наличие на физически дискомфорт

/ особено при малките деца / и негативизъм към самото изследване, трябва да се отложи изследването във времето. Малки деца и пациенти с умствени проблеми е необходимо да се изследват неколkokратно, на принцип два лъжливи типа отговора могат да се получат;

лъжливо позитивен – когато няма реакция при чуване на сигнал,( особено при пациенти с тинитус ),

лъжливо негативен - когато се дава отговор при липса на реален сигнал.

Маскирането на сигнала е основен момент при клиничното изследване на пациента. Необходимостта от заглушаване по костен и въздушен път възниква при наличие на разлика между праговете по въздушен път между изследваното и неизследваното ухо. Целта в аудиологичните изследвания е да се получат стабилни и взаимосвързани резултати, а работата на аудиметриста е да получи максимално обективни резултати, за достатъчно кратко време. Маскирането на изследванията е комплексен и понякога променящ се феномен. Решението кога да се заглушава зависи от разбирането на психоакустичните принципи, на които се гради праговото изследване на слуха. За да се извърши правилно маскирането е необходимо да се изпълнят следните условия:

- да се прецени взимането на решението за клиничното заглушаване;
- да се изяснят базисните процедури при заглушаването;
- да се имат предвид препоръчителните правила при клиничното заглушаване.

Според American National Standard Institute / ANSI / в раздела за спецификациите за аудиометриите, маскирането е определено, като процес при който прагът на чуваемост за едно ухо е повишен поради наличието на друг ( маскиращ ) звук в противоположното ухо. Съществуват възможности за ипси - и контралатерално заглушаване. Естествено ипсилатералното заглушаване представлява смесване на тестващия сигнал и маскиращия шум в едно и също ухо. Контралатералното маскиране представлява наличие на тестващия сигнал в изследваното ухо и на маскиращия шум в другото ухо. В клинични условия контралатералното заглушаване се използва за да се повиши прага на неизследваното ухо, и по този начин да не реагира на сигнала използван при реалното изследване на другото ухо. Този феномен се използва за да се елиминира неизследваното ухо. Обикновено маскирането се използва по време на аудиометричните изследвания на прага на слуха по костен и въздушен път, когато прагът на двете уши не е

симетричен, т. е. при едностранно намаление или асиметрично двустранно намаление на слуха.

При подаване на сигнал в по-лошо чуващото ухо с достатъчно високо ниво на интензитет, сигнала може да се чува в по-доброто ухо и без наличието на заглушаващ сигнал пациента ще отговаря на акустичния сигнал чрез по-добре чуващото си ухо. По този начин, при изследването по въздушен път се получава по-добър праг на чуване в болното ухо, отколкото реално съществуващия такъв. Той притежава три основни характеристики; централна честота, определена ширина в Hz, но с три dB по-ниска от пиковата честота, филтрираща промяна на интензитета нагоре или надолу в зависимост от ширината на лентата. Естествено при определяне на честотната характеристика на заглушаващия сигнал е необходимо да се вземе предвид и интензитетът на маскиращия тон, като тяхното взаимоотношение е линейно. В повечето случаи се използва бял шум, който се състои от произволна енергия за всички честоти, но с приблизително еднакъв интензитет. В съвременните аудиометри се използва както теснолентов, така и бял шум.

Препоръчителни правила за оптимално заглушаване:

1. Тонална прагова аудиометрия по въздушен път:

- когато прагът на изследваното и този на неизследваното ухо по въздушен път е с разлики по-големи от показаните стойности на фигура 4, се използва заглушаване;

Препоръчителни стойности за заглушаване по въздушен път							
	честота (Hz)						
	125	250	500	1000	2000	4000	8000
интензитетна разлика между двете уши	35	40	40	40	45	50	50

Фигура 4. Препоръчителни стойности за заглушаване по въздушен път.

- . когато прагът по въздушен път на изследваното ухо и прагът по костен път на неизследваното ухо е с по-големи стойности от 15 dB се използва заглушаване;

## 2. Тонална прагова аудиометрия по костен път:

- Когато прагът на слуха по въздушен път на изследваното ухо и прагът по костен път на същото ухо са с разлика по-голяма от 10 dB, се използва заглушаване по костен път.
- Определяне на прага на слуха по костен път: Този метод на изследване е особено полезен при диагностичните процедури свързани с изследването на слуха. Чрез него се определя топиката на настъпилото увреждане – звукоприемно или звукопроводно намаление на слуха. Bekesy /1932/ е един от първите изследователи на костната проводимост, както и на нейното отчитане и интерпретиране. Чрез своите опити той стига до извода, че вибрациите на базилярната мембрана са предизвикани от движение на течностите близо до стапеса и че слуховите клетки се възбуждат чрез двата метода / костен и въздушен път/ на дразнене. По този начин се добива необходимата информация за целостта на звукоприемната система, която е необходима в клиничната практика. Инертният отговор на костниците в средното ухо също се променя в зависимост от импеданса на средното ухо. Промяната на костната проводимост се влияе и от състоянието на овалното и кръглото прозорче и състоянието на акведуктът.

Клиничното използване и определяне на прага на слуха по костен път е свързано с определяне на състоянието на външното или средното ухо, степента и видът на намалението на слуха.

При определяне на прага на костната и въздушна проводимост на слуховия анализатор, се установяват два основни момента:

1. прагът по костен път определя целостта на звукоприемната част на слуховия анализатор;
2. прагът по въздушен път определя функцията на целия слухов анализатор ( звукоприемна и звукопроводна компонента ).

Тоналната прагова аудиометрия при деца над три годишна възраст определя прага на слуха и оттам степента на слуховото намаление. Когато е невъзможно точното определяне на прага на слуха поради възрастта на детето се изработва условен рефлекс, чрез който в по-късен етап се преценява резултата по време на настройката на импланта, както и изследването на слуха в свободно звуково поле на имплантираното дете.

### 1.5.7 Детска игрова аудиометрия

Детската игрова аудиометрия е метод за изследване на слуха, при който играта се използва за определяне на слуховите прагове. Този метод може да бъде използван при деца от приблизително 24 месеца, но е по-информативен след три годишна възраст. Игровата аудиометрия включва уговаряне на детето да отговаря на звуци чрез действие-напр. поставяне на конструктор в кутия, подреждане на рингове или сглобяване на парчета пъзел. Приучаването на детето към действието, което трябва да изпълни обикновено се случва след четвъртата или петата демонстрация. Често подкрепата на детето като пляскане с ръце или похвалването и окуражаването на детето се използва, за да подпомогне приучаването. Използвайки тази техника честотно специфична и специфична за всяко ухо информация може да бъде получена както за въздушната така и за костната проводимост. За много малки деца или деца, които се затрудняват да изпълнят поставената задача, последователността на честотите трябва да бъде представена, за да се оптимизира получаването на информация необходима за прогнозирането на степента на слуховата загуба [227]. Освен това, не е необходимо цялостно изследване на едното ухо преди изследването на другото ухо [228]. Това означава, че може да е по-добре да бъде получена частично информация за честотите от двете уши, отколкото пълна информация за състоянието само на едното ухо.

### 1.5.8 Визуална аудиометрия (Visual Reinforcement Audiometry, VRA).

Терминът въвеждат Liden и Kankkuden 1969г [229]. VRA е предпочитана поведенческа техника над 5-6 месечна възраст. Тя позволява реакция на главата към звуци чрез използването на визуален стимулатор. Повечето визуални

стимулатори са анимации, които са зад затъмнен плексиглас и се визуализират само по време на периодите на активиране.

При провеждането на визуална аудиометрия детето е седнало или на високо столче или в скута на родителя, обърнато е напред, а на 45 или 90 градуса от детето е поставен високоговорител. Когато слуховите стимули се подават през високоговорителя, инстинктът на детето да търси източникът на звука се подсилва от активирането на анимацията. VRA използва реакцията на въртене на главата след като сигналът е чул, но не изисква локализацията на звука. Primus [230] доказва, че детето се представя по-добре когато има съгласуваност между източника на звука и локацията на стимула.

Използвайки визуална аудиометрия прага на слуха може да бъде получен чрез слушалки или чрез трансдюсер за костна проводимост [231,232,233].

С VRA е възможно да се получи информация за четири честоти, аудиография на звуковите полета, изследващият може да се осведоми за разпознаване на говорния праг, и за симетрия от провеждането на едно изследване. При повечето деца не може да бъде получена информация за четири честоти и за говорния праг само от едно изследване. Обикновено са необходими две посещения. За да бъде оптимално количеството на получена информация по време на изследването, редът на използваните стимули трябва да бъде приоритизиран, за да се осигури информация за степента и конфигурацията на слуховата загуба.

Визуалната аудиометрия не само дава възможност за оценка на слуховия праг, но и предоставя информация за целостта на слуховите пътища и способността на детето да реагира на слухова стимулация.

## 2. Цел и задачи

### 2.1 Цел

Цел на проучването е да се изследва функцията на слуховия анализатор при пациенти с фамилна анамнеза за намаление на слуха и при такива с отрицателен резултат при провеждане на универсален слухов скрининг; да се опише клиничната характеристика на наследствената слухова загуба, да се анализират причините, да се осигури стратегия за откриване на генетичните причини и да се насочи пациентът към най-ефективното лечение.



## 2.2 Задачи

1. Да се проследи нивото на чуване с обективни методи на изследване.
2. Да се определи степента и загуба на слуха.
3. Да се уточни генетичния профил при деца с установена несиндромална слухова загуба.
4. Да се проследи фамилният статус при деца с фамилна обремененост за невросензорна слухова загуба.
5. Да се препоръча най- подходящото лечение при деца с установена генетична слухова загуба.
6. Да се обобщят резултатите от кохлеарната имплантация при деца с установени генетични причини.
7. Да се сравнят резултатите от проведеното лечение като се използват резултати от слуховата рехабилитация.

## 3. Материали и методи

### 3.1 Материали

В изследването са включени 192 пациенти като 178 от тях са с невросензорна слухова загуба, а останалите 14 са пациенти с нормален слух - роднини на изследваните пациенти с намален слух, при които също се взе биологичен материал за търсене на генетични мутации, имащи отношение към слуха. Пациентите са преминали през амбулаторните кабинети или са били хоспитализирани в УНГ клиниката на УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“ в периода декември 2009 година до май 2018 година.

Събрани са пациенти, участвали в няколко от проведените проекти на Катедрата по УНГ болести към УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“ съвместно с Центъра по молекулярна медицина към Медицински Факултет на МУ-София, Катедра Медицинска Химия и Биохимия. Всички участници в изследването съответно родителите или настойниците на непълнолетните лица са попълнили информирано съгласие за участие в проучването.

При подбора на пациенти са спазени следните критерии:

- Изследвани са пациенти без ограничение във възрастта и независимо от техния пол и етническа принадлежност;
- Включени в изследването са пациенти с двустранна невросензорна загуба на слуха независимо от степента на слуховата загуба;
- Включени в изследването са и пациенти с нормален слух, които са с фамилна обремененост за НСЗС;
- Всички участващи в изследването пациенти са с нормален УНГ статус, съответно и с нормално съпротивление в средното ухо;
- Не са изследвани пациенти със синдромална невросензорна загуба на слуха;
- При изследваните пациенти са изключени слухови увреди в резултат на екзогенни фактори като черепно- мозъчна травма, звукова травма, излагане на силен шум.

### 3.1.1 Биологичен материал

На всеки от включените в изследването пациенти, след подписване на информирано съгласие, му беше взета еднократно венозна кръв в количество до 10мл. Епруветките се съхраняваха при T +4°C като най- късно до 48 час се транспортираха до Центъра по молекулна медицина към МУ- София. Така се обогати и разшири биобанката в центъра.

## 3.2 Методи

### 3.2.1 Клинични методи

При прегледа на пациента се снима подробна анамнеза за началото на слуховата увреда, при деца- за това как е протекла бременността, за перинатални усложнения, за лечение с ототоксични медикаменти, за възможни екзогенни фактори. Получи се информация за фамилната анамнеза и съответно при наличие на такава се опитахме да привлечем към изследването възможно най- много членове на семейството, а в последния проект и здрави членове на семействата, при които да се търси носителство на мутации.

Изследваните пациенти са без патологични отклонения от УНГ статуса.

## 3.2.2 Аудиологични методи

### 3.2.2.1 Тонална прагова аудиометрия, ТПА

С тонална прагова аудиометрия се измери минималния праг на слуха за чисти тонове по пътя на въздушна и костна проводимост за всяко ухо поотделно в честотния диапазон от 125 до 8000 Hz.

Изследването както на въздушната, така и на костната проводимост започна с анамнестично по- добре чуващото ухо.

Средната слухова загуба се изчисли като се взеха средно аритметичните стойности на минималният праг на слуха по въздушен път за 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz и 4000 Hz. Представенините резултати са на по- добре чуващото ухо.

Използвани са аудиометри Siemens SD25, SD50.

ТПА е използвана за изследване на всички възрастни пациенти, а също така и за деца над 6 годишна възраст.

### 3.2.2.2 Детска игрова аудиометрия

При малките деца за изследване на слуха бяха използвани реакциите на звук, които да индуцират слухово възприятие. Използва се основно при деца от 3 до 6 годишна възраст.

В основата на игровата аудиометрия е изработване на условнорефлекторна двигателна реакция на звук, която предизвиква слухово възприятие. Изработването на двигателна реакция (приучване към изследването) става под формата на игра за детето. При чуване на звук то трябва да извърши някакво действие, напр. преместване на играчка. Когато има голямо намаление на слуха или глухота първо се изработва двигателна реакция на тактилно вибрационно дразнене с костния вибратор (250 Hz 50 dB) и след това играта се прехвърля на дразнене по слухов път и се измерва остатъчния слух.

При деца над три годишна възраст, при които не беше възможно извършването на игрова аудиометрия се изследва импедансът на средното ухо, AP, TOAE и се проведе ССЕР.

### 3.2.2.3 Тимпанометрия и рефлексометрия

Акустичната импедансметрия се използва за изследване на слуховата функция посредством измерване на акустичния импеданс на ухото.

Акустичен импеданс – това е съпротивлението, което оказва средното ухо на преминаващите през него звукови трептения. При проводно намаление на слуха се повишава акустичното съпротивление. Такива пациенти не участват в проведеното изследване.

При тимпанометрията се касае за динамично проследяване на акустичния импеданс- на изменението му по време на промяна в налягането във външния слухов проход от – 200 до + 200 мм воден стълб.

Всички пациенти, участващи в проектите, са с нормална тимпанометрия.

При изследваните пациенти са използвани импедансметри НОМОН – Tympanometer 4000M и Interacoustics Impedance Audiometer AT 235h.

Акустичната рефлексометрия е измерване на промените на импеданса на средното ухо, които настъпват при контракция на *m. stapedius*, предизвикана от акустично дразнене. При нормален слух прагът за поява на контракция на стапедиалния мускул е около 80 dB.

С цел избягване на случайните промени на мускула при движение на изследвания се използва принципът на сумирането. Прилагат се няколко дразнения през 5 секунди. Получените осреднени резултати дават възможност да се проследи промяната на импеданса дори при малки интензитети на дразнителя.

Акустичната рефлексометрия може да помогне в поставянето на топична диагноза при увреждане на лицеви нерв.

АР се получи при пациентите с нормален слух, с тежко чуване и само при някои от пациентите с практическа глухота.

#### 3.2.2.4 ТЕОАЕ

Преходните евокирани отоакустични емисии (Transient evoked otoacoustic emissions, ТЕОАЕ) са комплексни акустични събития, които могат да бъдат записани при почти всички хора, които са с нормален слух.

На всички деца, участващи в проектите, които са дали отрицателен резултат при провеждане на неонаталния скрининг в родилните домове, в аудиологичен сектор се повториха изследванията с ТЕОАЕ.

За ТЕОАЕ най- често използваният стимул са кликовете. Клинично най-често се прилагат стимули от 80 до 85 dB SPL. Скоростта на стимулиране е до 60 стимула в секунда. ТЕОАЕ се записват приблизително до 20 милисекунди. Когато са налични ТЕОАЕ, те възникват при честоти от 500 до 4000 Hz.

ТЕОАЕ са показали, че могат да разграничат нормален от увреден слух при 20 до 30dB HL. Тъй като клик стимулите изискват няколко параметра, стандартизацията е относително лесна. Информацията се събира едновременно в широк честотен диапазон и може да бъде анализирана ретроспективно по честота. Информацията може да бъде групирана и осреднена в честотни ленти, както се изисква когато се сравнява информация.

ТЕОАЕ може да се наблюдават в реално време (20мс) и дори при клинични условия скрининг тест може да бъде проведен за по- малко от минута. Средното време, необходимо за провеждането на теста, дори и при новородени, е около две минути. Теста има много висока специфичност ( +95%) при новородени с чисти сухи уши.

Недостатъкът на ТЕОАЕ техниката е, че не успява да извлече отговори във високо честотната част, поради стробиращото време използвано да раздели стимулите от ОАЕ. Високочестотните ОАЕ имат най-късо латентно време и се губят. ТЕОАЕ специфично намаляват с възрастта, вероятно поради чувствителността на ТЕОАЕ към клинично незначителните промени в кохлеата. Този ефект може да бъде компенсиран до някаква степен чрез повишаване интензитета или скоростта на стимулите. Природата на клик стимулите предопределя че лимита на инструменталното обурудване бързо се достига.

### 3.2.2.5 ССЕП

Първите открития в областта на слуховите стволови евокирани потенциали, ССЕП, са свързани с Sohmer and Feinmesser ( 1967), Jewett and Williston ( 1971 ). ССЕП стават един от най-широко използваните методи за обективно изследване на слуховия анализатор.

Изследването със слуховите стволови евокирани потенциали остава най-точния, достоверен и напълно обективен метод за определяне на слуховите нарушения при децата, както и за степента на слуховите им увреди. Този метод е основен и до този етап от развитие на медицината единствения напълно обективен метод.

Обикновено, при изследванията се използва клик стимул, който е електрически стимул със продължителност 100 микросекунди подавани от слушалка. В повечето случаи основната енергия е около 3000 Hz, с периферен статус от 2000 до 4000 Hz.

В анатомичен аспект те се характеризират с проявата на пет или седем вълни, получаващи се в определена последователност и с определени латентни времена, една след друга. Като най – сигнификантни са първа, трета и пета вълна. Обикновено първа вълна изчезва при намаляване на стойността на интензитета, а пета вълна остава последна да персистира. Поради тази причина визуалното проследяването на пета вълна е от основно значение за нивото на слуховото увреждане.

При изследване слуха на малки деца трябва да се вземе предвид, че изследванията стават под медикаментозна анестезия. В нашата практика използваме обща венозна анестезия. Естествено тези условия трябва да се вземат предвид при проследяването на минималния праг на слуха.

Изследванията се провеждат за всяко ухо по отделно и се сравняват двете уши едно спрямо друго, както и спрямо клиничните норми. Трябва да се отбележи, че латентните времена в ранна детска възраст са с по- дълги латентни времена в сравнение с другите възрастови групи. / Несох and Galambos, 1974; Salmay et al., 1982 /.

За по-голяма достоверност на изследванията е необходимо да се усреднят голям набор от индивидуални предизвикани отговори / обикновено от 2000 до 4000/ за да се установят ССЕР при нисък интензитет. От друга страна децата под три годишна възраст се изследват под обща анестезия. Поради тази причина е необходимо за оптимално кратко време да се достигне до възможно най-голяма информация за състоянието на слуха, така че се приема скоростта на стимула да бъде около 30-40 пъти в секунда.

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

### 3.2.2.6 EARS (Evaluation of auditory responses to speech)

Провеждането на рехабилитация при кохлеоимплантираните пациентие е широко утвърдено и е от голяма полза за всички имплантирани деца. За да оцени тези ползи през 1995г е създаден методът за оценка- оценка на слуховите

отговори към речта (Evaluation of Auditory Responses to Speech, EARS®). Адаптиран е към 20 различни езика и е подходящ за деца от 3 до 18 годишна възраст. При проведено през 2012г проучване сред 765 кохлеоимплантирани деца преоперативно, при първа настройка, а след това на 1, 3, 6 и 12. месец от първата настройка, след което по веднъж годишно е установено сигнификантно подобряване на слуховите умения с течение на времето за всички тестове за възприемане на речта и въпросници, както и между интервалите на провеждане на тестовете: преоперативно до 6.месец, от 6.месец до 12.месец, от 1.до 2.година [234].

Основни цели на EARS са:

- Да оцени развитието на слуховата перцепция при деца с практическа глухота и глухота, които са кохлеоимплантирани;
- Да осигури помощ за настройка на импланта и рехабилитация на децата;
- Да осигури инструмент за дългосрочна оценка на деца с КИ.

Освен това EARS като международно възприет тест е компилиран да оцени и сравни уменията за възприемане и представяне на КИ деца по целия свят.

EARS теста не установява слуховите възможности на детето, а по- скоро оценява способността да разбира смисъла на звуците, думите и изреченията.

Слуховото и речевото развитие и ниво на владееене на езика, които се очакват при кохлеоимплантираните деца, са от водещо значение за създаване на подходяща терапевтична програма.

Проведените тестове на изследваните КИ пациенти оценяват възприятията само на слуха. Оценяват се следните слухови навици:

1. Детекция/реакция – способността да се регистрира наличието или отсъствието на звук;
2. Дискриминация/различаване – способността да се определи различието или сходството между два звукови сигнала (образа);
3. Идентификация/разпознаване – способността да се разпознае определен звуков сигнал от други предварително известни звукови сигнала;
4. Имитиране – способността да се повтарят или имитират произнесени звуци, в това число и речта;
5. Разбиране- способността да се разбира разговорна реч.

Кохлеоимплантираните деца, участващи в проучването, са сравнени по резултатите от провеждането на следните тестова:

- Развитие на слухово възприятие (Listening Progress Profile, LiP );
- Възприемане на сричковата структура на думата (Monosyllabic Trochee Polysyllabic Word Test, МТРЗ) - на тристрични думи ;
- Възприемане на прости въпроси (Glendonald Auditory Screening Procedure,GASP)
- Изследва способностите за имитиране (повтаряне) на непознати изречения с различна синтактична структура (Specific Language Sentences Test,SLS words).

Тестовете са проведени при първата настройка, на 1,3,6,12,18,24,36, 48, 60 месец след поставяне на КИ.

### 3.2.3 Образни методи на изследване

Нативна компютърна томография на глава се извърши при хоспитализираните пациенти, при които се проведе оперативно лечение- кохлеоимплантация, за да бъдат изключени аномалии на вътрешното ухо. Никой от участващите в изследването пациенти няма патологични аномалии в анатомията на вътрешното ухо/темпоралната кост.

### 3.2.4 Генетични методи на изследване

За осъществяването на генетичните методи от всички участници в изследването се взе венозна кръв, която в рамките на 48 часа от получаването се транспортира до Центъра по молекулна медицина към МУ- София. За нуждите на генетичните изследвания се изолира ДНК с помощта на полуавтоматичен апарат . CHENAGEN® magnetic separation station. Генетичното изследване се осъществи в Центъра по молекулна медицина към МУ – София.

#### **Преданалитична обработка на биологичния материал:**

*- Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв.*

Целта на изолирането 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 определяно чрез агарозна гел електрофореза, при използване на 0.8% агарозен гел и 1xTBE (трисборатен буфер). Визуализацията на фрагментите осъществявахме посредством етидиев бромид с концентрация 0.05µl/ml.

Концентрацията на изолираната ДНК беше определяна спектрофотометрично чрез апарат NANODROP.

#### **Аналитична обработка:**

*-Изследване за носителство на мутации в connexin 26:*

За намножаването на конексин 26 генът бяха използвани следните двойки праимери:

Cx 26 1F: TCTTTTCCAGAGCAAACCGCC

Cx 26 1R: TGAGCACGGGTTCCTCATC

Cx 26 2F: CCAGGCTGCAAGAACGTGTG

Cx 26 2R: GACACGAAGATCAGCTGCAG

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

#### **3.2.4.1 Полимеразна верижна реакция (Polimerase Chain Reaction – PCR)**

Полимеразната верижна реакция започва с първоначална продължителна денатурация, която цели разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК. Амплифицирането на желанния 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

PCR амплификацията се осъществи като се използва 1  $\mu$ l от предварително приготвените 50 ng/ $\mu$ l разредки и двайка праймери (Сх 26 1F и Сх 26 1R), които позволяват амплификацията на цялата кодираща последователност на Сх26 гена, състоящ се от един кодиращ екзон. Получените PCR продукти се използваха за матрици при секвенционната реакция.

#### 3.2.4.2 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. Идентифицирането им се извършва спрямо подходящ молекулен свидетел с известна концентрация. Използва се разтворен в агарозния гел етидиев бромид, който се интеркалира между базите на ДНК и позволява визуализирането на молекулата и на UV – светлина. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН, фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анода). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите се влияе силно от състава и йонната сила на използвания буфер. При ниска концентрация на йоните електричното напрежение е минамално и ДНК фрагментите се придвижват по-бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва трис боратен буфер (TBE).

#### 3.2.4.3 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. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на

рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да синтезира ДНК. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатурираща полиакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията.

Етапи на директното секвениране:

- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR. PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните маркери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да са чисти, без неспецифични допълнителни продукти.
- Пречистване на продукта с ExoSAP. Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP с цел 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, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP) в буфер.
- Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез директното му добавяне към PCR продукта в съотношение 1,5 µl/2 µl PCR продукт: 0,75 µl ExoSAP.
- 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. Към 3'-края на всеки един от четирите дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е свързано различно багрило. 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.

Секвенционната реакция се провежда при следните температурни условия:

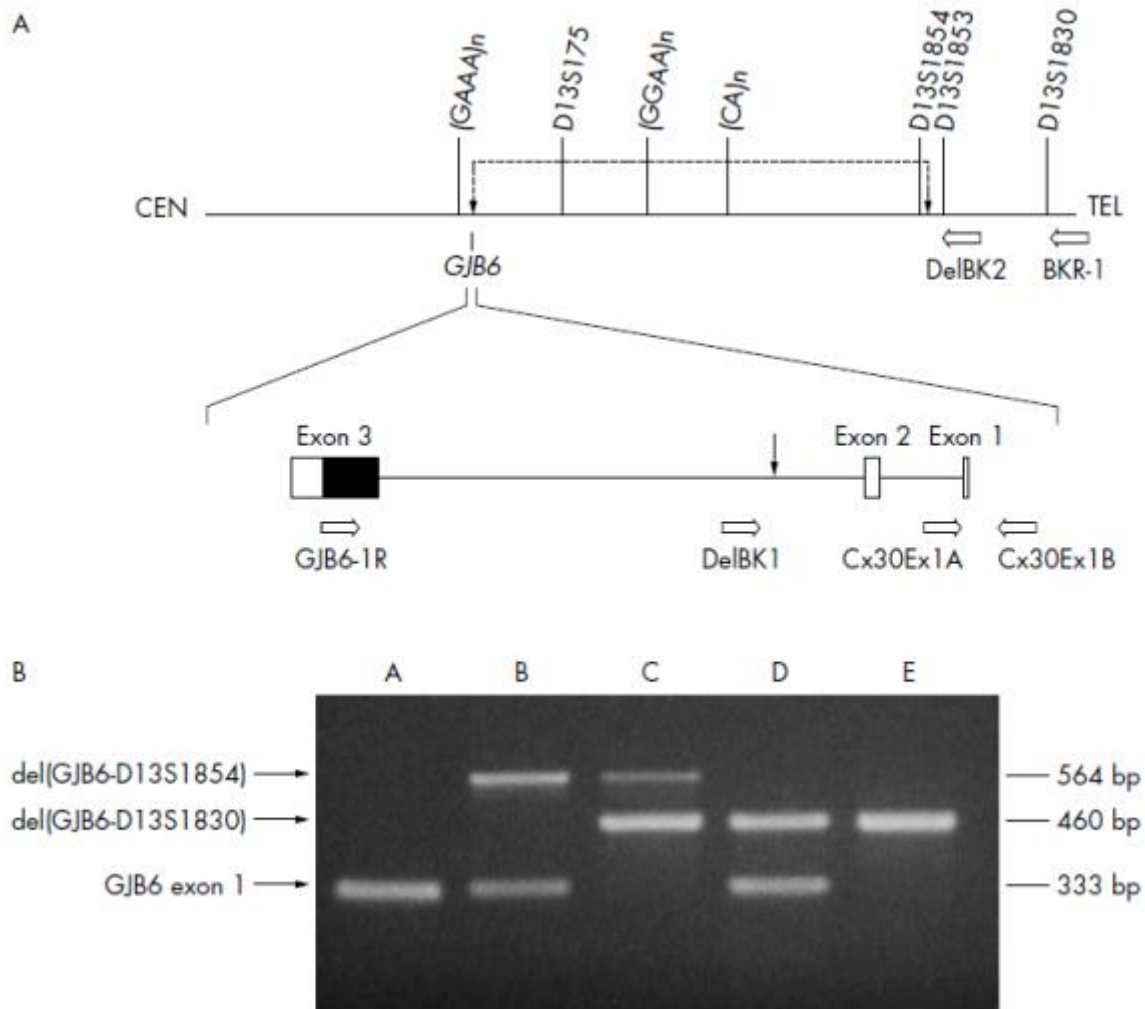
95°C – 3 мин.  
95°C – 20 сек.  
55°C – 20 сек. } 25 цикъла  
72°C – 3 мин.  
72°C – 3 мин.

- Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависимост от броя проби, преутаяването може да се направи в епруветки или на плака. 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. Време за преципитация повече от 15 минути може да доведе до загуба на по – късите фрагменти. След това се прави допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол. Така приготвените утайки се разтварят с 12 µl формаמיד.

При пациентите, при които не се попадна на носителство на мутация в *connexin 26* търсенето на причината за НСЗС продължи с изследване за носителство на мутации в *connexin 30*. Използва се следната генетична методика:

*-Изследване за носителство на мутации в connexin 30:*

За скринирането за носителство на мутации в *Cx30* (*del(GJB6-D13S1830)* и *del(GJB6-D13S1854)*) използвахме 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. [*del Castillo FJ et al., 2005*].



Фигура 4. Генетичен тест за детекция на *del(GJB6-D13S1830)* и *del(GJB6-D13S1854)* [del Castillo FJ et al., 2005].

A - Схематично представяне на локализацията на праймерите използвани в мултиплексния PCR. GJB6-1R, 5'-TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT-3', и BKR-1, 5'-CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT-3' (за амплификация на *del(GJB6-D13S1830)* breakpoint junction);

DelBK1, 5'-TCATAGTGAAGAАCTCGATGCTGTTT-3', и

DelBK2, 5'-CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT-3' (за амплификация на *del(GJB6-D13S1854)* breakpoint junction);

Cx30Ex1A, 5'-CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT-3', и

Cx30Ex1B, 5'-CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA-3' (за амплификация на *GJB6* exon 1)

В - Разделяне на PCR продуктите на 1.5 % агарозна електрофореза. Позицията на PCR продуктите съответстващи на точките на късане и свързване на делециите и амплифицирания контролен регион на екзон 1 на GJB6 са показани със стрелки от лявата страна, а техните размери в базови двойки (bp) са показани отдясно.

*-Изследване за носителство на мутации в Сх31:*

За размножаването на конексин 31 генът бяха използвани следните двойки праимери:

Сх31-1F- TACGATGGTTTTTCCTCTAATTCT

Сх31- 1R- GAAGCCATGCCAGAGAGTGT

Сх31-2F- AGTTCCTCTTCCTCTACCTGCT

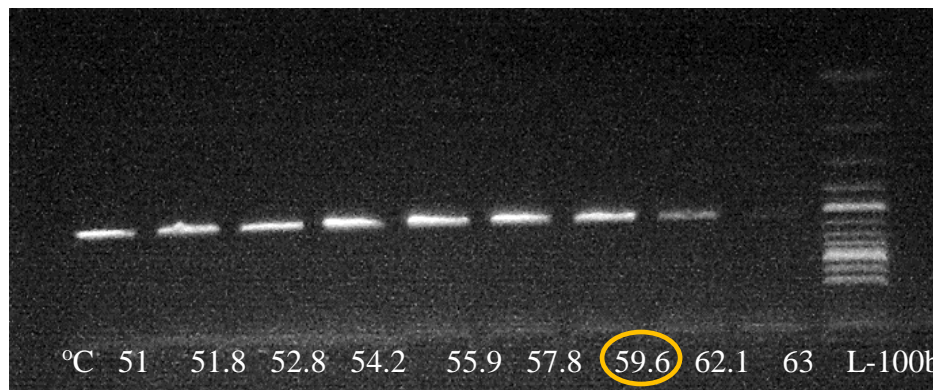
Сх31-2R- АСТТАGТGAACTCAGAGTGGGG

Изследването за носителство на мутации в Сх31 бе осъществено чрез използване на същите методи, както при изследването на носителство на мутации в Сх26.

***Генетичен анализ за носителство на полиморфизми и мутации в Сх31:***

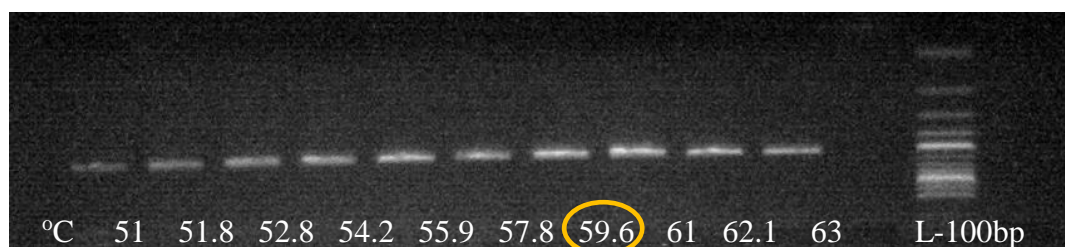
Дизайнът на праимерите бе направен с помощта на онлайн програмата Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Условията за протичането на PCR реакциите бяха оптимизирани по температура след протичане на градиентен PCR.



Фигура 6 . Резултати от градиентен PCR, използващ двойката праимери : Сх31-1F и Сх31\_1R. Под всеки старт е написана температура на анилинг. Заградената температура е избраната. L- 100bp молекулен маркер. Дължината на PCR продукта е

522 bp



Фигура 7. Резултати от градиентен PCR, използващ двойката праймери : Сх31-2F и Сх31 2R. Под всеки старт е написана температура на анилинг. Заградената температура е избраната. L- 100bp молекулен маркер. Дължината на PCR продукта е 501 bp

Оптималните температури за анилинг и за двете двойки праймери са много сходни и по тази причина избрахме еднаква температура, за да могат и двете PCR реакции да протичат при еднакви условия.

През 2017 година търсенето на генетичните причини за НСЗС се разшири. Катедрата по УНГ болести към УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“ отново съвместно с Центъра по молекулна медицина към МУ- София започна следващ проект - **„Секвениране от ново поколение на пациенти с наследствена невросензорна слухова загуба за изясняване на генетичната причина за слуховата увреда“**. В текущото проучване се подбраха петима пациента с фамилна история за НСЗС, предварително изследвани за носителство на мутации в Сх26 (GJB2), Сх30 (GJB6) и Сх31 (GJB3), при които не бе открита генетичната причина за възникналата слухова загуба. При тези пациенти проведохме

#### 3.2.4.4 Таргетно новогенерационно секвениране

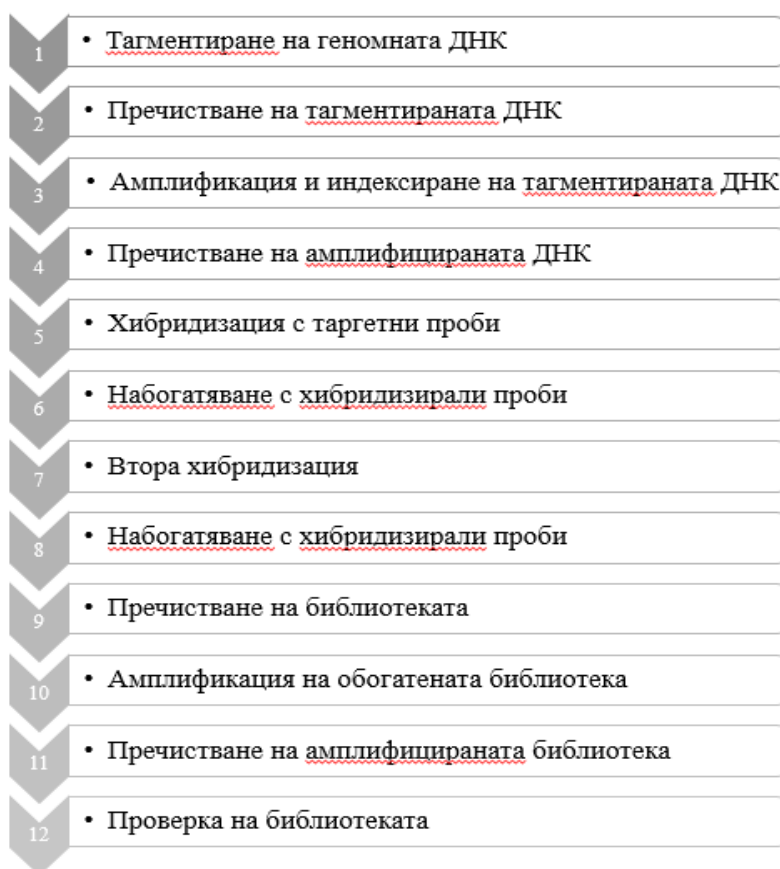
Генетичните тестове традиционно се провеждат чрез секвениране по Sanger за първи път използвано през 1977. Секвенирането по Sanger използва полимеразна верижна реакция, която да изолира отделни региони от генома (обикновено екзони) , които се подлагат на секвениране. Този метод има изключително висока чувствителност и специфичност и въвежда генетичното секвениране в клиничната практика. Цялостно тестване за генетични

хетерогенни заболявания, каквото е несиндромната загуба на слуха, е трудноприложимо, използвайки секвенирането по Sanger, поради финансовите и времеви ограничения.

Новогенерационното секвениране (NGS) е разработено като резултат от завършването на проекта „Човешки геном“, за да подобри производителността и да намали разходите, свързани с ДНК секвенирането. NGS се основава на насочено геномно обогатяване (targeted genomic enrichment, TGE). Чрез новогенерационното секвениране едновременно се изолират стотици или хиляди геномни области благодарение на този вид високопродуктивно секвениране.

Таргетно новогенерационно секвениране

За извършването на таргетното новогенерационно секвениране използвахме TruSight one кит за подготовка и за секвениране на платформа MiSeq, Illumina. Подготовката на библиотеките бе извършено съобразно инструкциите на фирмата производител. Стъпките в подготовката на библиотеките е представено на Фигура 8.



Фигура 8. Основни стъпки в подготовка на библиотеки



Преди започването на протокола за подготовка на библиотеки ДНК концентрациите на подбраните проби се нормализира. Концентрациите на ДНК пробите се определят флуориметрично с помощта на Qubit. Геномните ДНК проби се нормализират до 50 ng в Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 до краен обем от 10 µl. Тагментирането на ДНК се осъществява с помощта на транспозома, която едновременно фрагментира геномната ДНК и добавя адапторни последователности към краищата, позволявайки амплификация на фрагментираната ДНК чрез PCR в последващите стъпки.

Втората стъпка от протокола е пречистване на тагментираната ДНК от транспозомите тъй като те се свързват много здраво към краищата на ДНК и биха пречили в по-нататъшните стъпки. Пречистването се осъществява с помощта на магнитни частици.

Амплификацията на пречистената тагментирана ДНК се осъществява с помощта на PCR програма от 10 цикъла. При този PCR също така се прикачат индексна 1 (i7) и индексна 2 (i5) последователности, които са необходими при секвенирането, а така също се прикачат и адаптери (P5 и P7) необходими за генерирането на клъстери и секвениране. Пречистването на PCR продуктите и при тази стъпка се осъществява с магнитни частици. В края на тази стъпка концентрациите на пречистените и амплифицирани библиотеки се измерват на Qubit и библиотеките с различни индекси се пулват така че крайната концентрация на всяка една от тях да е 500 ng. При първата хибридизация се миксира ДНК библиотеката с таргетни региони. Продължителността на хибридизацията трябва да е поне 90 мин. и максимум 24 часа. При следващата стъпка се използват стрептавидинови частици, за които се закачат пробите хибридизирани към таргетните региони. Две стъпки на промиване с буфер при нагряване водят до премахване на неспецифичното свързване към частиците. Обогадената библиотека след това се елуира от частиците и се подготвя за протичането на втората хибридизация. Втората хибридизация трябва да е с продължителност минимум 14.5 часа и максимум 24 часа. Нейната цел е да осигури висока специфичност на секвенираните региони. Следват отново стъпки на набогатяване, елуиране, пречистване. Втората амплификация протича в 10 PCR цикъла и има за цел да амплифицира обогатената библиотека. След PCR реакцията се осъществява пречистване с магнитни частици. Следва определяне на концентрацията на библиотеката. Концентрацията на библиотеката се

осъществява с помощта на NEBNext Library Quant Kit for Illumina. За разреждането и денатурирането на библиотеките използвахме опъването на фирмата производител. Следващите стъпки на генериране на клъстери и секвениране се осъществяват на апарат MiSeq.

### 3.2.5 Биоинформатични методи

Получените данни бяха обработени с помощта на програмния пакет VarSeq® (Golden Helix, Inc., Vozeman, MT, [www.goldenhelix.com](http://www.goldenhelix.com)) като анализът включваше:

- Напасване (alignment) и картиране (mapping) на прочитите към референтния човешки геном версия hg19.
- Премахване на дублицираните прочити, повторно напасване около инсерции/делеции (indel realignment) и рекалибриране качеството на базите (base quality score recalibration, BQSR)
- Идентифициране на варианти спрямо референтния геном
- Анотиране спрямо публичните бази данни за популационна честота, позиция в съответния белтък и иРНК, предикциите за патогенност, еволюционна консервативност и др.
- Приоритизиране на идентифицираните варианти чрез филтруване.

Функционалният ефект на кандидат-мутациите бе оценен *in silico* чрез използването на различни предикционни програми изчисляващи възможен фенотипен ефект на варианта. За предсказване ефекта на погрешносмислени мутации бяха използвани SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), Meta-SNP (<http://snps.biofold.org/meta-snp/>), MutationAssessor ([mutationassessor.org](http://mutationassessor.org)), Provean ([provean.jcvi.org](http://provean.jcvi.org)), LRT (Chun and Fay, 2009), VEST 3 (Carter H. et al, 2013), Meta SVM за варианти потенциално водещи до промени в сплайсинга - Automated Splice Site And Exon Definition Analyses (<http://splice.uwo.ca/>), NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), Human splicing finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>).

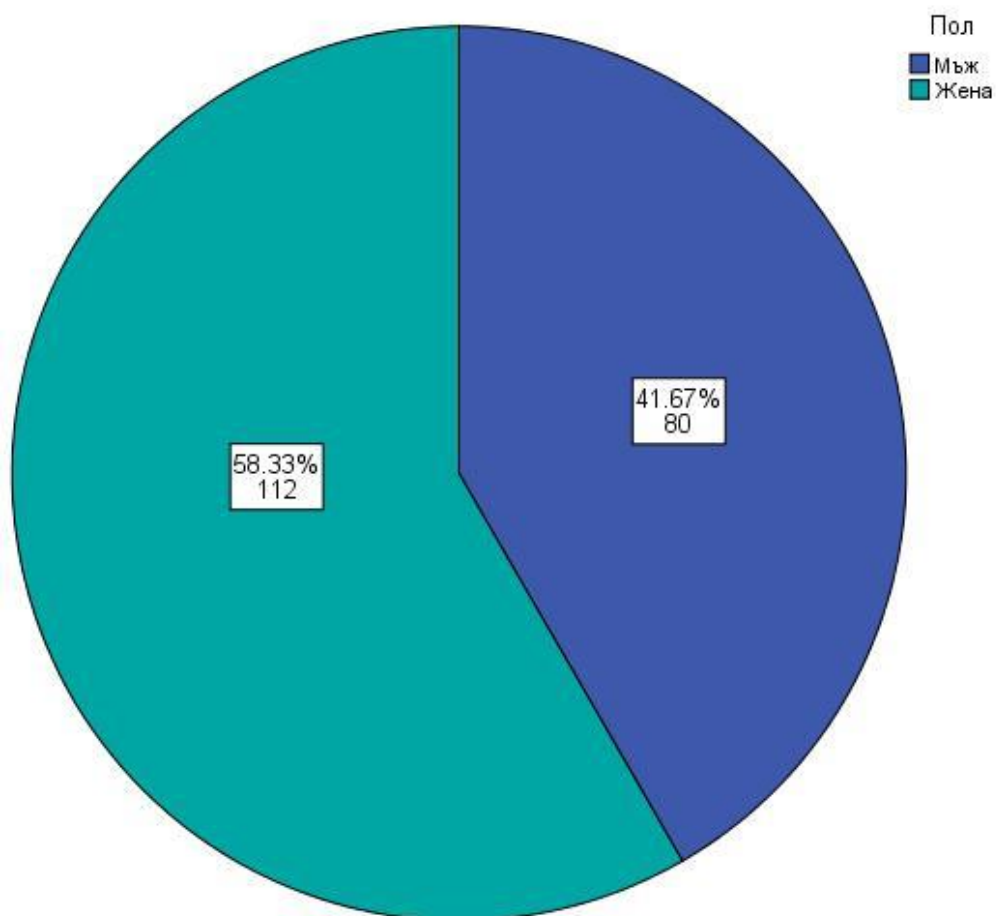
### 3.2.6 Статистически методи

Статистическият анализ се извърши беше използван статистически пакет SPSS 21.0.

## 4. Резултати

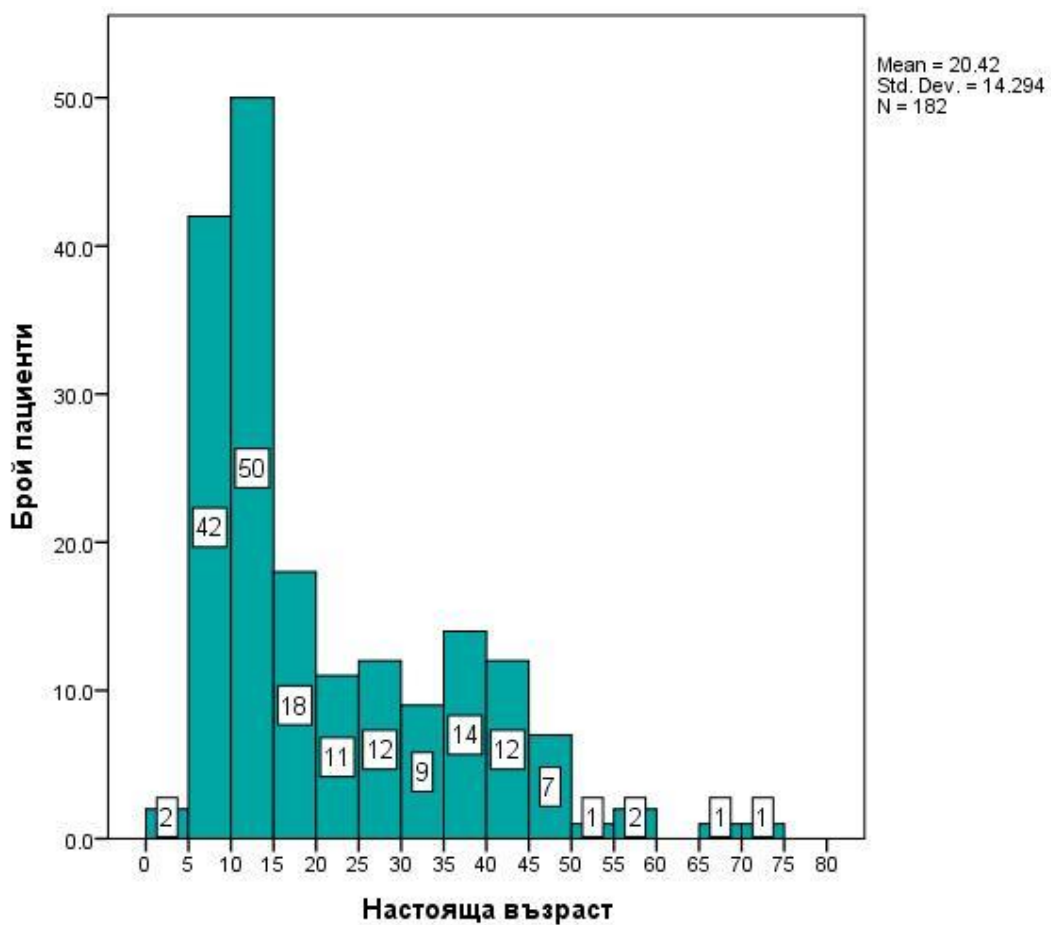
### 1. Демографски анализ

Изследвани са 192 пациента като 178 от тях са с невросензорна загуба на слуха, а 14 са със социално адекватен слух, но с фамилна обремененост за глухота. При 7 от пациентите без слухово увреждане се установиха генетични мутации- при 6 от тях в Sx 26 гена като мутацията е в хетерозиготно състояние (35delG/WT), а при един от тях в KCNQ4 гена. В проучванията участие са взели 80 пациенти от мъжки пол и 112 пациенти от женски пол.



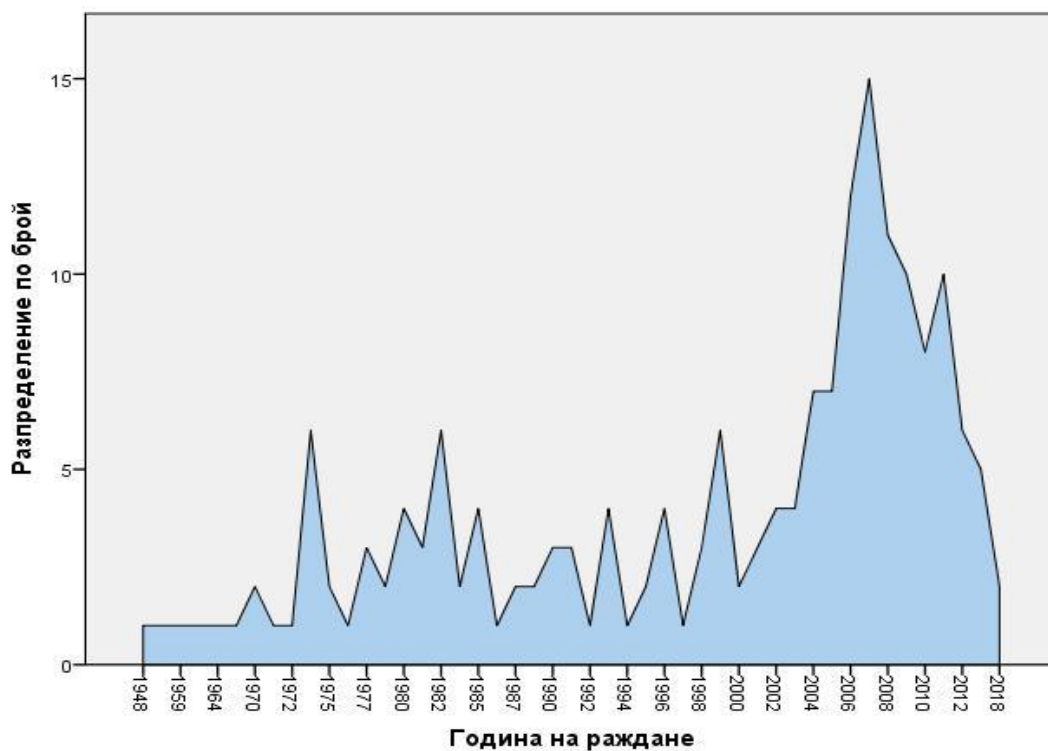
Фигура 9. Разпределение на пациентите по пол.

Средната възраст на участвалите в проучването е 20,4 години като най- младият пациент е на два месеца, а най- възрастният на 70 години. С най- голям относителен дял са пациентите от 6 до 10 годишна възраст (като е взета предвид възрастта на пациента към момента на изготвяне на статистическите резултати). Включването на пациенти в изследването е започнало през 2009 година.



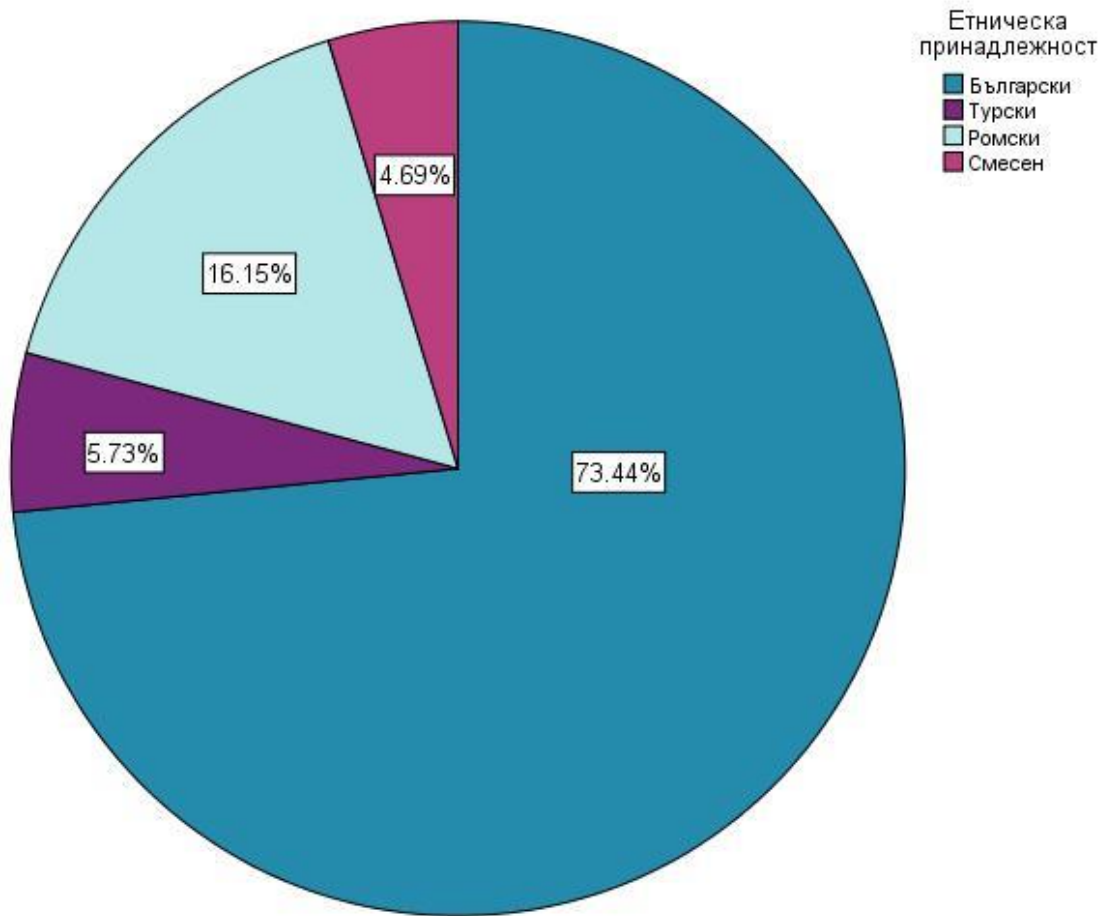
Фигура 10. Разпределение на пациентите по възраст.

От пациентите, взели участие в проучването, най- голям процент са родени през 2008 година.



Фигура 11. Разпределение на пациентите, в зависимост от годината на раждане.

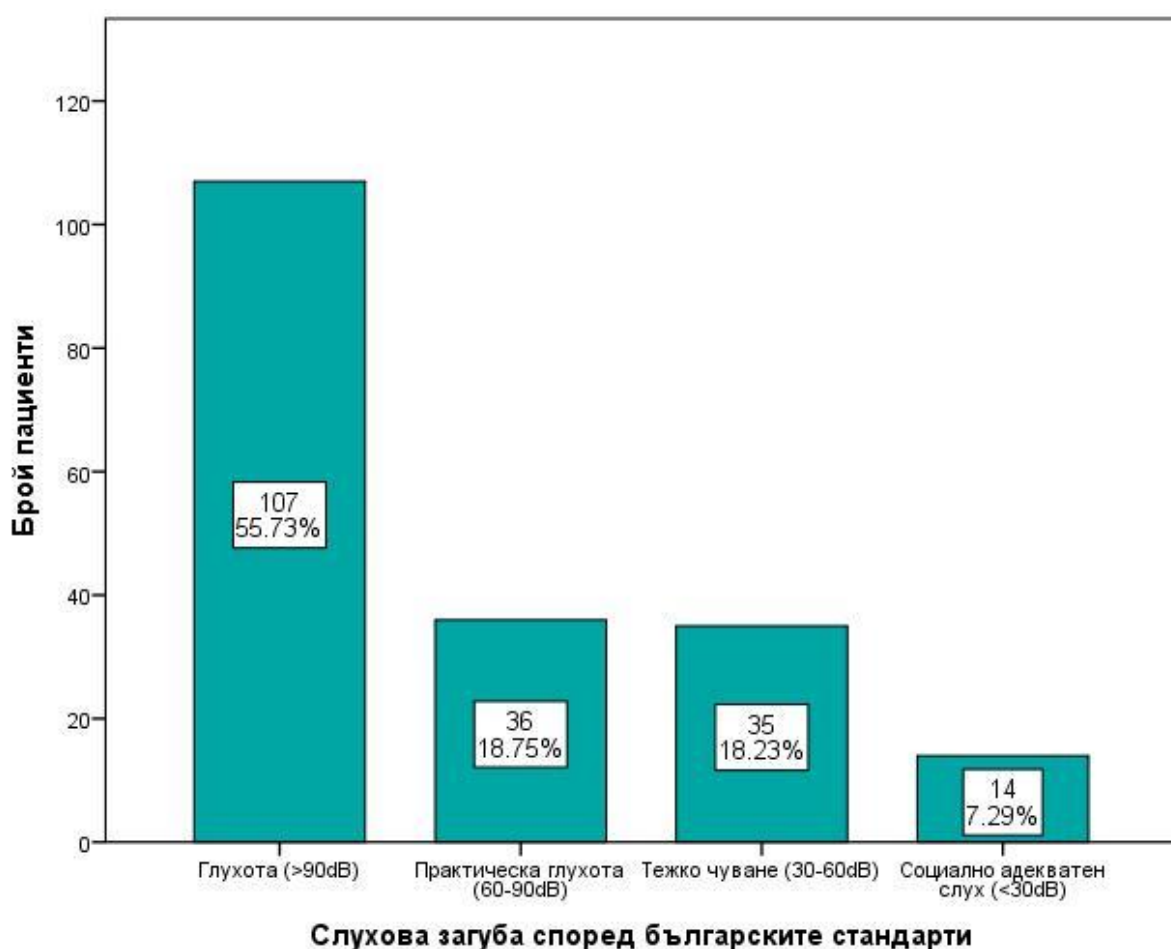
От изследваните пациенти 73.44% (n = 141) се самоопределят като българи, 16.15% (n = 31) като роми, 5.73% (n = 11) като турци , 4.69% (n = 9) са от смесени бракове.



Фигура 12. Разпределение по етническа принадлежност

## 2. Дескриптивен анализ

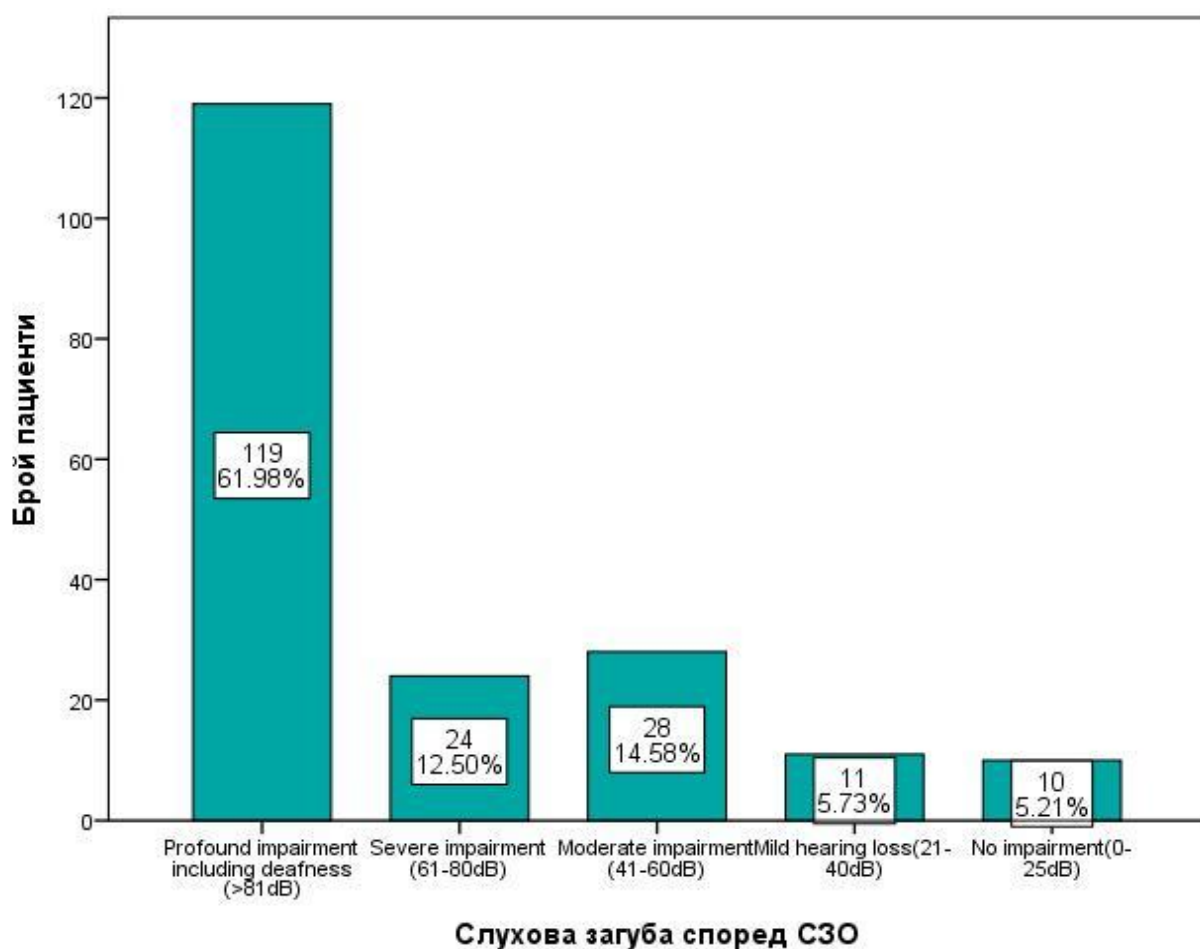
55,73% (n= 107) от изследваните пациенти според българските стандарти са с глухота, 18,75% (n= 36) от тях са с практическа глухота –средната слухоа загуба е между 60 и 90 dB, 18,3% (n= 35) са с тежко чуване – средна слухоа загуба от 30 до 60 dB, а 7,9% (n= 14) от пациентите са със социално адекватен слух.



Фигура 13. Разпределение на слуховата загуба според българските стандарти

Светоната здравна организация, СЗО, определя загубата на слуха над 81 dB като пълна слухова загуба (profound impairment including deafness), от 61 до 80 dB – тежка слухова загуба (severe impairment), умерена слухова загуба от 41- 60 dB, лека слухова загуба- от 21 до 40 dB.

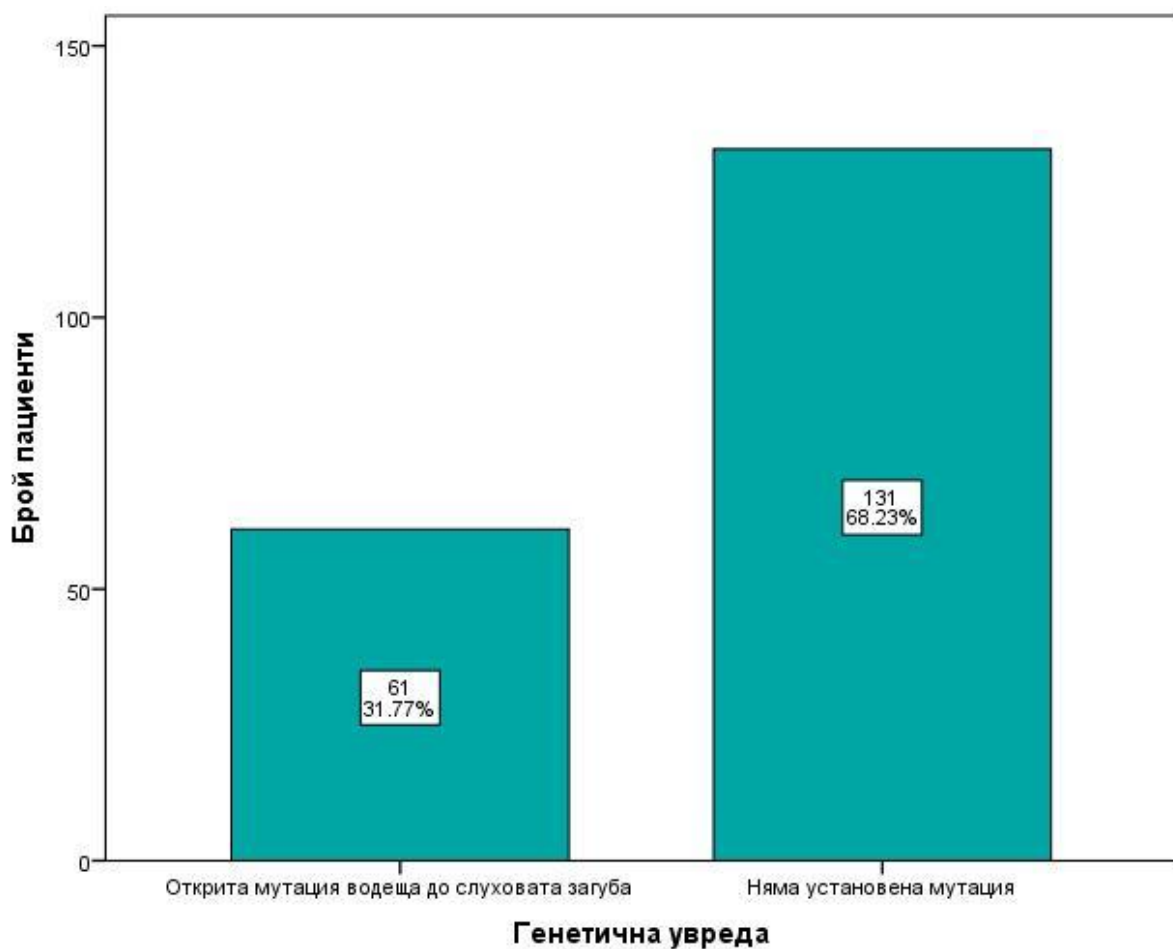
От изследваните пациенти 61,98% (n= 119) са с пълна слухова загуба, 12,5% (n= 24) – с тежка слухова загуба, 14,58% (n= 28) – с умерена слухова загуба, 5,73% (n= 11) – с лека слухова загуба, а 5,21% (n = 10) от пациентите са с нормален слух.



Фигура 14. Разпределение на слуховата загуба според СЗО

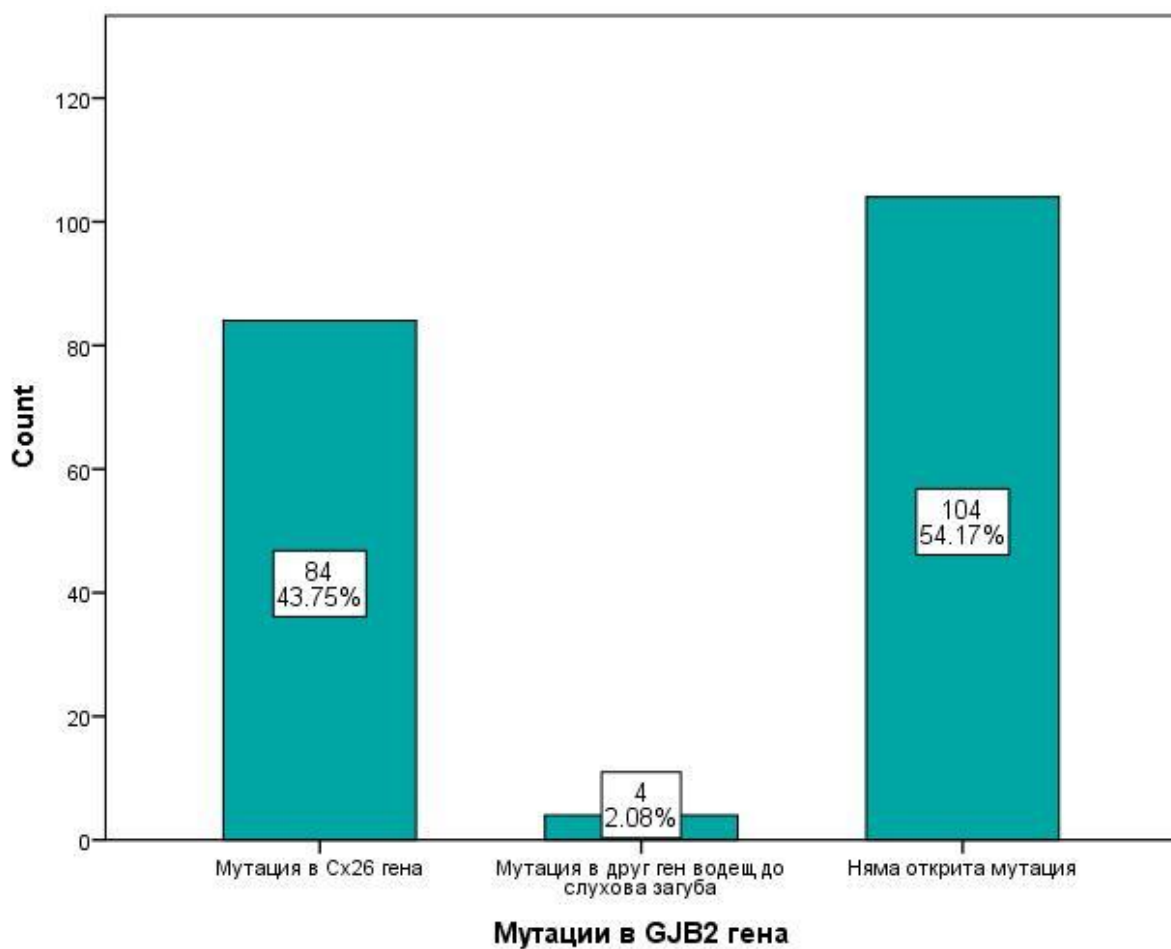


От изследваните 192 пациенти, в 31,77% (n = 61) от тях се установи мутация, водеща до намаление на слуха, а при 68,23% (n = 131) от случаите причината за слуховата загуба остана неясна.



Фигура 15. Установени генетични увреди в изследваните пациенти.

43,75% (n = 84) от случаите при проведените генетични изследвания се установи наличие на мутация в GJB2 гена, кодиращ конексин 26 протеина като в този процент са включени откритите хетерозиготни и хомозиготни мутации. В 2,08% (n= 4) от случаите се откриха мутации в гени, водещи до слухова загуба, различни от конексиновите. В 54,17% (n = 104) не се откриха мутации в гените свързани със слуха.



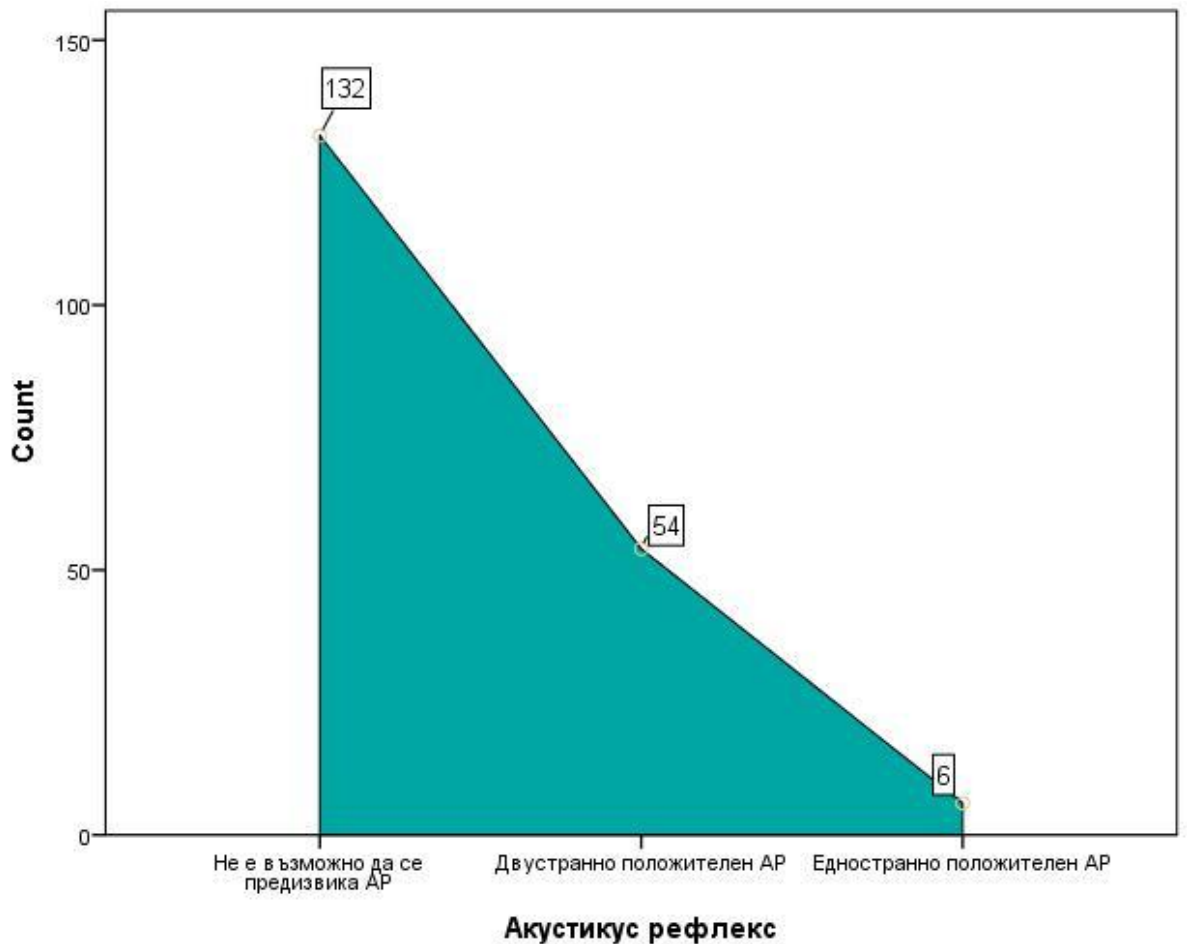
Фигура 16. Видове генетични увреди в изследваните пациенти.

При 29, 69% (n = 57) от изследваните пациенти се установи, че слуховата загуба е резултат от хомозиготна мутация в гена, кодиращ Sx26. При 14,06% (n = 27) от изследваните пациенти се откри мутация в гена кодиращ Sx26 в хетерозиготно състояние. При тези пациенти причината за слуховата загуба остава неизяснена. В 2,08% (n= 4) от случаите се откриха мутации в гени, различни от GJB2 гена, които са причина за слуховата загуба. В 54,17% (n = 104) от изследваните не се установи причината за слуховата загуба.



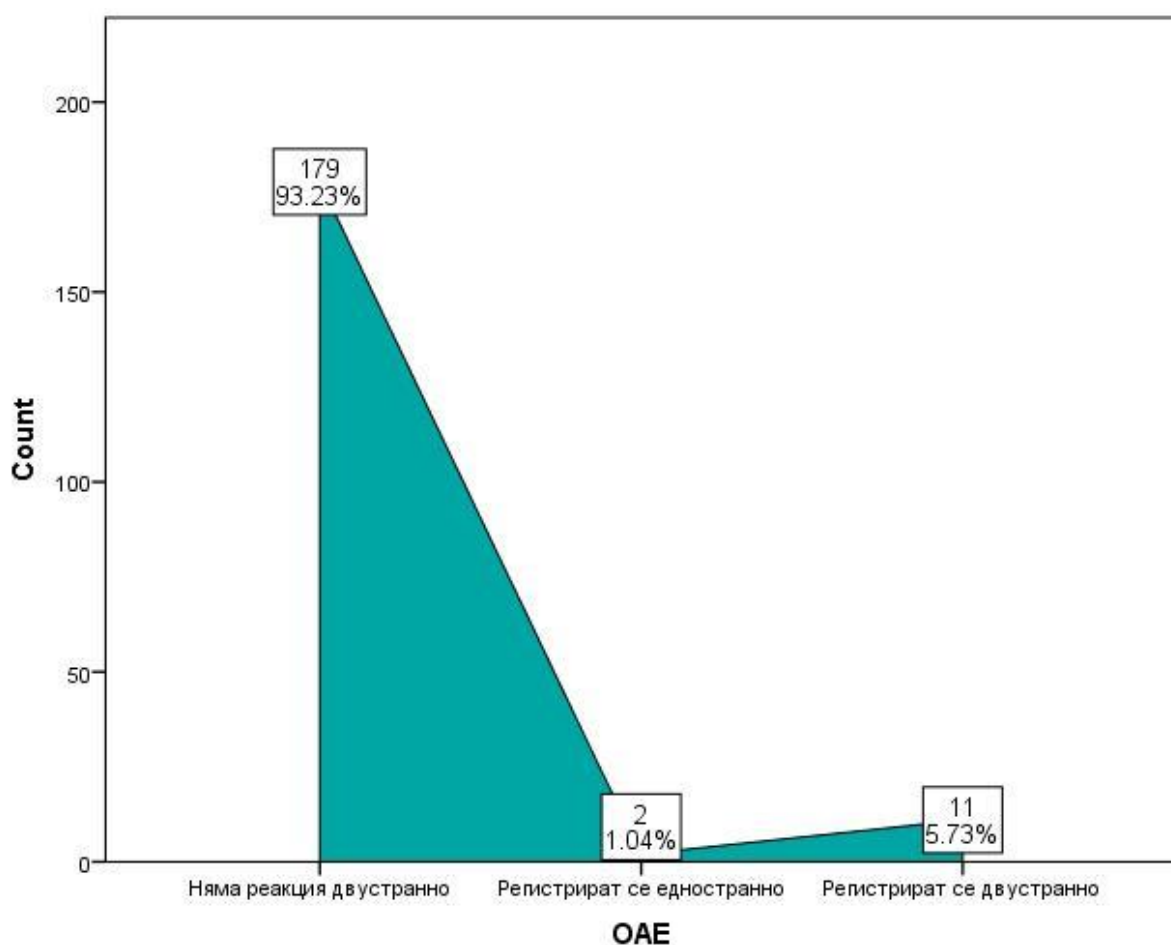
Фигура 17. Видове генетични увреди в изследваните пациенти.

В 68.75% (n = 132 ) от случаите при изследваните болни не се регистрира двустранно акустичен рефлекс. Това са пациентите с тежко чуване и глухота. При 28.13% (n = 54) от пациентите се регистрира акустичен рефлекс дустранно- това са пациентите с нормален слух, с лека и с умерена слухова загуба . При 3.13% (n = 6) от пациентите се регистрира акустичен рефлекс едностранно.



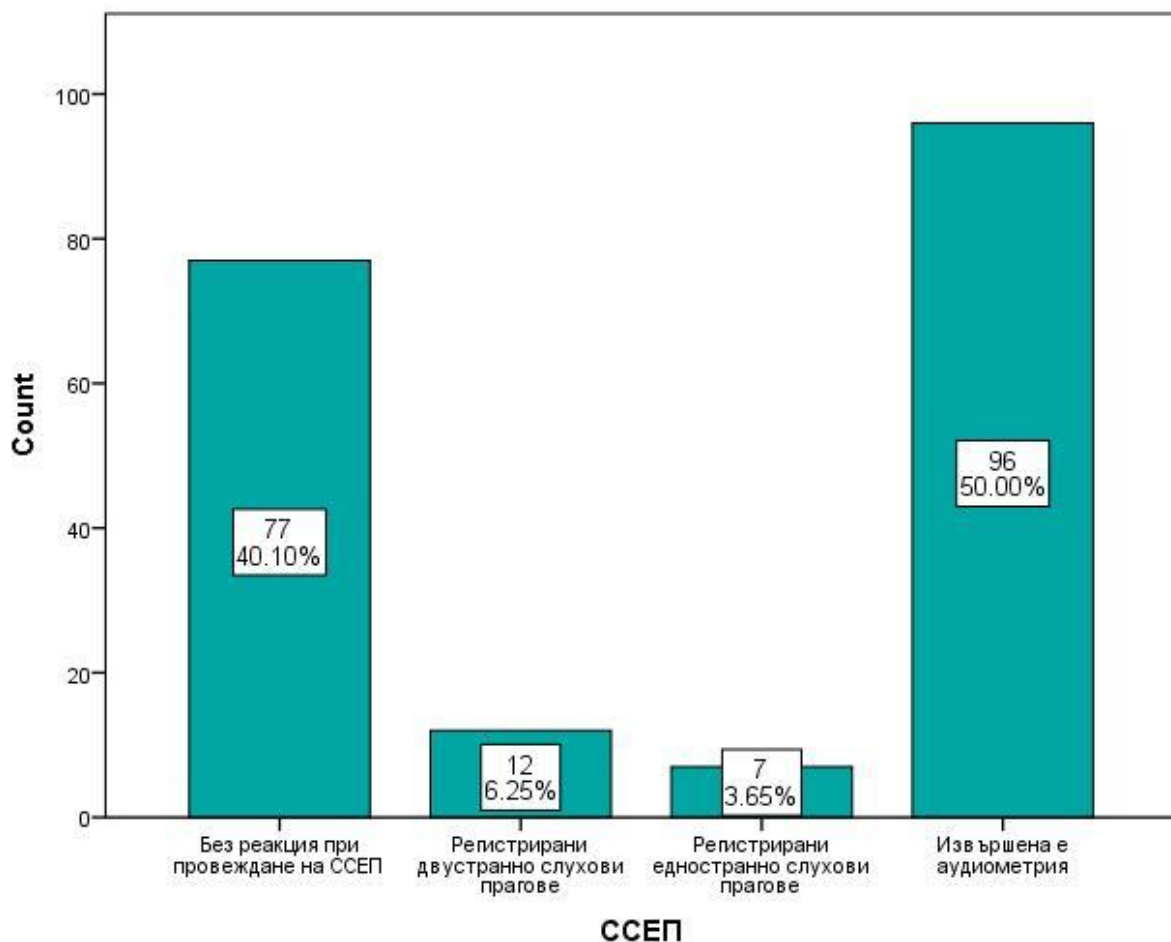
Фигура 18. Измерване на акустичен рефлекс.

В 93.23% (n = 179) от включените в проекта пациенти не се регистрираха отоакустични емисии. В случаите на слухова загуба по-голяма от 30 dB ОАЕ не се регистрират. При 5.73% (n = 11) от всички пациенти се регистрираха ОАЕ двустранно- това са пациенти със социално адекватен слух. В 1.04% (n = 2) от случаите се регистрираха ОАЕ едностранно.



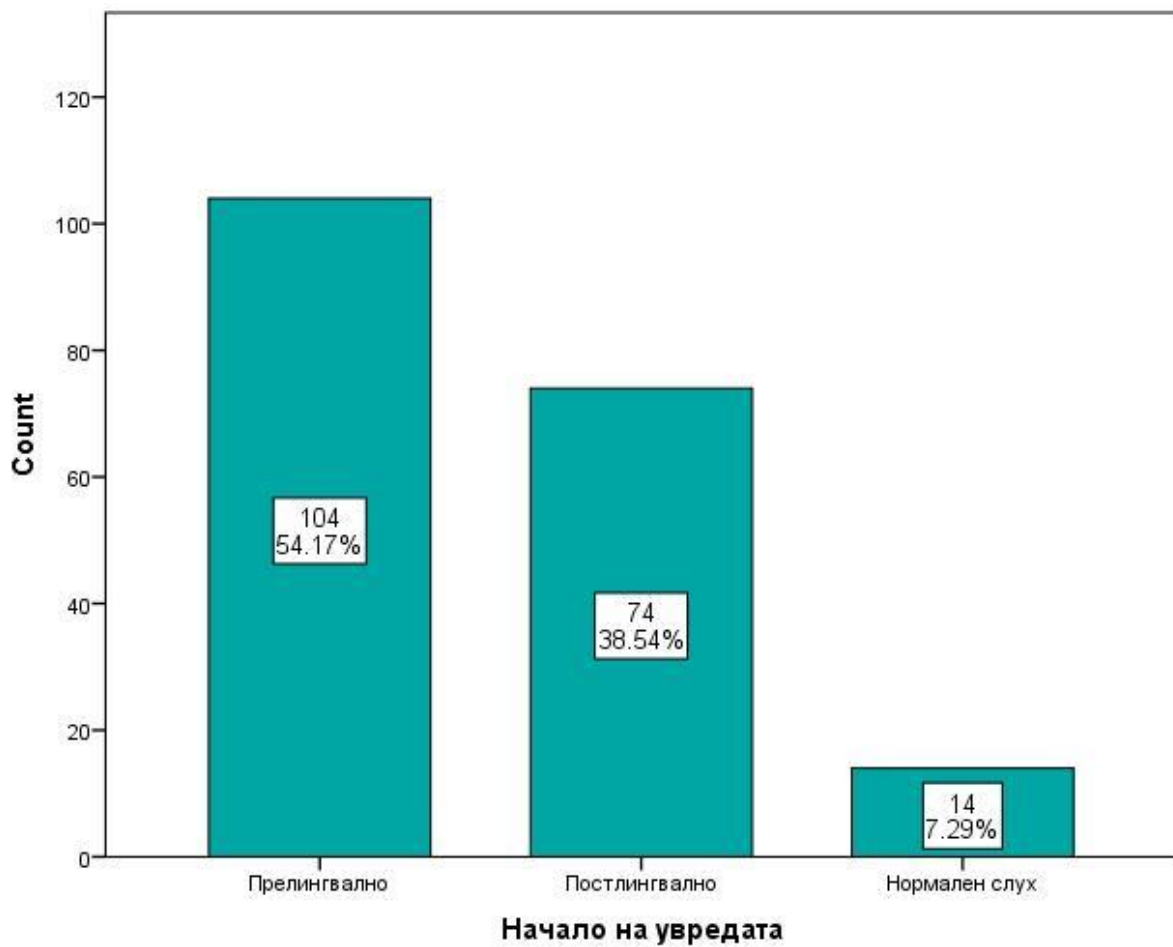
Фигура 19. Регистриране на отоакустични емисии, ОАЕ.

При 50% от изследваните пациенти намалението на слуха е регистрирано чрез ГПА ( n = 96). Това са възрастни пациенти и деца, при които е възможно извършването на аудиометрия. При останалите 50% от изследваните намалението на слуха е констатирано чрез измерване на ССЕП. При всички пациенти под 3 годишна възраст слухът се изследва чрез измерване на ССЕП ( n = 96). При 40.10% ( n = 77) от изследваните деца ССЕП не са били регистрирани. При 6.25% ( n = 12) от изследваните са се регистрирали ССЕП, а в 3.65% от случаите ССЕП са регистрирани едностранно.



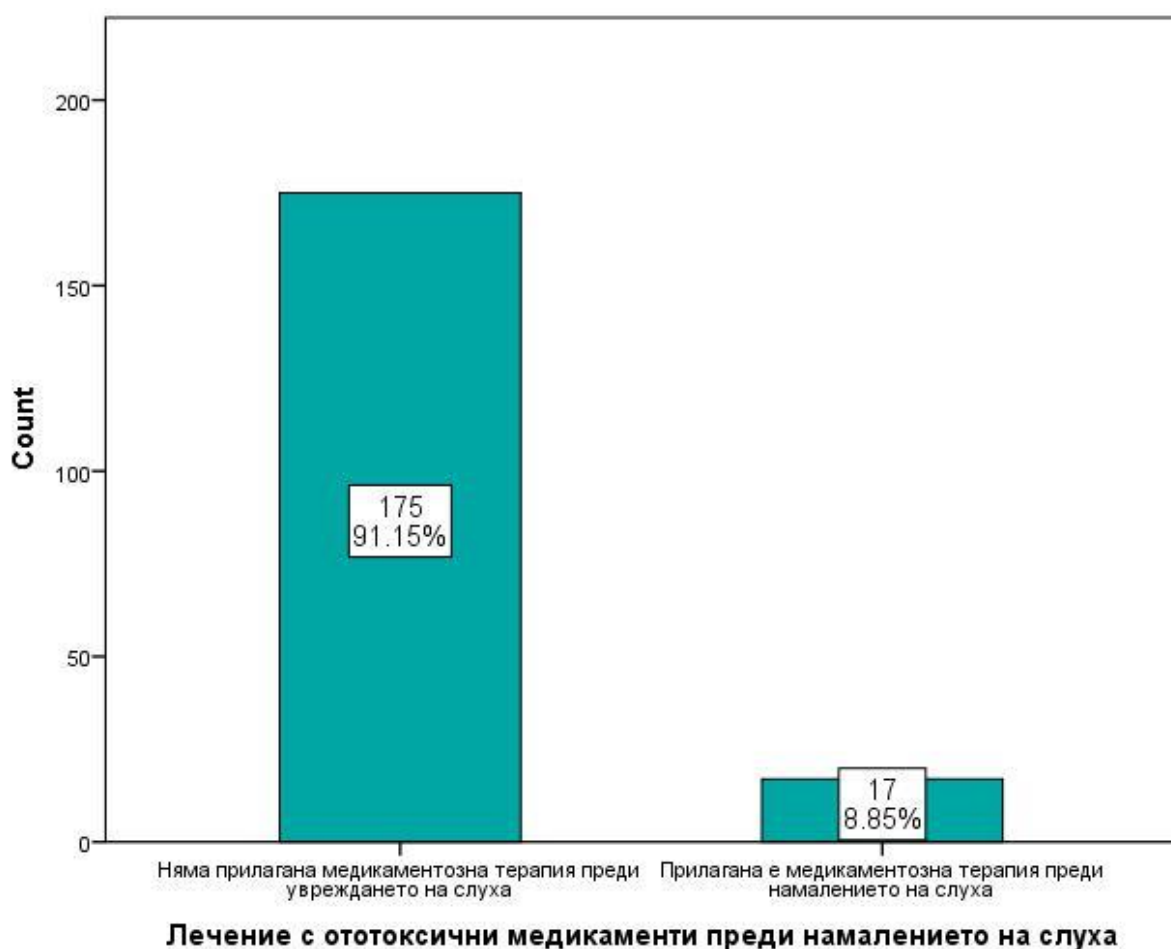
Фигура 20. Регистриране на ССЕП.

По анамнестични данни в 54.17 % (n = 104) от случаите намалението на слуха е настъпило прелингвално – преди проговарянето, а в 38.54% (n = 74) от случаите- постлингвално- след проговарянето на изследваните пациенти. 7,29% (n = 14) от случаите са със социално адекватен слух.



Фигура 21. Начало на слухова увреда.

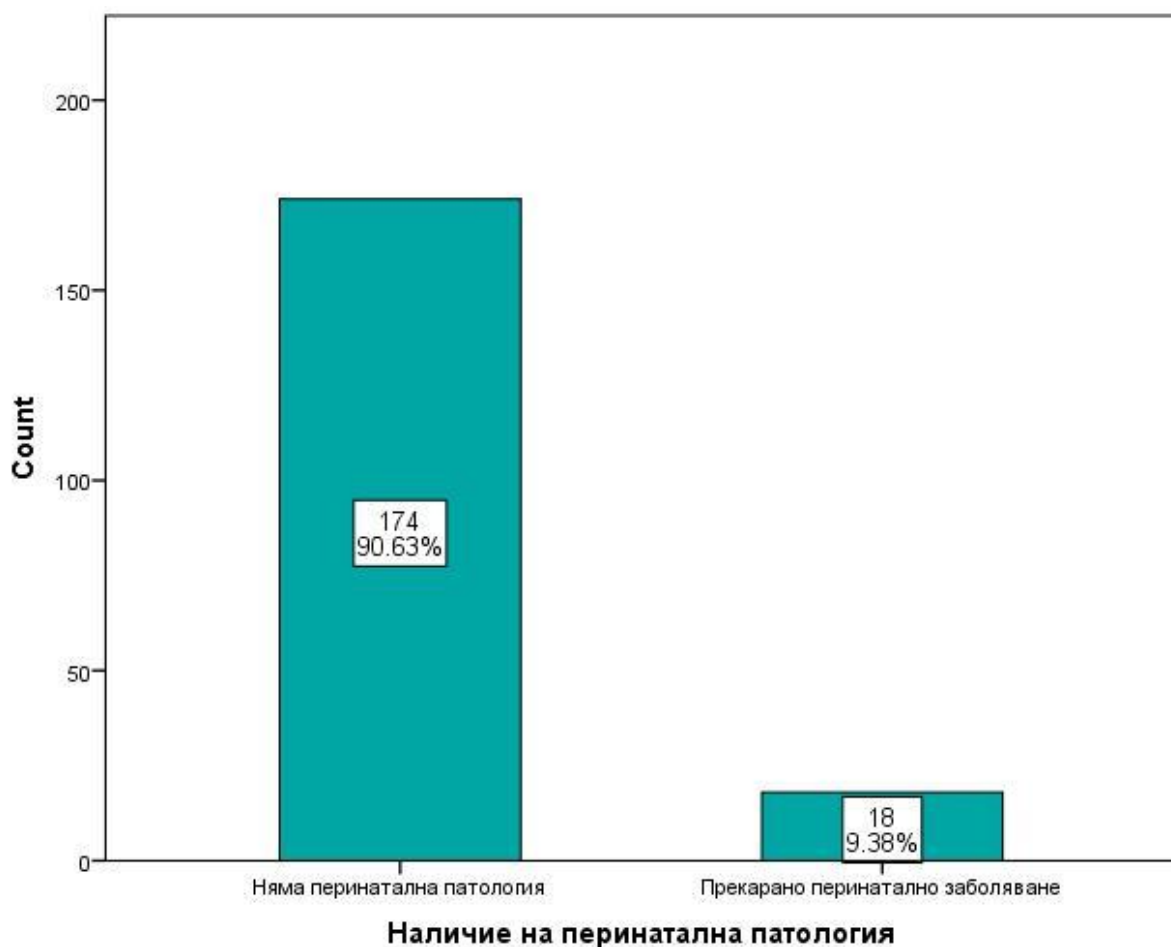
8,85% ( n = 17) от изследваните пациенти съобщават, че са провеждали лечение с ототоксични медикаменти в детска възраст. При останалите 91.15% ( n = 175) от пациентите няма данни да е провеждана терапия с медикаменти, увреждащи слуха.



Фигура 22. Пациенти, лекувани с ототоксични медикаменти.

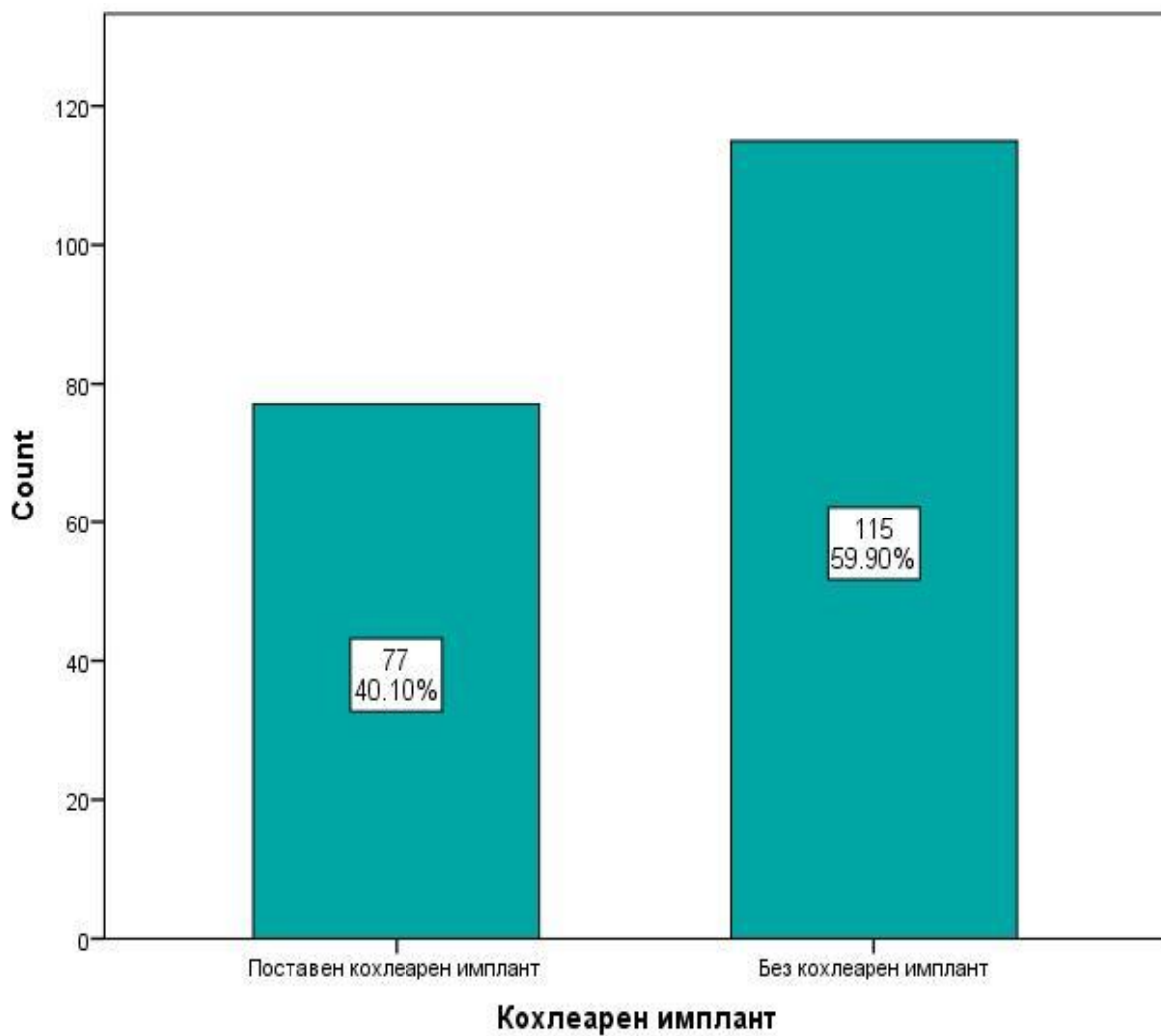


В 9.38% (n = 18) от случаите родителите са съобшили за наличие на перинатална патология напр. инфекциозно заболяване, за което е приложено антибиотично лечение, пневмония, кръвопреливане на несъвместима кръв, хепатит Б инфекция, неонатален сепсис, анемия, епилепсия от неонаталния период лекувана с антиконвулсанти.



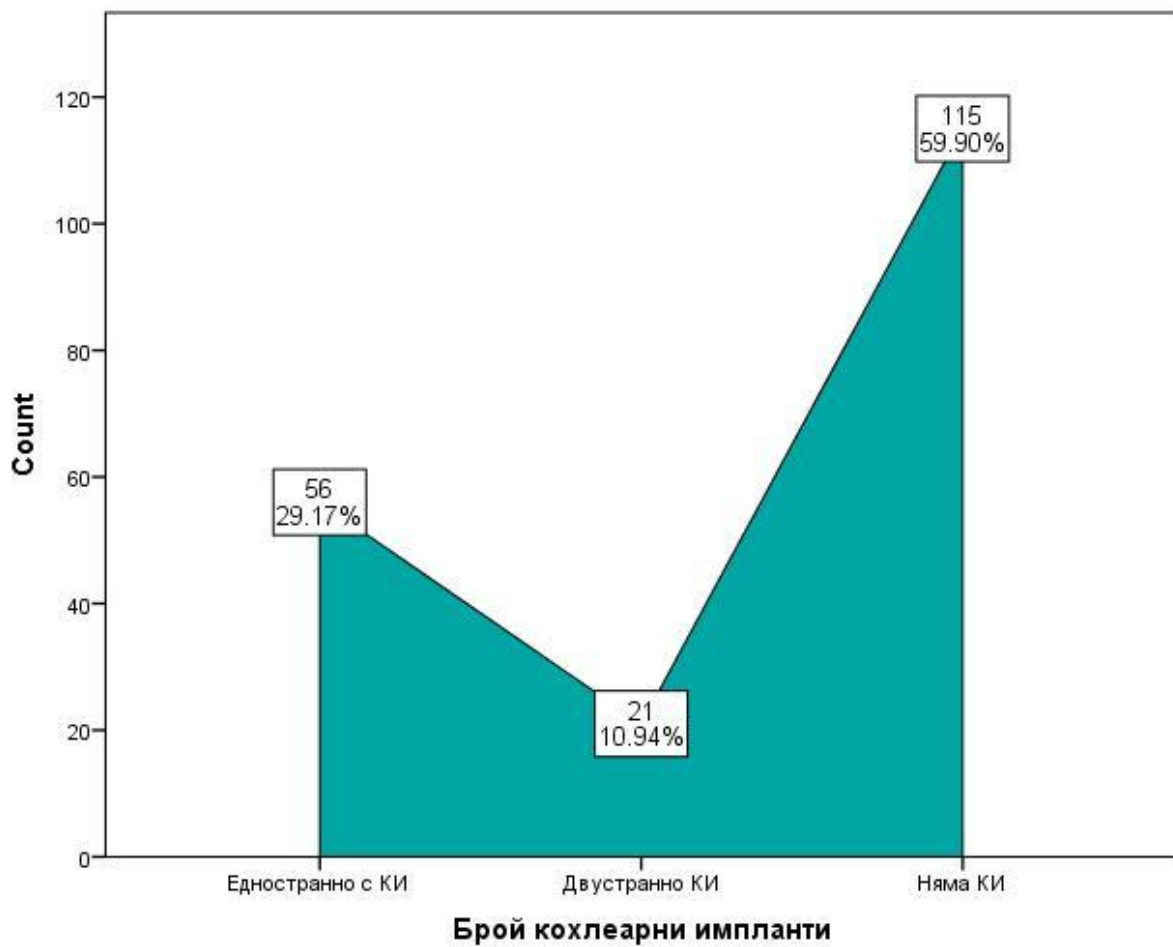
Фигура 23. Перинатална патология.

40.10% (n = 77) от изследваните пациенти са подложени на оперативно лечение - кохлеоимплантация.



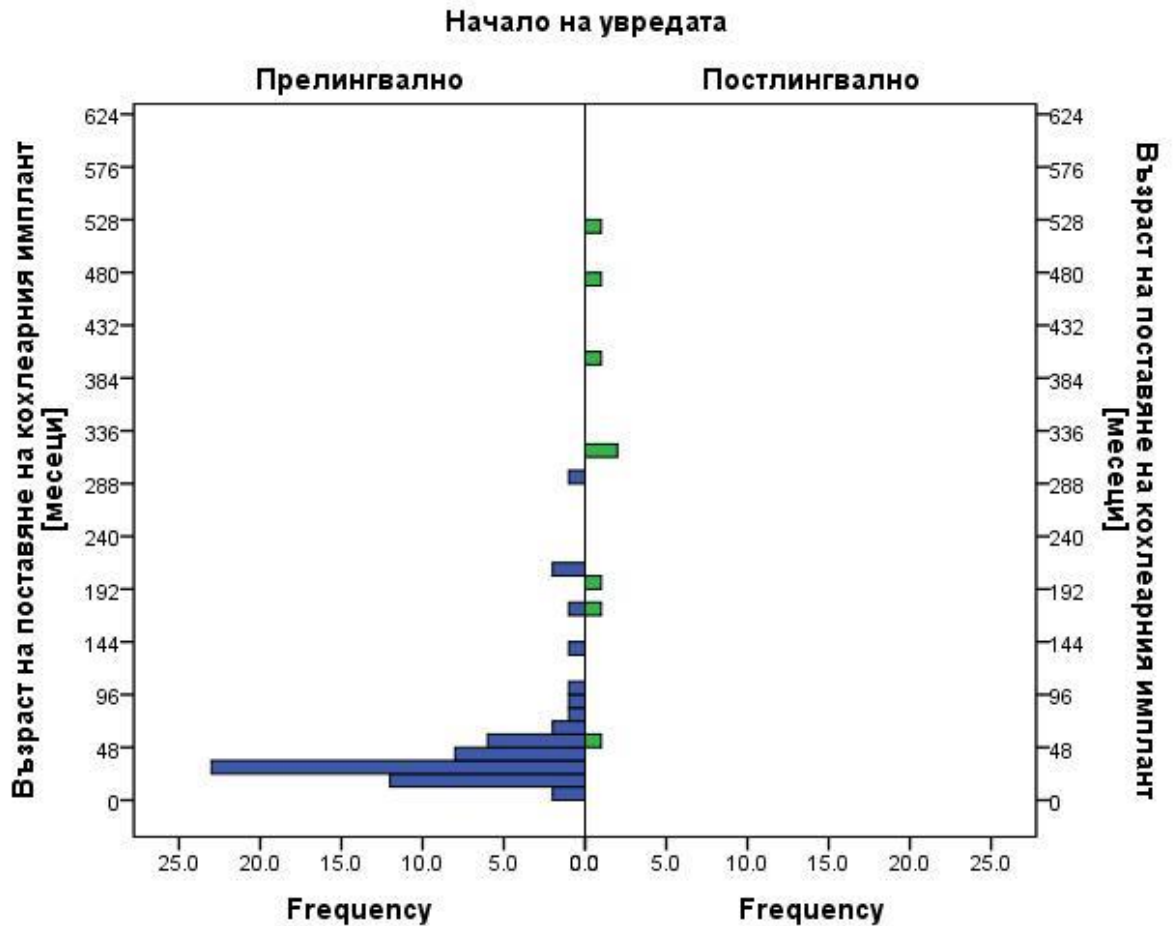
Фигура 24. Брой пациенти, при които е проведено хирургично лечение - кохлеоимплантация

При 21 от пациентите имплантите са двустранни. При пациентите с КИ е проведена слухова и речева рехабилитация.



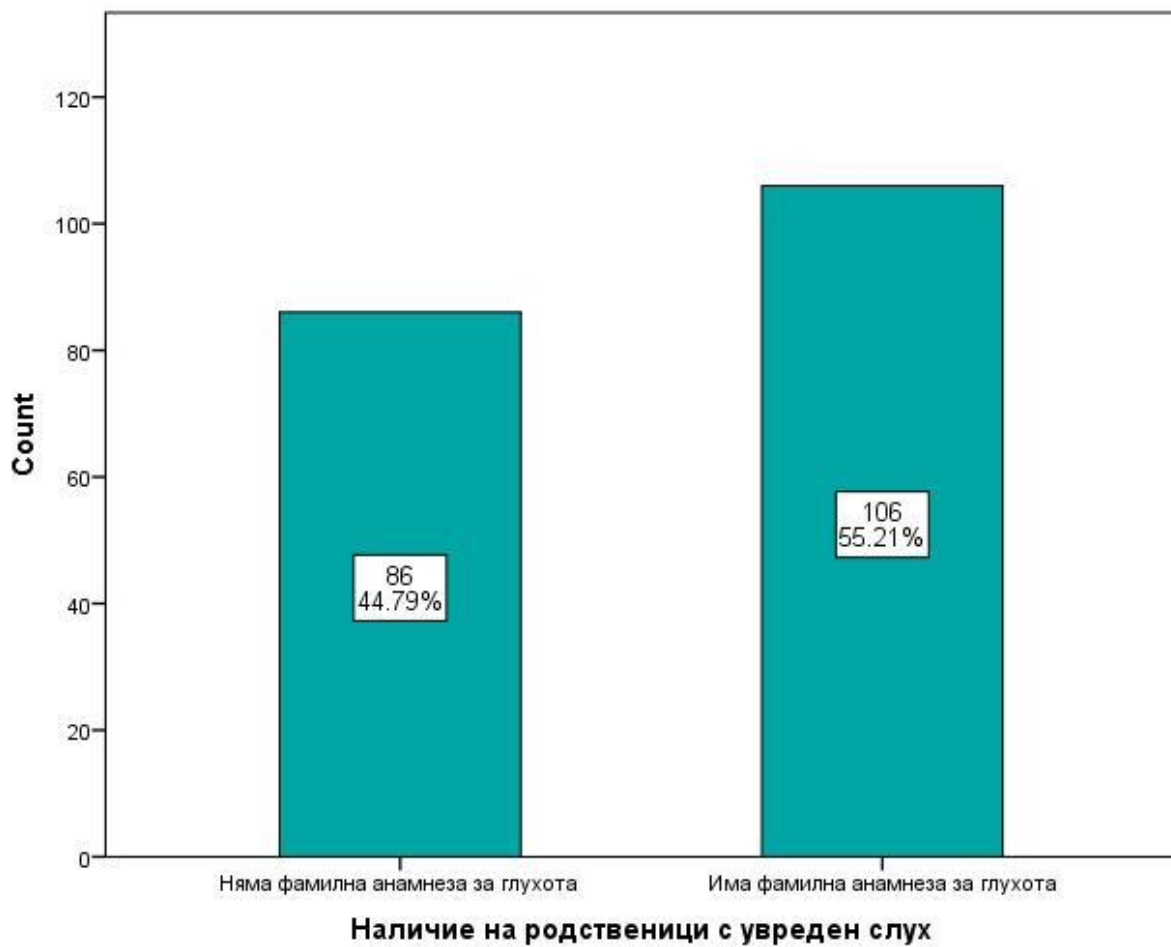
Фигура 25. Брой поставени кохлеарни импланти

Фигура 26 сравнява възрастта на кохлеоимплантиране при прелингвално и постлингвално възникналата слухова загуба. От нея става ясно, че възрастта, в която са поставени най- много кохлеоимпланти в изследваната популация е между 24 и 36 месец от живота при прелингвално възникналата слухова загуба.



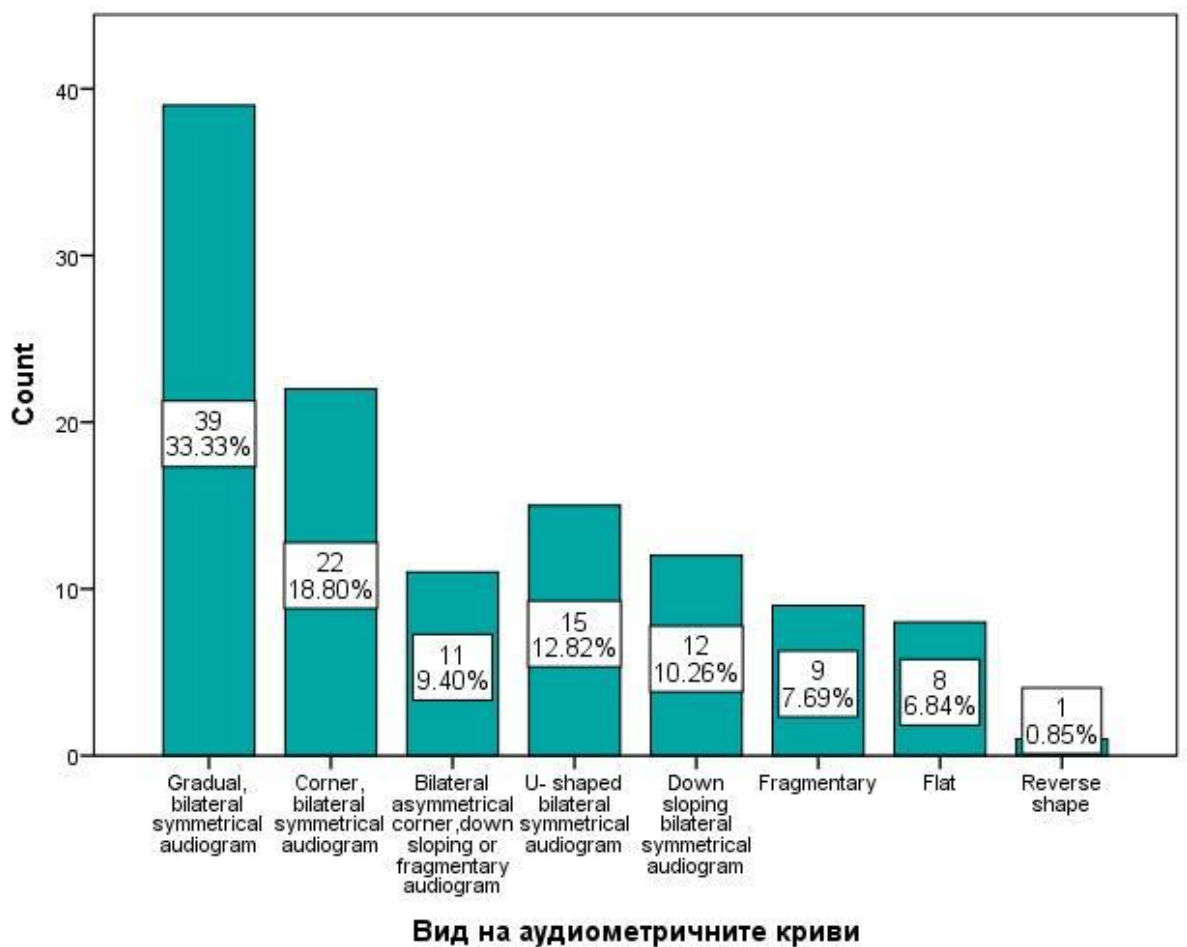
Фигура 26. Възраст на кохлеоимплантиране .

55.21% (n = 106) от изследваните случаи съобщават, че и други членове от семейството им имат увреден слух.



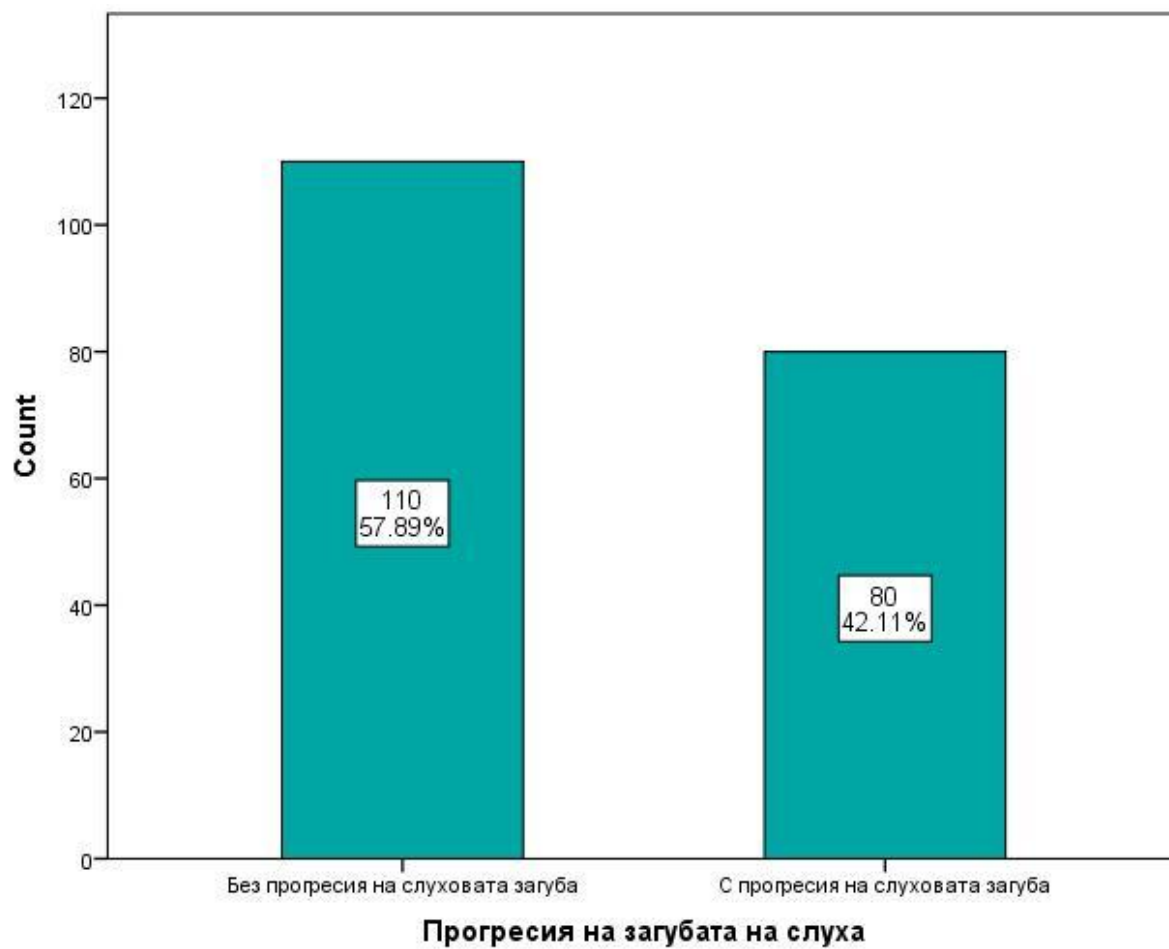
Фигура 27. Фамилна обремененост.

От събраната информация след провеждането на ТПА- при 96 от изследваните пациенти - се вижда, че при 88.54% (n = 79) от пациентите аудиометричните криви са симетрични, което говори за двустранни симетрични промени на слуха. Най- често срещаният тип аудиометрична крива, наблюдавана при изследваните пациенти е постепенно падащата (gradual audiogram) – в 33,33% от случаите. При тези пациенти аудиометричните криви са постепенно спускащи се за високите честоти. Следвани са от ъглов тип аудиометрия (corner audiogram) - в 18,8% от случаите, която отразява наличието на остатъчен слух в пациентите най- вече за ниските честоти.



Фигура 28. Вид аудиометрични криви.

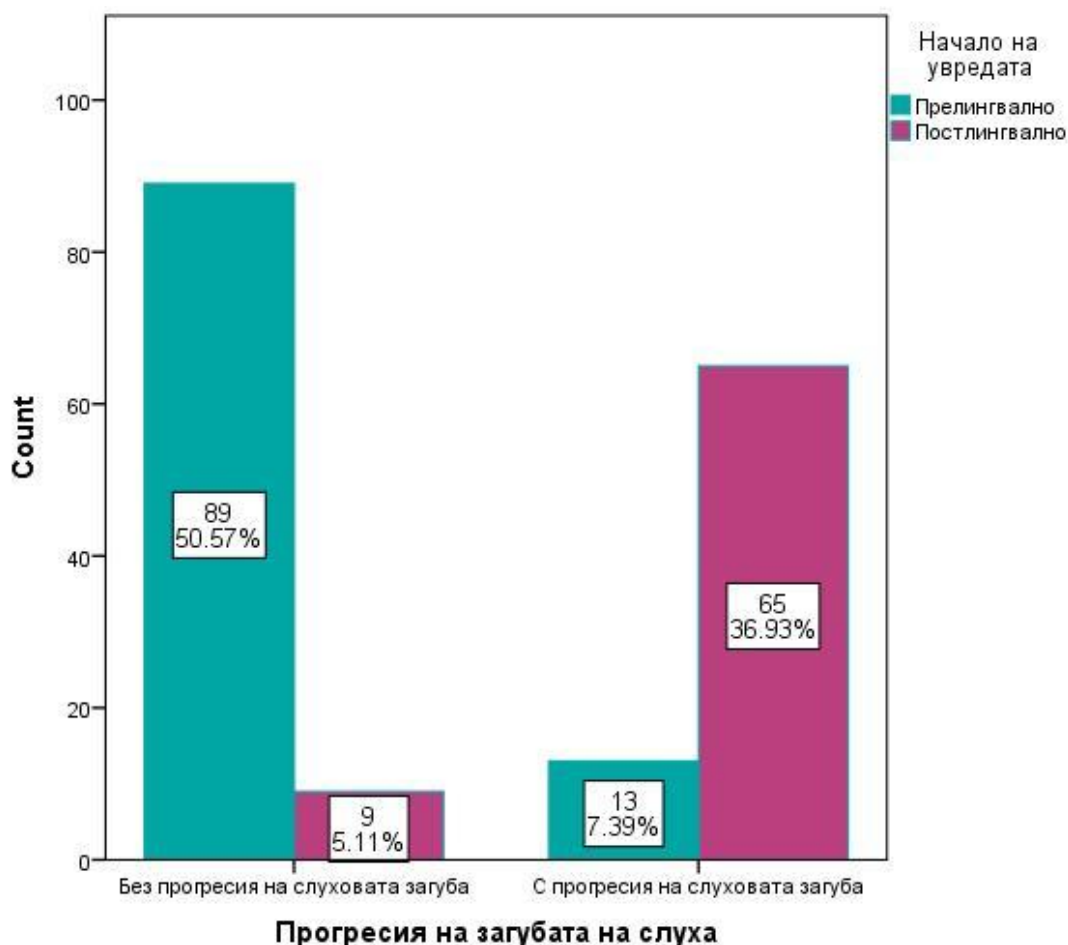
В 57.89% (n = 110) от случаите загубата на слуха протича без прогресия като към тази група се отнасят пациентите с прелингвална слухова загуба. При останалите 42.11% (n = 80) от случаите слухът се влошава във времето.



Фигура 29. Прогресия на загубата на слуха.

### 3. Статистически анализ

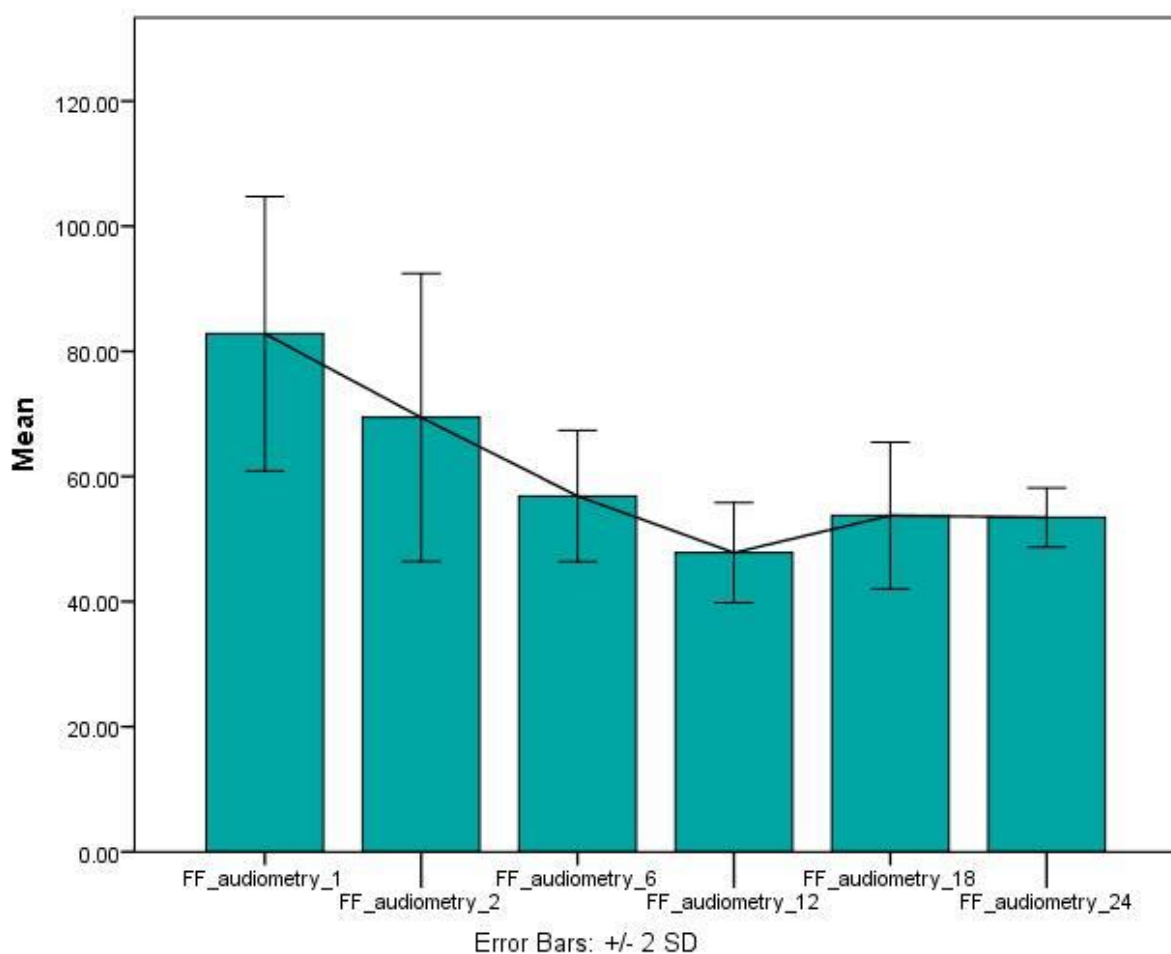
Сравнявайки прогресията на слуховата загуба, в зависимост от началото на увредата на слуха, се вижда, че липсата на прогрес на слуховата увреда при глухотата, настъпила преди проговаряне – в 50,57% (n = 89), доминира над наличието на прогресия – в 7,39% от случаи. Прогресията на слуховата загуба доминира при постлингвалната увреда – в 36,93% (n = 65) над липсата на прогрес – в 5,11% от случаите.



Фигура 30. Прогресия на слуховата загуба при пре- и постлингвална глухота.

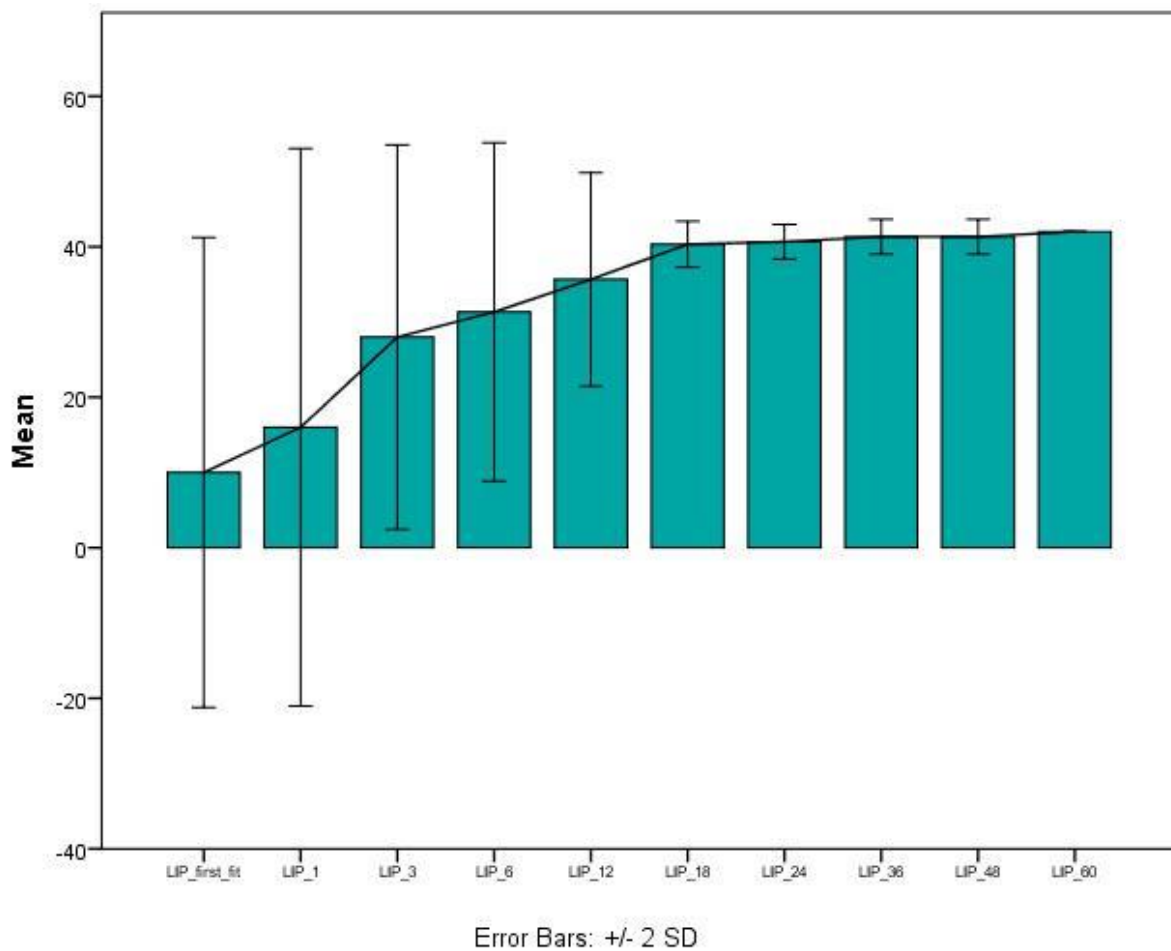


Провеждането на FF аудиометрия при кохлеоимплантирани пациенти на първи (FF\_audiometry\_1), втори (FF\_audiometry\_2), шести (FF\_audiometry\_6), дванайсти (FF\_audiometry\_12), осемнайсти (FF\_audiometry\_18) и двацет и четвърти (FF\_audiometry\_24) месец от поставяне на импланта показва плавно и сигурно подобряване на слуховото възприятие на оперираните пациенти като се достигат до постоянни стойности на прага на чуваемост около 12 месец от кохлеоимплантацията.



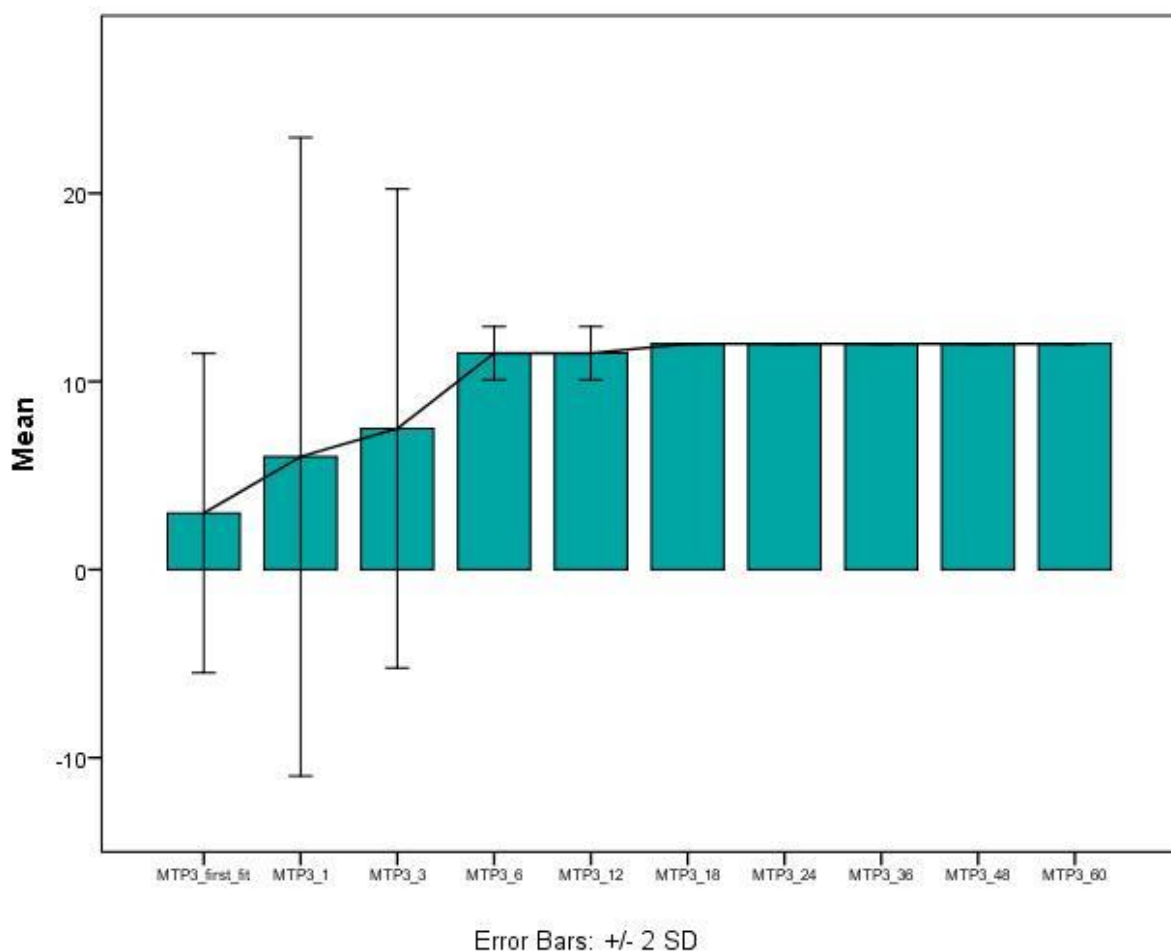
Фигура 31. Freefield, FF аудиометрия при кохлеоимплантирани.

Резултатите от теста за развитие на слухото възприятие (Listening Profil Test, LiP) обобщени за първото поставяне на КИ, за първи, трети, шести, дванайсти, осемнайсти, двайсет и четвърти, трийсет и шести, четиресет и осми и шейсети месец показват плавно подобряване на резултатите през първата година и достигане до „плато“ след осемнайстия месец.



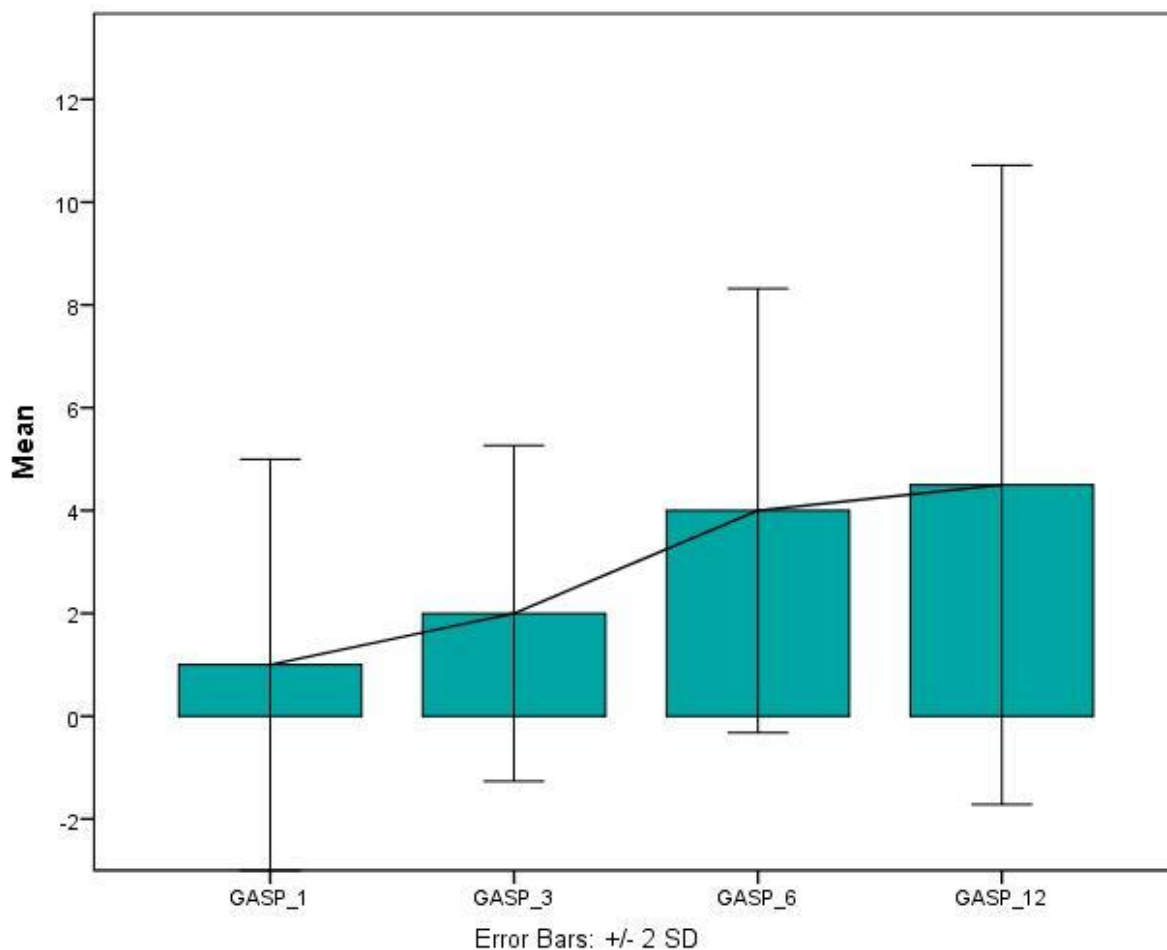
Фигура 32. Резултати от теста за развитие на слуховото възприятие.

Резултатите от теста за възприемане на сричковата структура на думата, МТРЗ, плавно се повишават през първата година след проведеното оперативно лечение, след което също както при LiP теста достигат плато, показвайки задържане на максимални стойности от 12 точки за разпознаването на трисричкови думи.

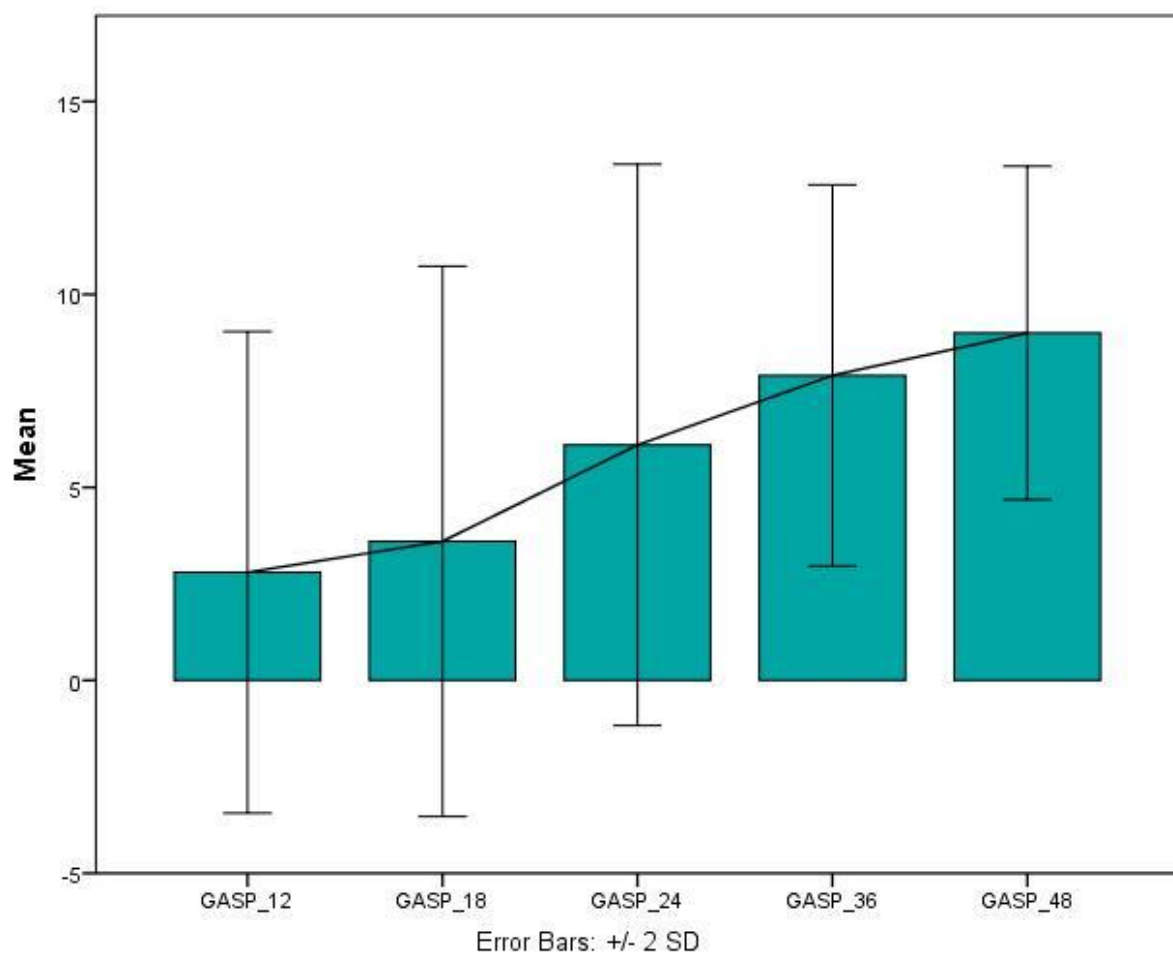


Фигура 33. Резултати от теста за възприемане на сричковата структура на думата (Monosyllable Trochee Polysyllable Test, MTP).

Тестът от отворен тип за възприемане на прости въпроси, GASP, отразен на фигура 34 и фигура 35, показва постепенно и сравнително по-бавно подобряване в резултатите, продължаващо до 48 месец от поставянето на кохлеарния имплант.

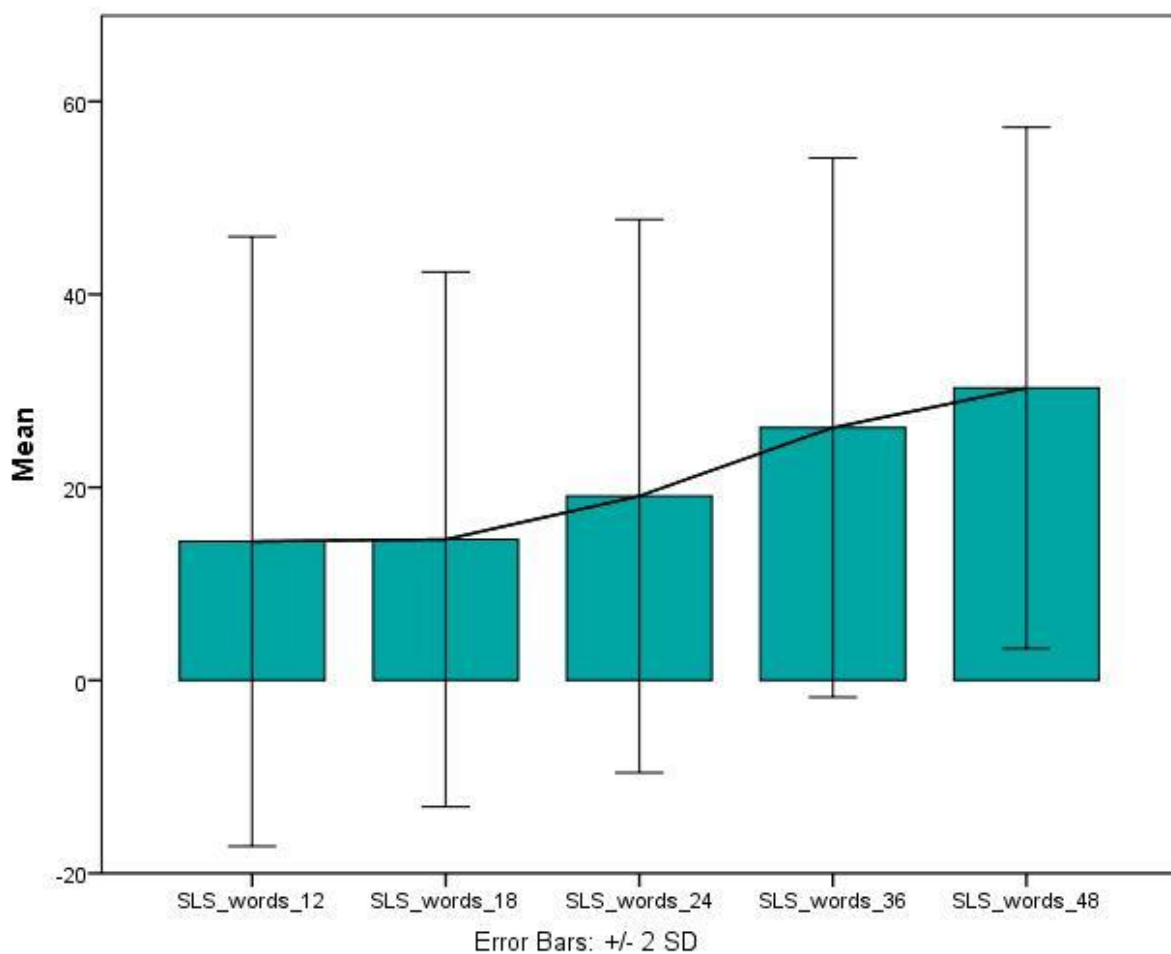


Фигура 34. Резултати от теста за възприемане на прости въпроси (Glendonald Auditory Screening Procedure, GASP)



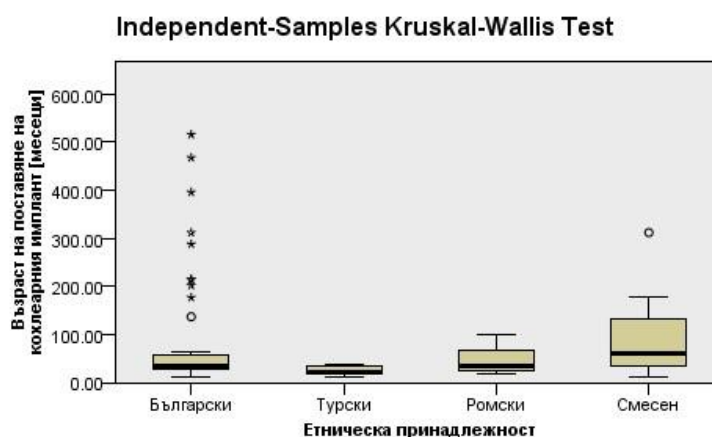
Фигура 35. Резултати от теста за възприемане на прости въпроси (GASP) 12 до 48 месец

Резултатите от теста за възприемане на непознати изречения от отворен тип, както се вижда от фигурата, са представени след 12 постоперативен месец. Това се дължи от една страна на сложността на теста и от друга- на малката възраст на преобладаващата част от кохлеоимплантираните (тестът е предназначен за деца над 4 годишна възраст).



Фигура 36. Резултати от теста за възприемане на изречения от отворен тип (specific language sentences, SLS).

За обработка на данните при търсенето на статистическа значимост между етническата принадлежност и възрастта на поставяне на кохлеарен имплант се използва непараметричният тест на Kruskal- Wallis. Сравнявайки българският, турският, ромският етнос и пациентите със смесен произход става ясно, че няма статистически значима разлика във възрастта в която се провежда хирургичното лечение. Т.е. децата са своевременно изследани, диагностицирани и лекувани независимо от етноса.



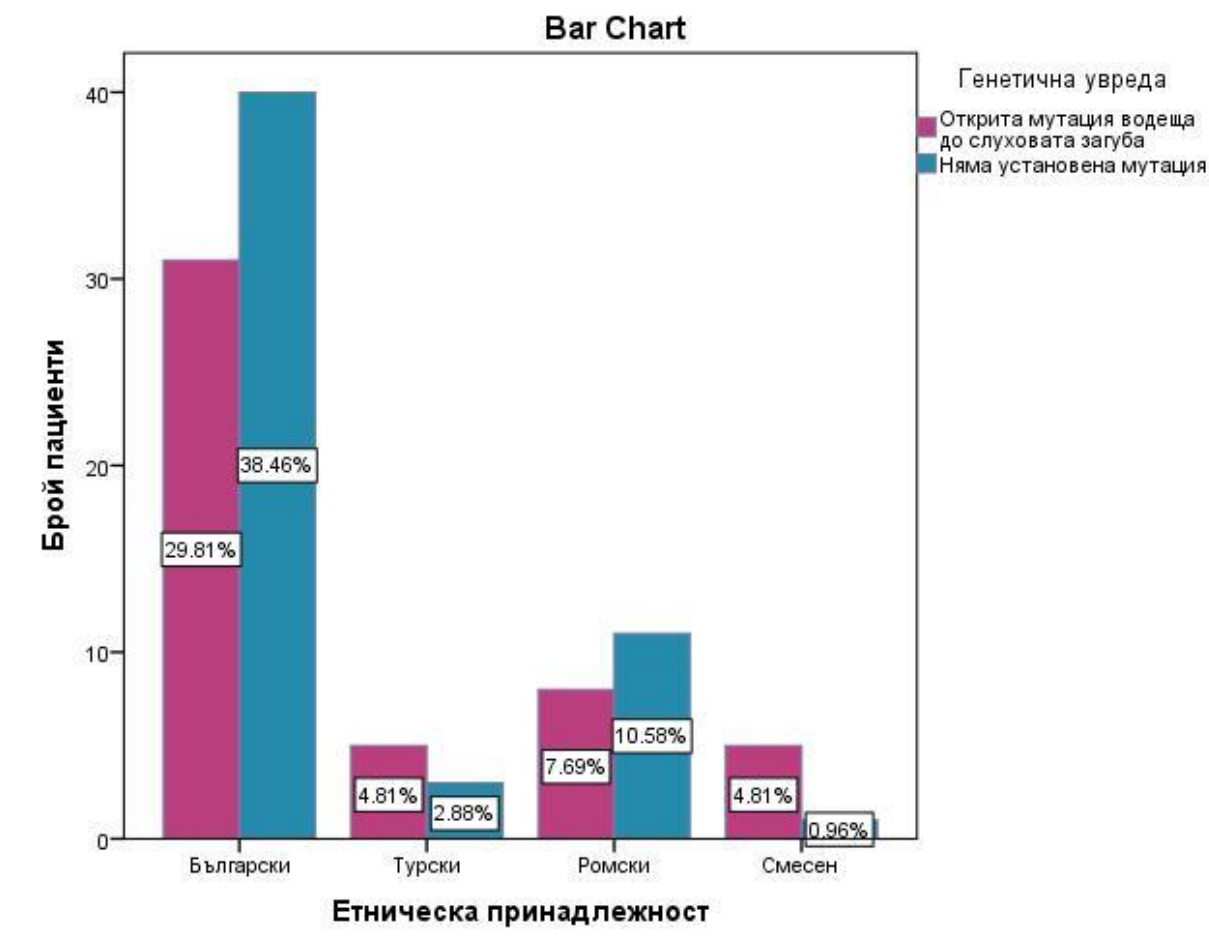
<b>Total N</b>	69
<b>Test Statistic</b>	4.177
<b>Degrees of Freedom</b>	3
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.243

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

---

**Фигура 37. Възраст на поставяне на КИ в зависимост от етническата принадлежност.**

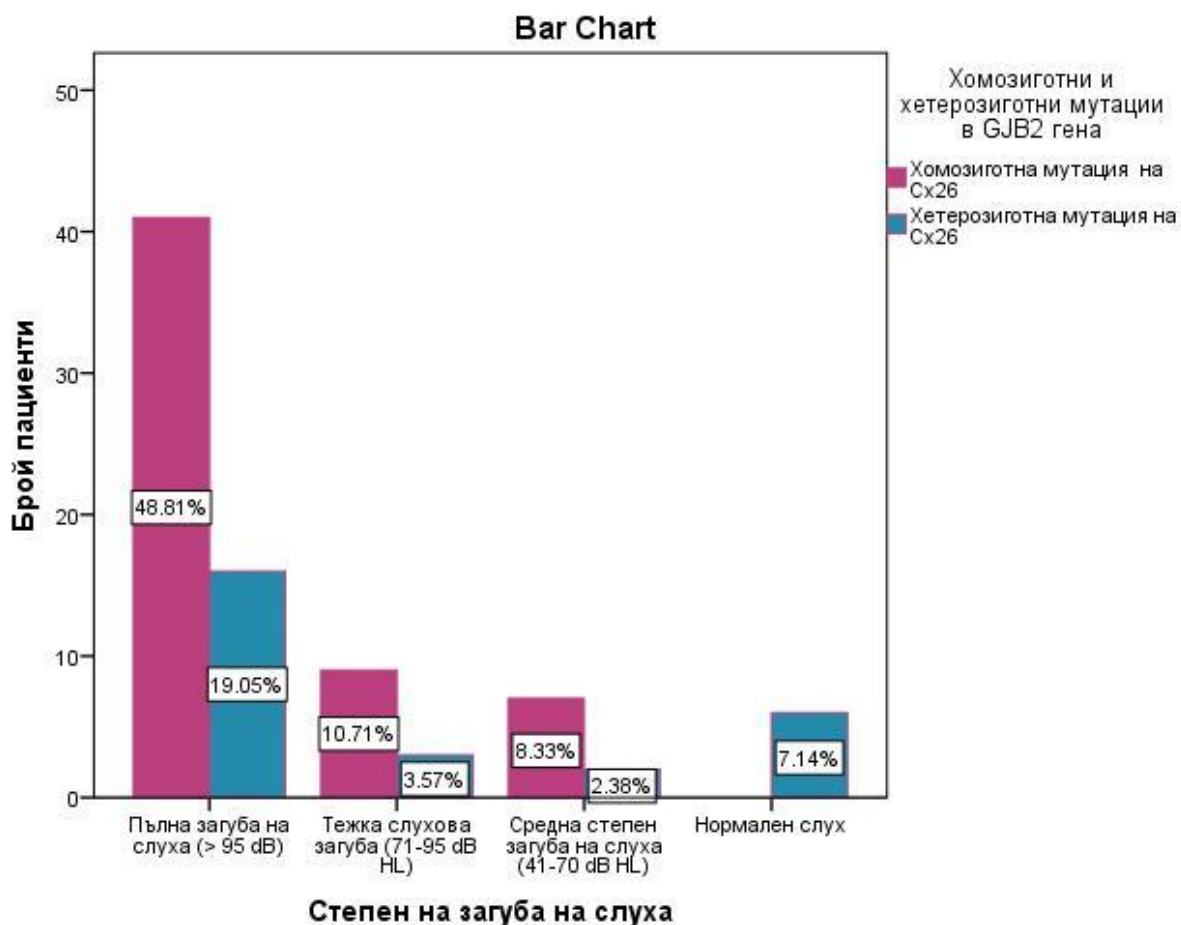
С помощта на Chi- Square Test (Хи Квадрат теста) се сравни наличието на генетична увреда при пациентите с български, турски, ромски и смесен произход. Резултатите не показват статистическа значимост –  $p = 0.217$ . Мутациите в гени, водещи до увреда на слуха, се разпределят без значение от етническата принадлежност.



Фигура 38. Генетична увреда в зависимост от етническата принадлежност.

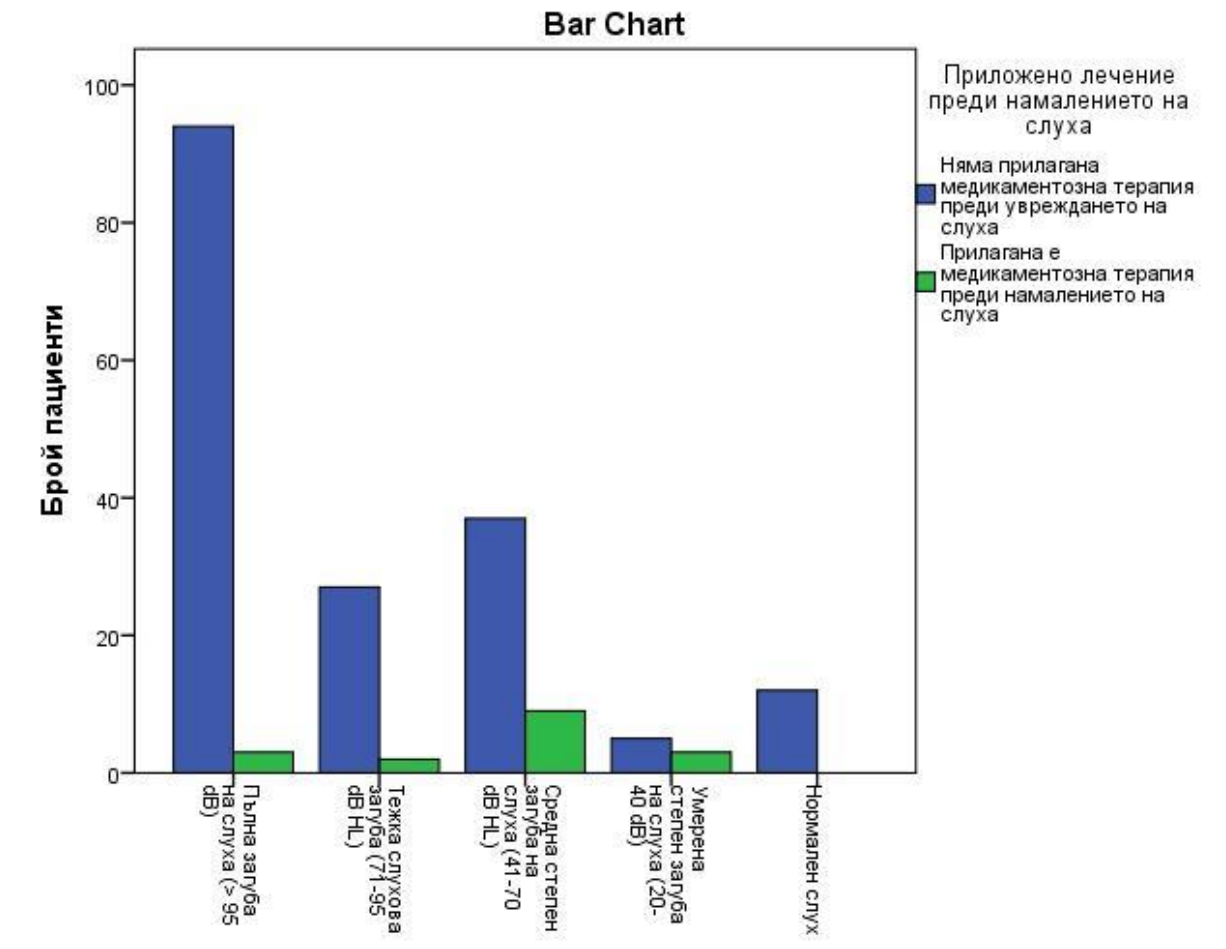


Чрез Chi- Square Test, сравнявайки степента на слухова загуба и откритите мутации в хомозиготно и хетерозиготно състояние в GJB2 гена, се изчисли статистическа значимост –  $p < 0.05$ . От представената графика се вижда, че най-голям процент от пациентите, носители на мутация в Sx26 в хомозиготно състояние са с пълна слухова загуба ( $> 95$  dB).



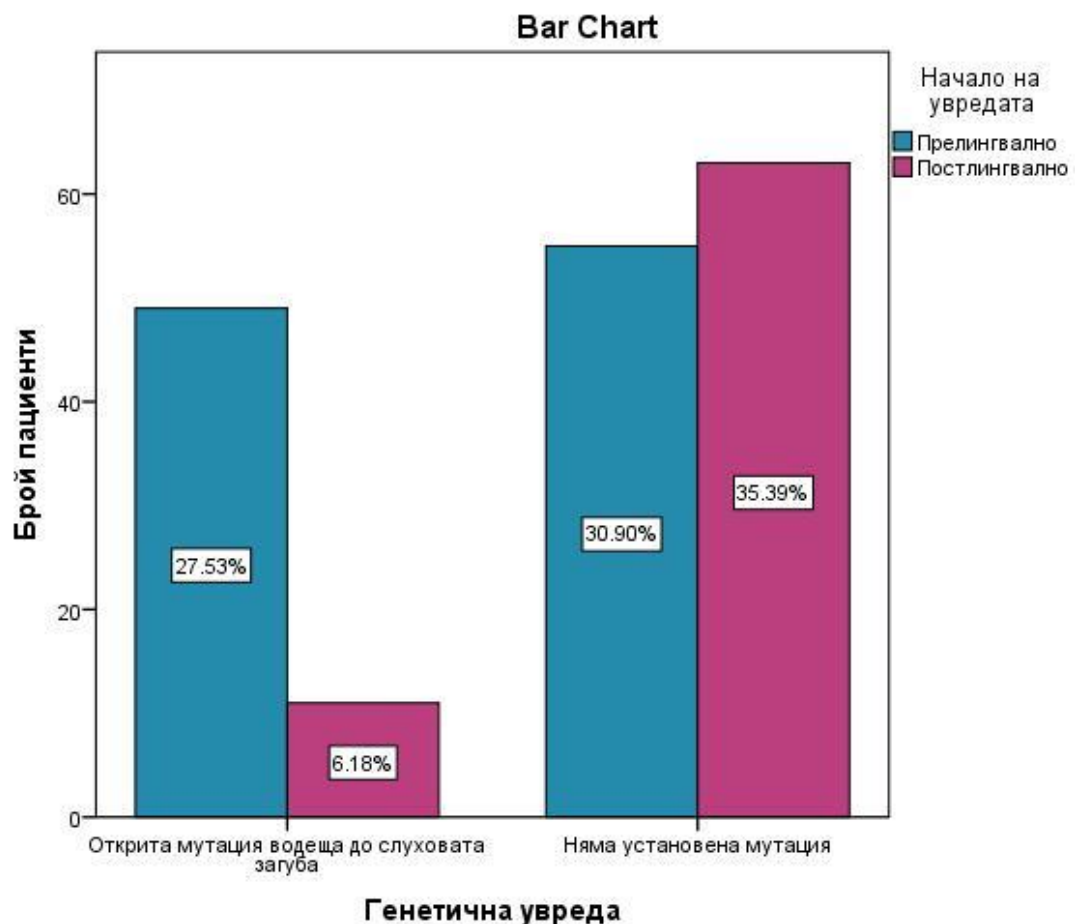
Фигура 39. Степен на слуховата загуба в зависимост от наличието на мутации в GJB2 гена.

Чрез Chi- Square Test се съпостави тежестта на слухова загуба с приложението на ототоксични медикаменти преди увреждане на слуха. Получиха се статистически значими резултати ( $p < 0.05$ ), показващи че приложената медикаментозна терапия не повлиява степента на слухова загуба.



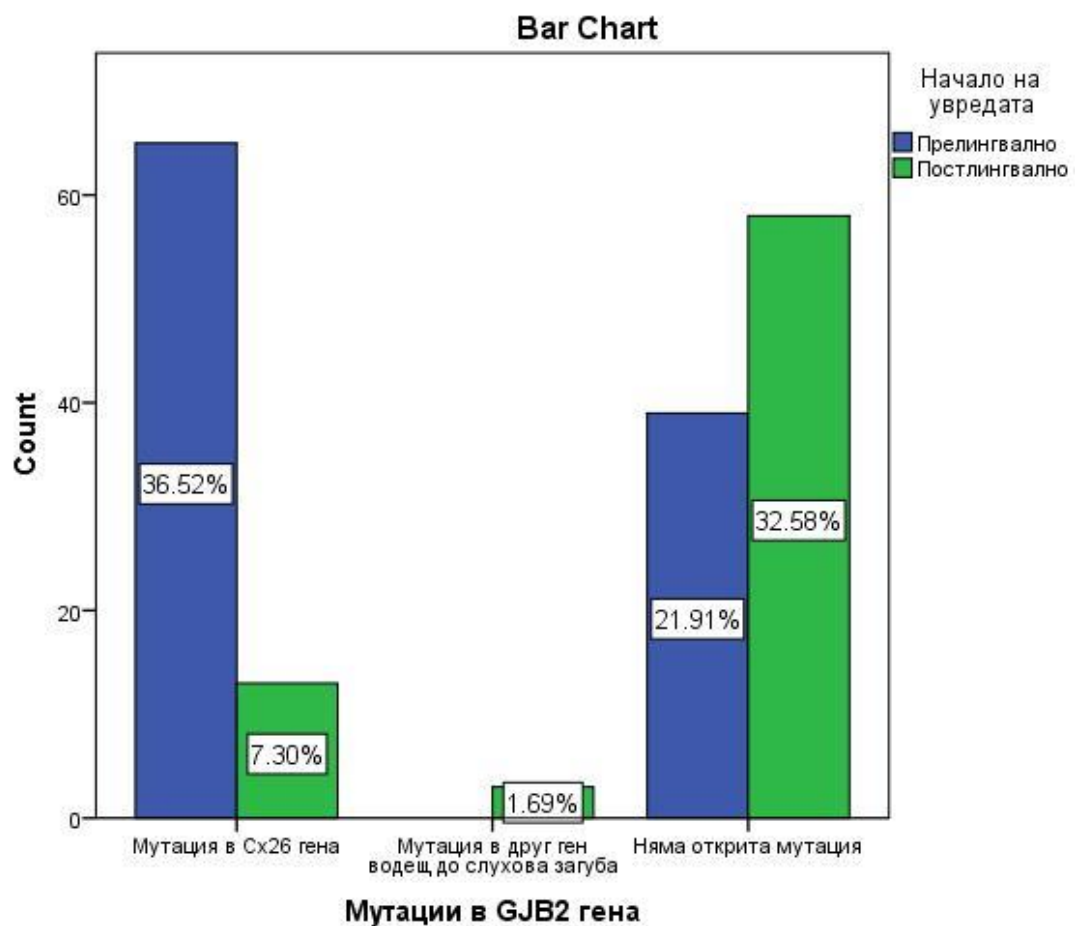
Фигура 40. Степен на слуховата загуба в зависимост от приложената ототоксична терапия преди увреждането на слуха.

Между генетичната увреда и началото на слуховата загуба с теста Chi- Square се открива статистическа значимост ( $p < 0.05$ ) между наличието на мутации в гените отговорни за слуха и началото на слуховата увреда. Сравнявайки групата на пациенти със слухова загуба в резултат на мутация с групата на пациенти, при които няма установени мутации в гените отговорни за чуването, се наблюдава преобладаване на случаите на прелингвална слухова загуба при пациентите с доказана генетична глухота. При пациентите, при които няма установени мутации, разпределението между прелингвално и постлингвално начало на слуховата увреда е приблизително еднакво.



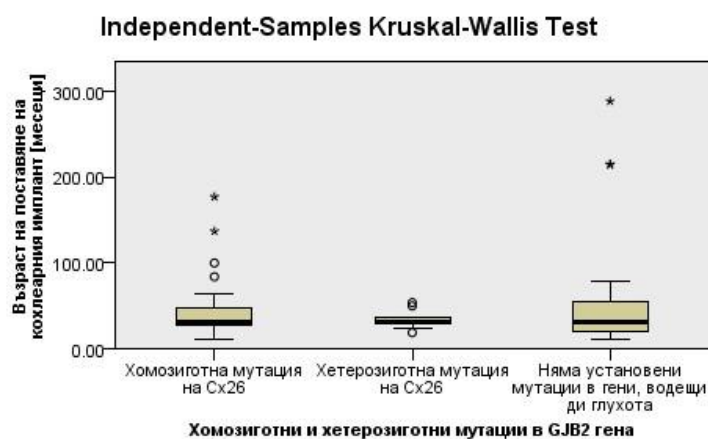
Фигура 41. Наличие на генетична увреда в зависимост от началото на слуховата загуба.

Използвайки Chi- Square Test се изследва началото на слуховата загуба в зависимост от наличието на мутация в GJB2 гена. Установи се статистическа значимост при изследваните пациент ( $p < 0.05$ ) между двете величини. В случаите на установена мутация в GJB2 гена доминира прелингвалната слухова загуба (близо пет пъти по- висока спрямо постлингвалната). При наличието на мутации в други гени се наблюдава изцяло постлингвална глухота (АД унаследяване). В случаите, в които няма открита мутация, разпределението прелингвална- постлингвална начало на слуховата увреда няма значима разлика.



Фигура 42. Наличието на мутации в GJB2 гена в зависимост от началото на слуховата загуба.

Използвайки непараметричният тест Kruskal- Wallis Test се сравни възрастта на поставяне на кохлеарен имплант с наличието на мутации при имплантираните пациенти. Не се откри статистически значима ( $p > 0.05$ ) разлика във възрастта на провеждане на хирургично лечение при пациентите с хомозиготна мутация в Sx26 гена, спрямо пациентите с хетерозиготна мутация и тези, при които няма установени мутации в гени, водещи до глухота.

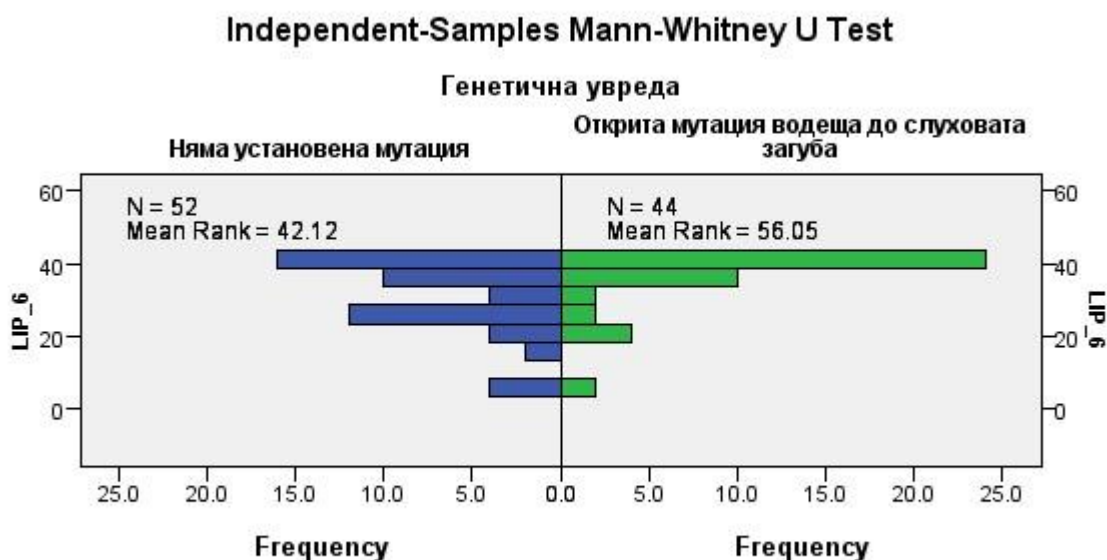


<b>Total N</b>	61
<b>Test Statistic</b>	.058
<b>Degrees of Freedom</b>	2
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.972

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

Фигура 43. Съпоставяне възрастта на кохлеоимплантиране с откритите генетични мутации

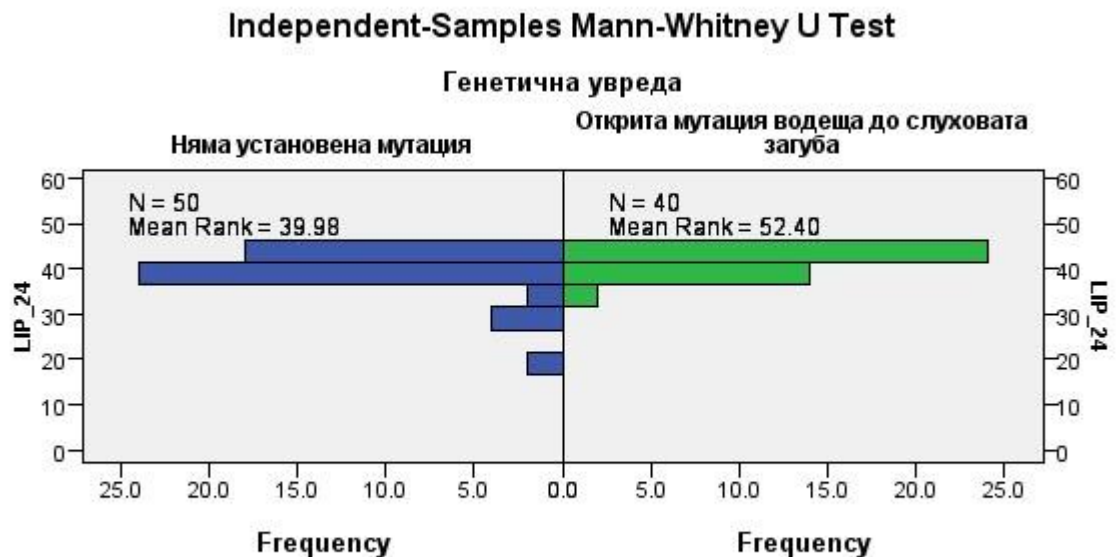
С непараметричният Mann-Whitney U Test се сравниха резултатите от слуховата рехабилитация – развитието на слухово възприятие (LiP Profile) на шестият месец от поставянето на КИ в зависимост от наличието или отсъствието на мутация, водеща до слуховата загуба. Получените резултати показват по-добро справяне с различаването на звуци при пациентите с открита мутация, водеща до слухова загуба ( $p < 0.05$ ).



<b>Total N</b>	96
<b>Mann-Whitney U</b>	812.000
<b>Wilcoxon W</b>	2,190.000
<b>Test Statistic</b>	812.000
<b>Standard Error</b>	135.359
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.453
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.014

Фигура 44. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на LiP тест в 6.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

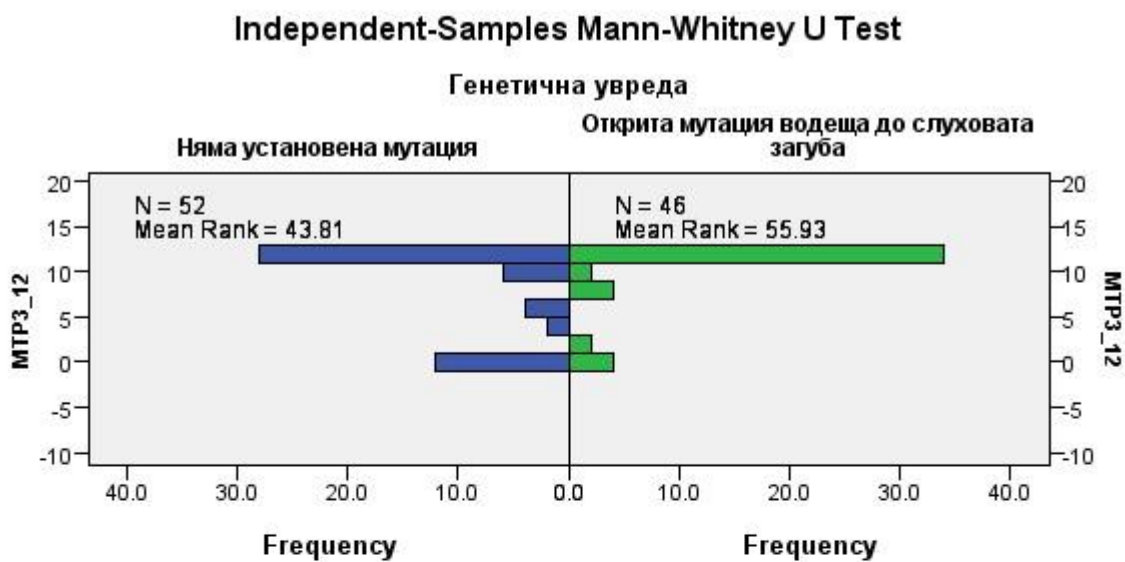
С непараметричният Mann-Whitney U Test се сравниха резултатите от слуховата рехабилитация – развитието на слухово възприятие (LiP Profile) и на двайсет и четвъртия месец от поставянето на КИ, в зависимост от наличието или отсъствието на мутация, водеща до слуховата загуба. Запазва се тенденцията от предходните месеци пациентите с открита мутация, водеща до слухова загуба, да показват по-добри резултати при провеждане на теста ( $p < 0.05$ ).



<b>Total N</b>	90
<b>Mann-Whitney U</b>	724.000
<b>Wilcoxon W</b>	1,999.000
<b>Test Statistic</b>	724.000
<b>Standard Error</b>	115.686
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.386
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.017

Фигура 45. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на LiP тест в 24.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

С непараметричният Mann-Whitney U Test се сраниха резултатите от слуховата рехабилитация за възприемане сричковата структура на думата (МТРЗ) на 12.месец от КИ. Откри се статистическа значимост в получените резултати ( $p < 0.05$ ) – пациентите с открити мутации показат по-добри резултати сравнение с пациентите, при които не е открита генетична уреда.

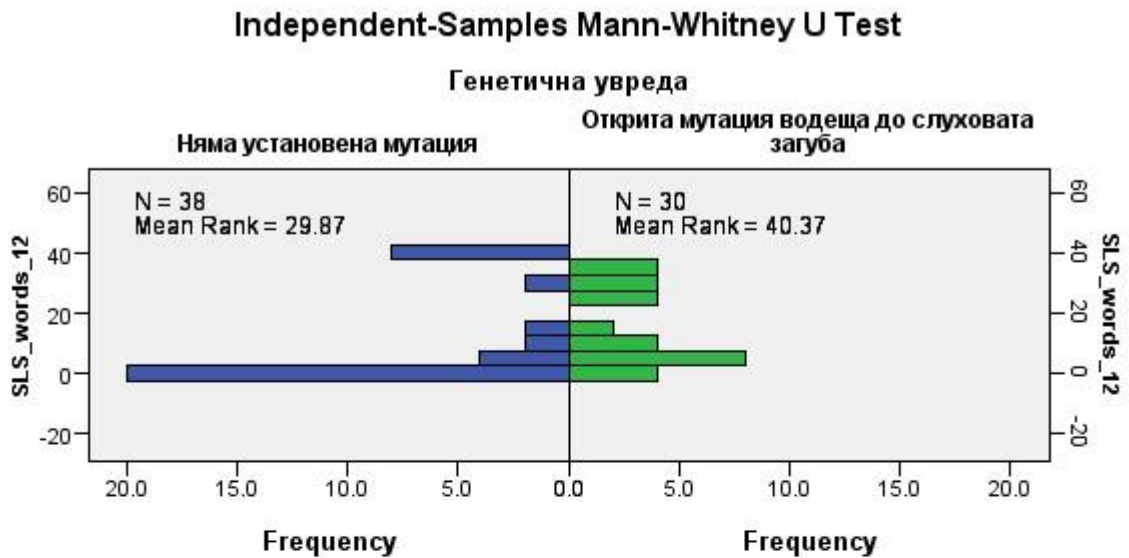


<b>Total N</b>	98
<b>Mann-Whitney U</b>	900.000
<b>Wilcoxon W</b>	2,278.000
<b>Test Statistic</b>	900.000
<b>Standard Error</b>	126.319
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.343
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.019

Фигура 46. Резултати от слуховата рехабилитация при проеждане на МТРЗ тест в 12.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.



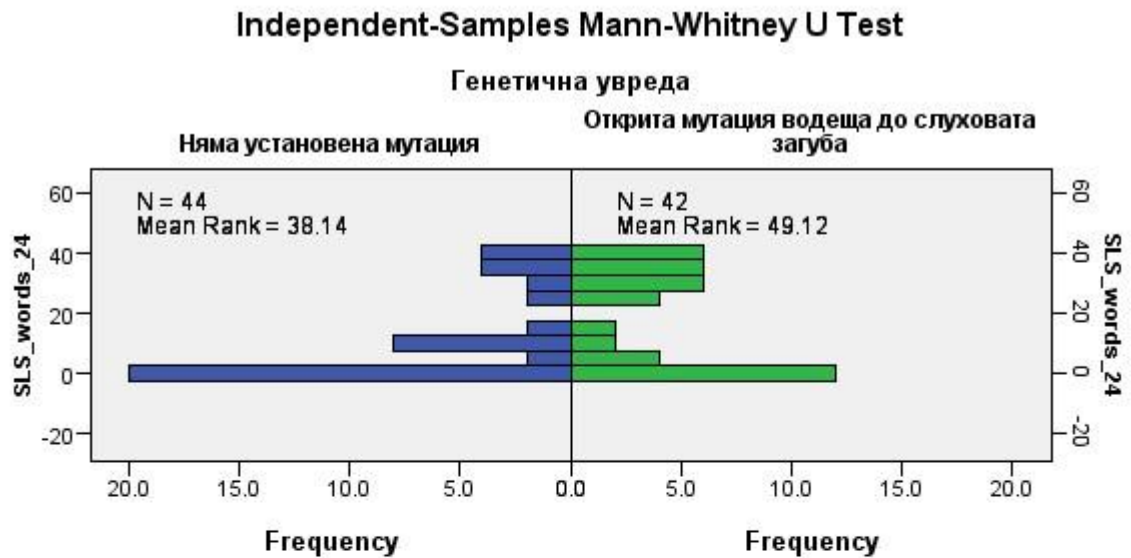
Резултатите от слуховата рехабилитация при КИ пациенти са със статистическа значимост ( $p < 0.05$ ) и при провеждане на теста за възприемане на непознати изречения (SLS) на 12.месец от КИ. По-добри резултати дават пациентите с открита мутация, водеща до слухова загуба.



<b>Total N</b>	68
<b>Mann-Whitney U</b>	394.000
<b>Wilcoxon W</b>	1,135.000
<b>Test Statistic</b>	394.000
<b>Standard Error</b>	80.310
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.192
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.028

Фигура 47. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест в 12.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

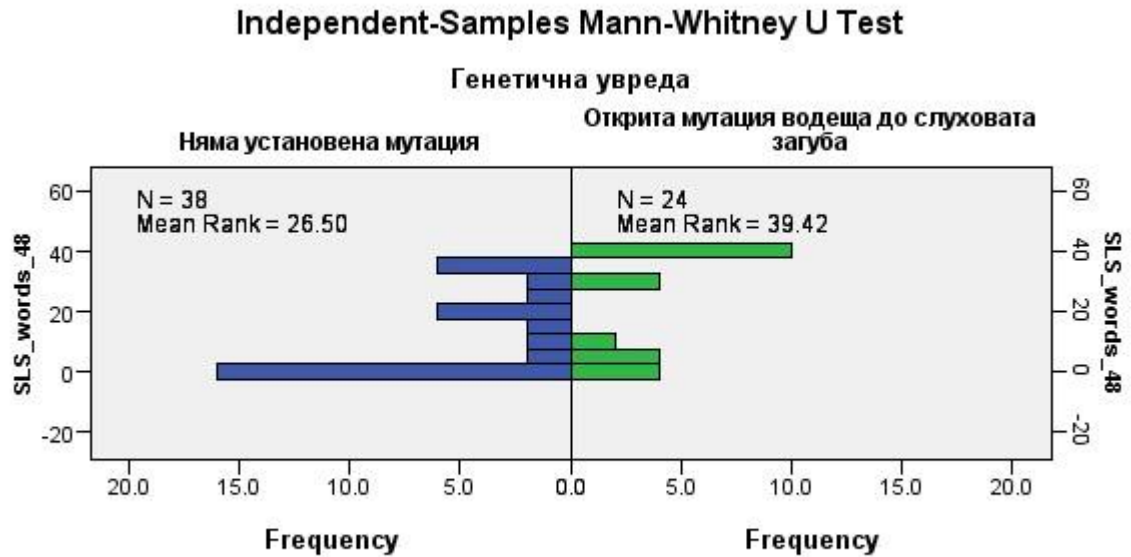
Тенденцията за по-добри резултатите от слуховата рехабилитация при КИ пациенти се запазва при провеждане на теста за възприемане на непознати изречения (SLS) и на 24.месец от КИ като се открива статистическа значимост ( $p < 0.05$ ). По-добри резултати дават пациентите с мутации, водещи до слухова загуба.



<b>Total N</b>	86
<b>Mann-Whitney U</b>	688.000
<b>Wilcoxon W</b>	1,678.000
<b>Test Statistic</b>	688.000
<b>Standard Error</b>	113.650
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.077
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.038

Фигура 48. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест в 24.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

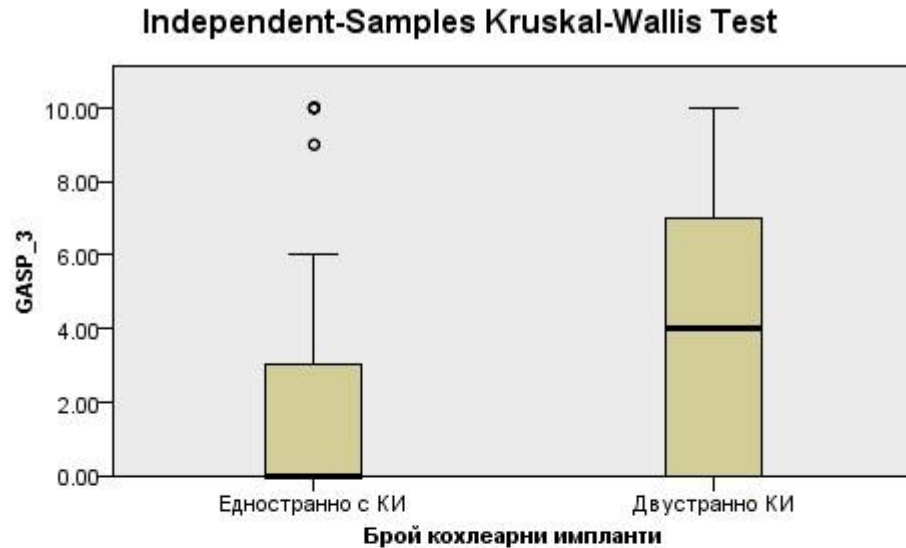
Статистически значими по- добри резултати от слуховата рехабилитация при имплантирани пациенти с генетична мутация се запазва при провеждане на теста за възприемане на непознати изречения (SLS) и на 48.месец от КИ .



<b>Total N</b>	62
<b>Mann-Whitney U</b>	266.000
<b>Wilcoxon W</b>	1,007.000
<b>Test Statistic</b>	266.000
<b>Standard Error</b>	68.545
<b>Standardized Test Statistic</b>	-2.772
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.006

Фигура 49. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест в 48.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

С непараметричният тест Kruskal- Wallis Test се сравниха резултатите от теста за разбиране на прости въпроси (GASP) проведен на третият месец след поставянето на кохлеарния имплант при пациенти с едностранен имплант и при такива с двустранно поставен имплант. Полученият резултат е със статистическа значимост ( $p < 0.05$ ) – пациентите с двустранно поставен КИ се представят значително по- добре.



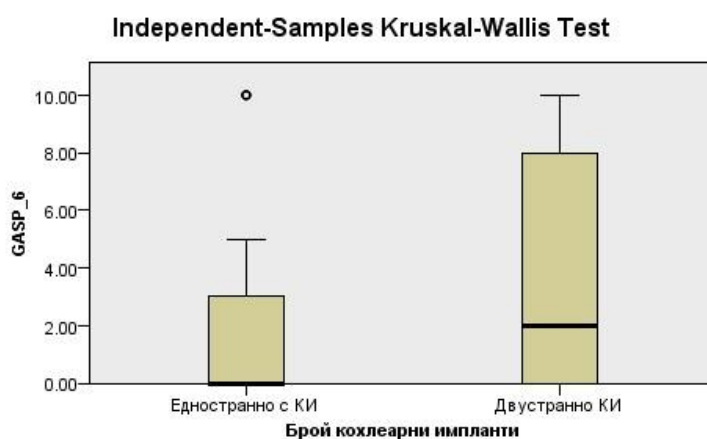
<b>Total N</b>	72
<b>Test Statistic</b>	5.818
<b>Degrees of Freedom</b>	1
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.016

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because there are less than three test fields.

---

Фигура 50. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на GASP тест на 3.месец от КИ при пациенти с едностранна и двустранна КИ.

При провеждането на Kruskal- Wallis Test за сравняване резултатите от GASP теста проведен в 6.месец от КИ се получи резултати близки до статистически значимите ( $p = 0.056$ ). Такъв резултат не е неочакан предвид трудността на теста и малката възраст на кохлеоимплантираните пациенти (тестът е подходящ за деца над 4 годишна възраст, а най- голям е броят на КИ на възраст между 12 и 48 месеца).



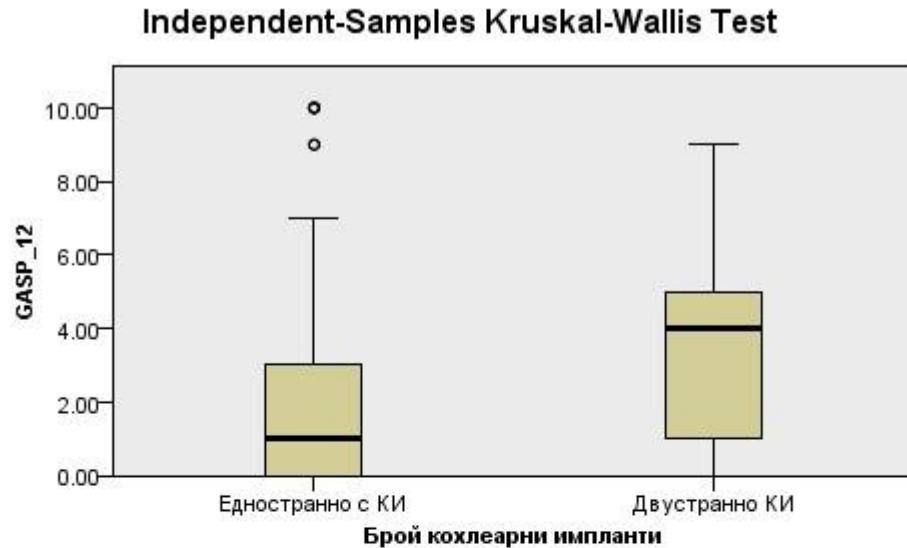
<b>Total N</b>	82
<b>Test Statistic</b>	3.662
<b>Degrees of Freedom</b>	1
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.056

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

---

Фигура 51. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на GASP тест на 6.месец от КИ при пациенти с едностранна и двустранна КИ.

Сравниха се резултатите от теста за разбиране на прости въпроси (GASP) проведен и на дванайстият месец след поставянето на кохлеарния имплант при пациенти с едностранен имплант и при такива с двустранно поставен имплант. Полученият резултат е със статистическа значимост ( $p < 0.05$ ) – пациентите с двустранно поставен КИ се представят по-добре в сравнение с тези с едностранен КИ.

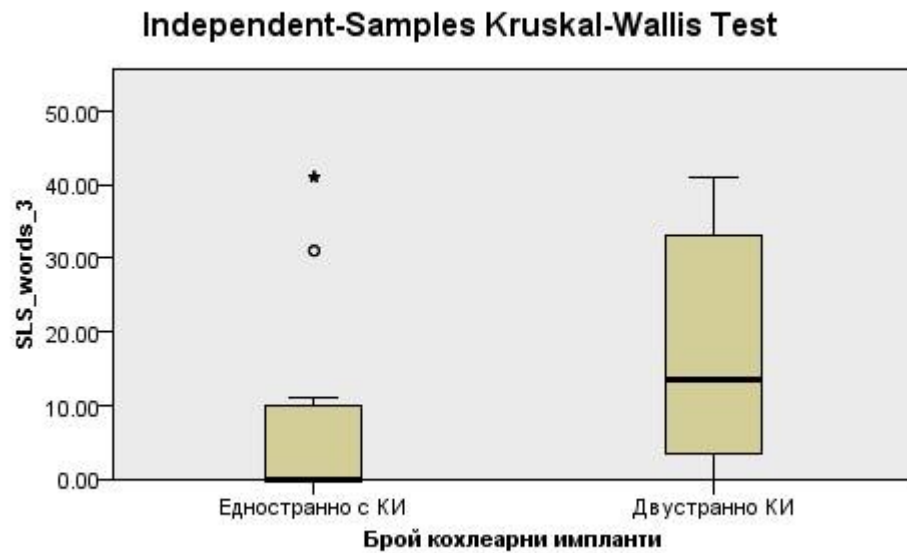


<b>Total N</b>	76
<b>Test Statistic</b>	8.115
<b>Degrees of Freedom</b>	1
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.004

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because there are less than three test fields.

Фигура 52. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на GASP тест на 12.месец от КИ при пациенти с едностранна и двустранна КИ.

При провеждане на непараметричният тест Kruskal-Wallis при изследване зависимостта на резултатите от слуховата рехабилитация в зависимост от броя постаени КИ се получи статистически значим резултат, посочващ по- доброто възприемане на непознати изречения (SLS Test) от пациентите с дустранни КИ ( $p < 0.05$ ).



<b>Total N</b>	50
<b>Test Statistic</b>	5.461
<b>Degrees of Freedom</b>	1
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.019

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because there are less than three test fields.

---

Фигура 53. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест на 3.месец от КИ при пациенти с едностранна и двустранна КИ.

#### 4.4 Генетичен анализ

През 2009 год. за първи път в България в рамките на изследователски проект към МУ – София под ръководството на проф. Д. Попова се направи генетично изследване на пациенти с несиндромна слухова загуба. Болните са изследвани за мутации в гена GJB2, кодиращ Сх26.

Във втори проект през 2012г, своеобразно продължение на започната през 2009г работа, «ГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ НА НЕСИНДРОМНАТА СЛУХОВА ЗАГУБА-КОНЕКСИН 26 И 30» са събрани още пациенти с несиндромна слухова загуба с неясна етиология. Първо те са изследвани за мутации в GJB2. След това пациентите от двата проекта, които са хетерозиготни носители или нямат мутации в GJB2, са изследвани за мутации GJB6 гена. С проведеното проучване доказва, че генетичните форми на слухова загуба с мутации в GJB2 се проявяват с ранно начало на увредата – най вече от раждането до 5-та годишна възраст. Няма намерени мутации при пациентите с начало на слуховата увреда след 10 годишна възраст.

При последващ нов проект през 2013 година –« ГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ НА НЕСИНДРОМНАТА СЛУХОВА ЗАГУБА-КОНЕКСИН 26, 30 И 31» са събрани нови пациенти с несиндромна слухова загуба с неясна етиология. Първо те са изследвани за мутации в GJB2. След това пациентите, които са хетерозиготни носители или нямат мутации в GJB2, са изследвани за мутации GJB6 гена. На следващ етап всичките събрани към този момент пациенти от трите проекта, които нямат хомозиготни мутации в GJB2 са изследвани и за мутации в GJB3 гена, кодиращ Сх 31.

След проведените три проекта финансирани от МУ- София и обособяването на биобанка, в изследователския екип, работещ с много деца с невросензорна загуба на слуха, част от които са лекувани в кърмаческа възраст по различни поводи в неонатални и педиатрични отделения, в които АБ средство на първи избор са аминокгликозидни антибиотици, възниква въпросът възможно ли е наличието на увреди в митохондриалната ДНК в резултат на употребата на ототоксичните аминокгликозидни антибиотици.



С четвъртият осъществен проект «РОЛЯ НА МУТАЦИИТЕ В МИТОХОНДРИАЛНАТА ДНК В ПАТОГЕНЕЗАТА НА НЕСИНДРОМНАТА СЛУХОВА ЗАГУБА СВЪРЗАНА С УПОТРЕБА НА АМИНОГЛИКОЗИДНИ АНТИБИОТИЦИ» 2014 година се увеличава броя на пациентите и се включват нови гени – MT-RNR1 и MT-TS1 .

Пациенти, отговарящи на критериите за включване, са изследвани за мутациите A1555G в гена MT-RNR1 и A7445G в гена MT-TS1 на митохондриалната ДНК. Липсата на открити мутации A1555G в гена MT-RNR1 и A7445G в гена MT-TS1 на митохондриалната ДНК при изследваните пациенти не е неочаквано, поради ниската честота с която се откриват в някои популации.

Липсата на установени мутации най-вероятно се дължи на ниската им честота.

При последващ пети съвместен проект на Катедрата по УНГ болести към УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“ с Центъра по молекулна медицина към МУ-София се постави за цел изследването на пациенти, които не са носители на мутации в Сх26 (GJB2), Сх30 (GJB6) и Сх31 (GJB3) и имат НСЗС и фамилна обремененост за слухова загуба за откриването на рядко срещани мутации в гените, кодиращи слуха; определяне честотата, клиниката и генетичната характеристика на слуховата увреда. Клиничните данни на подобрите пациенти са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Клинични данни на подобрите пациенти и техни родственици

Лаб. №	Сем. №	Пробанд/родственик	Роднинска връзка с пробанда	Диагноза	Възраст (г.)	Начало на възникване на слуховата увреда
DF60	1	пробанд		Практическа глухота (60-90 dB)	38	От 13-14 год. възраст с прогресивно влошаване
DF212		родственик	майка	Нормален слух	63	
DF213		родственик	баща	Практическа глухота (60-90 dB)	64	През пубертета
DF84	2	пробанд		Практическа глухота (60-90 dB)	14	От 2-3 год. възраст
DF85		родственик	майка	Практическа глухота (60-90 dB)	43	От 6 мес. възраст

DF216		родственик	баща	Нормален слух	51	
<b>DF139</b>	3	пробанд		Практическа глухота (60-90 dB)	10	От раждането
DF137		родственик	Сестра на баба й по майчина линия	Пълна слухова загуба (над 90 dB)	56	От детска възраст
DF138		родственик	първи братовчед по майчина линия	Практическа глухота (60-90 dB)	36	От детска възраст – от около 6 год. възраст
DF140		родственик	майка	Пълна слухова загуба (над 90 dB)	41	От 15-16 год. възраст
DF141		родственик	Син на DF138	Пълна слухова загуба (над 90 dB)	5	От раждането
DF202		родственик	Сестра на баба й по майчина линия	Нормален слух	51	
DF203		родственик	брат	Тежко чуване (30-60 dB)	23	От около 10 год. възраст
<b>DF182</b>		4	пробанд		Пълна слухова загуба (над 90 dB)	43
DF204	родственик		дъщеря	Тежко чуване (30-60 dB)	21	От детска възраст
DF205	Няма роднинска връзка		съпруг	Нормален слух	45	
<b>DF210</b>	5	пробанд		Тежко чуване (30-60 dB)	43	От около 30 год. възраст
DF209		родственик	дъщеря		3 месеца	От раждането
DF211		Няма роднинска връзка	съпруга	Нормален слух	41	
DF215		родственик	майка	Тежко чуване (30-60 dB)	71	От около 45-50 год. възраст

Всички пробанди не са носители на мутации в Cx26 (GJB2), Cx30 (GJB6) и Cx31 (GJB3).

Резултати, получени при анализа на резултатите от новогенерационното секвениране:

С помощта на софтуера VarSeq vcf файловете генерирани след приключване на секвенирането бяха използвани за анализ. Осъществихме филтриране с цел откриване на вариантите, водещи до клиничен фенотип.

Филтрирането бе осъществено по следните критерии:

- 1) вариантите да минават проверката за качество на секвениране (да има достатъчен брой прочити (>20), броят прочити при хетерозиготните варианти да е над 30% и др);
- 2) варианти, които са missense, frameshift (варианти, водещи до изместване на рамката на четене), nonsense (варианти, водещи до появата на стоп кодон), делеции и инсерции без изместване рамката на четене, сплайс варианти и всички други варианти, които имат ефект върху белтъка. Не се разглеждат вариантите, междугенни и интронни, които не биха имали някакъв ефект.
- 3) честотата на вариантите да е под 5% според базите данни ExAC, EVS и 1kG
- 4) вариантите да са в гени свързани с развитието на глухота.

Подбраният генен панел включва 212 гена, които са свързани с развитието на глухота (както синдромна, така и несиндромна):

*ABHD12, ABHD5, ACTB, ACTG1, AIFM1, ALMS1, ANKH, AP1S1, ARSB, ATP2B2, ATP6V1B1, BCS1L, BDP1, BHD12, BSND, BTD, C10ORF2, CABP2, CACNA1D, CATSPER2, CCDC50, CD151, CDH23, CDKN1C, CEACAM16, CHD7, CHSY1, CIB2, CISD2, CLDN14, CLRN1, COCH, COL11A1, COL11A2, COL2A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COLA3, CRYM, DCAF17, DCDC2, DFNA5, DFNB31, DFNB59, DIABLO, DIAPH1, DIAPH3, DLX5, DNMT1, DSPP, ECE1, EDN3, EDNRA, EDNRB, ERCC2, ERCC3, ESPN, ESRRB, EYA1, EYA4, FAM65B, FAS, FGF3, FGFR3, FOXC1, FOXI1, GATA3, GIPC3, GJA1, GJB1, GJB2, GJB3, GJB4, GJB6, GPR98, GPSM2, GRHL2, GRIN2A, GRXCRI, GSTP1, HAL, HARS, HARS2, HGF, HOMER2, HOXA1, HSD17B4, IGF1, ILDR1, JAG1, KARS, KCNE1, KCNJ10, KCNQ1, KCNQ4, KIAA1199, KIT, KITLG, LARS2, LHFPL5, LHX3, LOXHD1, LRP2, LRTOMT, MAN2B1, MANBA, MARVELD2, MASP1, MET, MGP, MIR182, MIR183, MIR96, MIF, MSRB3, MTAP, MTRNR1, MYH14, MYH9, MYO15A, MYO1A, MYO1C, MYO1F, MYO3A, MYO6, MYO7A, NARS2, NDP, NF2, NLRP3, NR2F1, OPA1, OTOA, OTOF, OTOR, PAX3, PCDH15, PDZD7, PEX1, PEX26, PEX6, PEX7, PHYH, PITX2, PMP22, POLD1, POLR1C, POLR1D, POU3F4, POU4F3, PRPS1, PTPRQ, RAI1, RDX, RPGR, RPS6KA3, SALL1, SALL4, SDHD, SEMA3E, SERPINB6, SIX1, SIX5, SLC12A1, SLC13A2, SLC17A8, SLC19A2, SLC26A4, SLC26A5, SLC29A3, SLC33A1, SLC4A11, SLC52A3,*

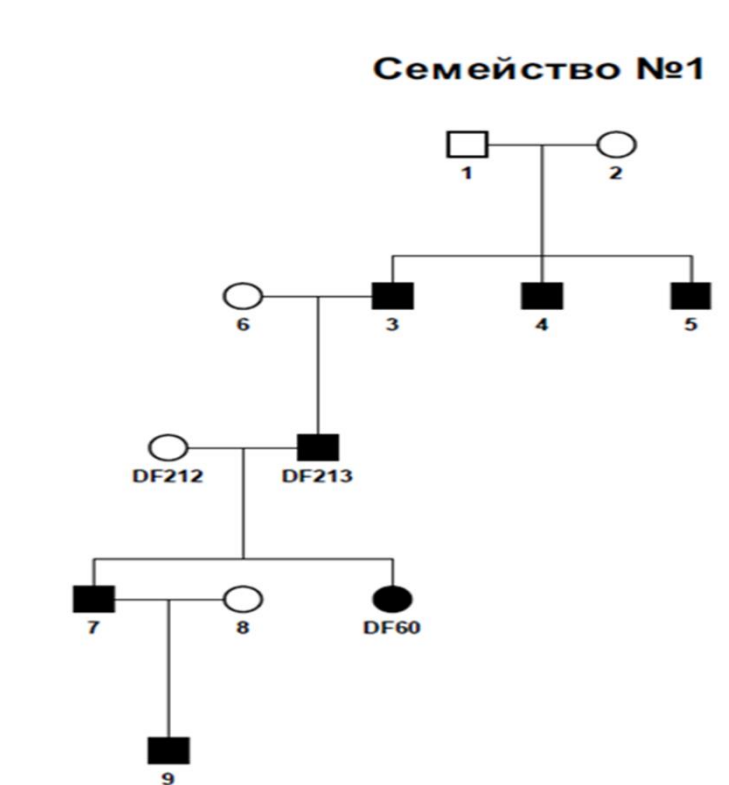
*SLITRK6, SMAD4, SMPX, SNAI2, SOX10, SOX2, SPINK5, STRC, SUCLA2, SUCLG1, TBC1D24, TBLIX, TCF21, TCOF1, TECTA, TFAP2A, TFB1M, TFCP2, TIMM8A, TJP2, TMC1, TMIE, TMPRSS3, TMPRSS5, TNC, TPRN, TRIOBP, TRMU, TYR, USH1C, USH1G, USH2A, VCAN, WFS1*

За оценка на патогенността на новооткрити missense варианти използвахме програми за предикция. За класификацията на вариантите като патогенни, вероятно патогенни, бенигнени или варианти с неясно клинично значение използвахме ACMG критериите (Richards S. et al, 2015).

Таблица 2. Параметри на новогенерационното секвениране

Пациент	% таргети на 4813 гена с покритие над 20x:	Средно покритие на целия панел от 4 813 гена	% таргети на генния панел от 212 гена с покритие над 20x	Средно покритие на генния панел от 212 гена:
<b>DF60</b>	93.9	90.4x	94.62	85.93x
<b>DF84</b>	93.3	85.9x	94.14	81.29x
<b>DF139</b>	95.7	119.5x	96.41	113.64x
<b>DF182</b>	93.1	87.9x	94.07	83.94x
<b>DF210</b>	94.9	103.8x	94.9	103.8x

**При пациент DF60** (жена на 38 годишна възраст) не се откриха патогенни или вероятно патогенни варианти.



Фигура 54. Родословно дърво на пробанд DF60.

Откриват се два варианта с неясно клинично значение представени в Таблица 3.

Таблица 3. Варианти с неясно клинично значение, открити при пациент DF60.

Хромозомна позиция/ ген	Тип на замяната	Генотип	HGVS c	HGVS p	Честота в ExAC	SIFT	Polyphen 2
20:62817598 COL9A3	missense	Хетерозигот	NM_001853.3: c.110C>T	NP_001844.3: p.Pro37Leu	0.0012	Tolerated	Benign
6:133889815 TCF21	missense	Хетерозигот	NM_003206.3: c.418T>C	NP_003197.2: p.Tyr140His	0.00017	Tolerated	Benign

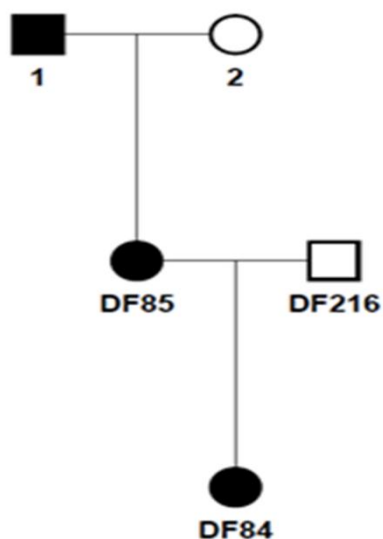
Вариантът в *COL9A3* е вариант с неясно клинично значение. Програмите за предикция на патогенността дават противоречиви резултати. Според Sift, Polyphen 2, LRT и MetaSVM вариантът е неутрален (непатогенен, бенигнен). Според PROVEAN, MutationTaster, MutationAssessor и FATHMM е патогенен. Мутации в този ген се свързват с развитието на автозомно унаследяваната

множествена епифизиална дисплазия 3, с или без миопатия (OMIM 120270). Установено е също така, че мутации в този ген се свързват и с развитието на несиндромна слухова загуба. Според Asamura и съавтори варианти G181-P183 del и D617E се свързват със средно прогресивно невросензорно намеление на слуха във всички честоти. Вариантът G181-P183 del е открит в хомозиготно състояние, което предполага възможно рецесивно унаследяване, а вариантът D617E (p.Asp617Glu) е открит сходно на p.Pro37Leu наблюдаван в изследваната от нас пациентка в хетерозиготно състояние, което предполага автосомно доминантно унаследяване [Asamura K. et al, 2005a]. Доказано е че *COL9A3* е високо експресиран в кохлеата, във вътрешното ухо (Asamura K. et al, 2005b) Вариантът p.Pro37Leu според ClinVar е с противоречива интерпретация на патогенността – според един източник е с неясно клинично значение, а според друг е бенигнен. В близост до него няма известни патогенни missense варианти. В базата gnomAD Exomes Variant Frequencies 2.0.1, BROAD се открива един хомозигот, в ExAC има 15 хетерозиготни носители на този вариант. Поради това може да се касае за много рядък полиморфизъм. Според ACMG критериите p.Pro37Leu е с неясно клинично значение. Много вероятно този вариант да не е причина за наблюдавания клиничен фенотип.

***TCF21*** генът кодира транскрипционен фактор. Вариант в него p.Asp21Glu е открит при пациент диагностициран на 10 месечна възраст и при пациент с глухота възникнала в третото десетилетие. Ролята обаче на този вариант в развитието на невросензорна слухова загуба не е потвърдено [Vona B et al, 2014; Arbustini Eloisa AE et al, 2005]. Вариантът открит при DF60 p.Tyr140His не се открива в ClinVar. С много ниска честота е в ExAC и не се откриват хомозиготи. Противоречиви са резултатите за него от програмите за предикция. Според програмите Polyphen 2, SIFT, MutationAssessor и MetaSVM вариантът е неутрален (непатогенен, бенигнен). Mutation Taster, FATHMM, LRT, Provean го определят като патогенен. Според ACMG критериите вариантът е с неясно клинично значение. Вероятно не е свързан с наблюдавания клиничен фенотип при пациентката.

**При пациент DF84** (момиче на 14 годишна възраст) не се откриха клинично значими патогенни варианти.

## Семейство №2

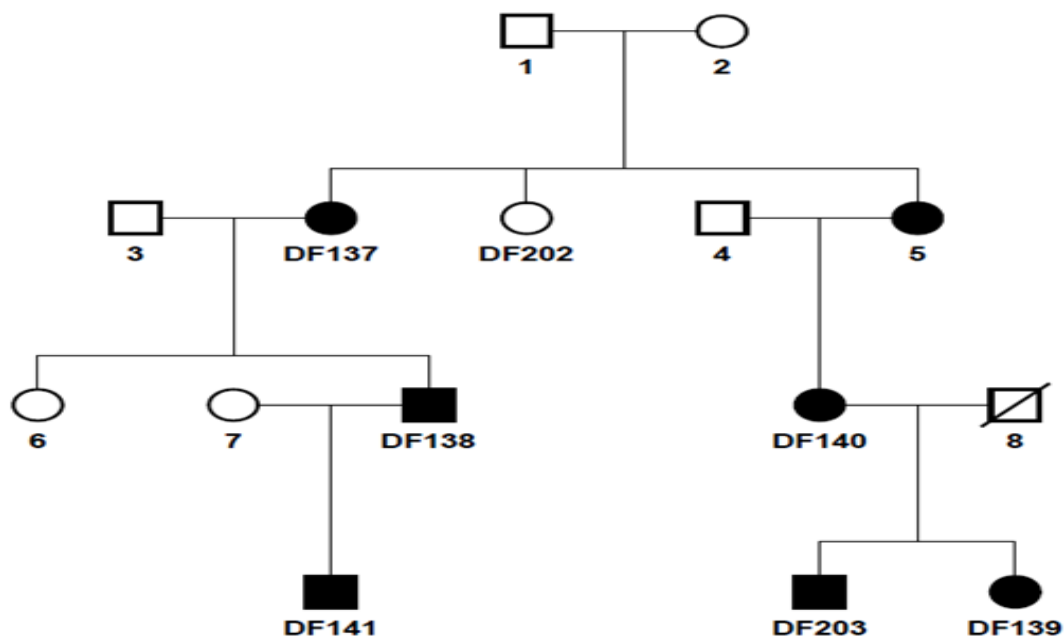


Фигура 55. Родословно дърво на пробанд DF84.

Според родословното дърво и засегнатите членове на семейството се предполага, че унаследяването на слуховата загуба е автозомно доминантно.

**При пациент DF139** (момиче на 10 годишна възраст) в един от предходните проекти се доказва мутацията Val37Ile/WT. Тя обаче не е отговорна за слуховото увреждане. Поради това пациентката и семейството ѝ са включени в за търсене на други гени, отговорни за глухотата, за да се докаже генетичната причина в това семейство.

### Семейство №3



Фигура 56. Родословно дърво на пробанд DF139.

При пациентката се откриват следните варианти с неясно клинично значение представени в Таблица 4. Тези варианти бяха подбрани за провеждане на сегрегационен анализ.

Таблица 4. Варианти с неясно клинично значение, открити при пациент DF139.

Хромозомна позиция/ ген	Тип на замяната	Генотип	HGVS c	HGVS p	Честота в ExAC	SIFT	Polyphen 2
6:89265727 GABRR2	Missense	Хетерозигот	NM_002043.4: c.775C>T	NP_002034.3: p.Arg259Cys	0.0019	damaging	Probably damaging
17:1478121 MYO1C	Missense	Хетерозигот	NM_00108077 9.1: c.1367C>T	NP_00107424 8.1: p.Ser456Leu	$8.24 \times 10^{-6}$	damaging	Possibly damaging



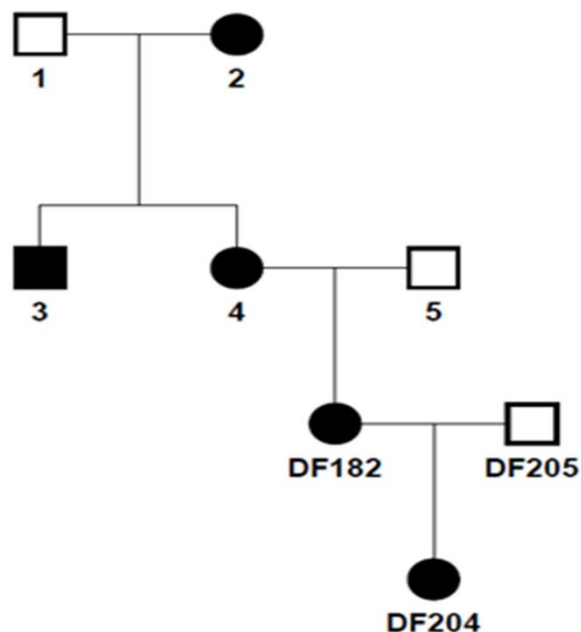
Всички използвани програми за предикция определят варианта в *GABRR2* като патогенен. В ClinVar няма информация за този вариант. Според ACMG критериите вариантът е с неясно клинично значение. *GABRR2* кодира белтък с GABA-A рецепторна активност, участващ в сигналния път на гама-аминобутировата киселина. Асоциира се с развитието на аутизъм, бъбречни заболявания, загуба на слуха. Този ген не е включен в панела от гени свързани с развитието на глухота. Вариантът в този ген бе открит след анализа на всички гени независимо от това дали са включени в панела.

*MYO1C* е член на супер семейството на миозините, които играят роля в трафика на GLUT4 - съдържащите везикули до плазмената мембрана в отговор на инсулинова стимулация и при компенсаторна ендоцитоза следваща регулирана екзоцитоза. Предполага се че този ген играе роля в процесите на адаптация на специализирани сензорни клетки, където се предполага че динамично настройва напрежението на механочувствителните йонни канали чрез взаимодействие с актин [Lin T. et al, 2011]. Няколко missense варианта са докладвани при пациенти с несиндромна автозомно доминантна слухова загуба: R156W, V252A, T380M, Q750K, K823N, E831K [Zadro C. et al, 2009; Lin T. et al, 2011]. Открития при пациента вариант p.Ser456Leu е с много ниска популационна честота, без данни в ClinVar и с противоречиви резултати от програмите за предикция. Не е в близост до докладваните варианти свързани с несиндромна глухота. По-голяма част от програмите за предикция (SIFT, Polyphen2, MutationTaster, LRT, PROVEAN) определят вариантът като патогенен. Програмите MutationAssessor, FATHMM и MetaSVM го определят като бенигнен (неутрален). Според ACMG критериите вариантът е с неясно клинично значение.

С помощта на CNV анализът проведен на VarSeq се откри при изследваната пациентка дупликация на 51 базови двойки в ОТОА гена (16:21679026-21679076), засягащ екзон 3 и частично интрон 1-2 и интрон 2-3. Установено е, че CNV се свързват все повече с развитието на несиндромна слухова загуба (Sloan-Heggen CM. et al, 2016; Shearer AE. Et al, 2014). Shearer и съавтори осъществяват CNV анализ на 686 пациента със слухова загуба. Установяват че CNV най-често се откриват в (73% от откритите CNVs) и в ОТОА (13%). Както дупликации, така и делеции в ОТОА се свързват с клиничен фенотип при автозомно рецесивна несиндромна глухота [Shearer AE. Et al, 2014]. Възможно откритата дупликация в ОТОА при DF139 да е причина за възникналата слухова загуба.

**При пациент DF182** (жена на 43 годишна възраст) се открива вариантът с.1330C>T (p.Gln444Ter) в екзон 7 на гена *ILDRI* (NM\_001199799.1; NP\_001186728.1). Този вариант води до появата на стоп кодон. В ExAC честотата му е 0.000008. Открит е в само един човек в хетерозиготно състояние. Не се открива в хомозиготно състояние. В ClinVar в близост до открития вариант е докладван друг nonsense вариант с.1135G>T (p.Glu379Ter), който е патогенен и се свързва с автозомно рецесивна несиндромна глухота. Откритият вариант при DF182 е патогенен, но тъй като е в хетерозиготно състояние, и се намира в ген, който се свързва с автозомно рецесивна форма на глухота, не е достатъчен за развитието на клиничния фенотип наблюдаван при пациентката.

### Семейство №4

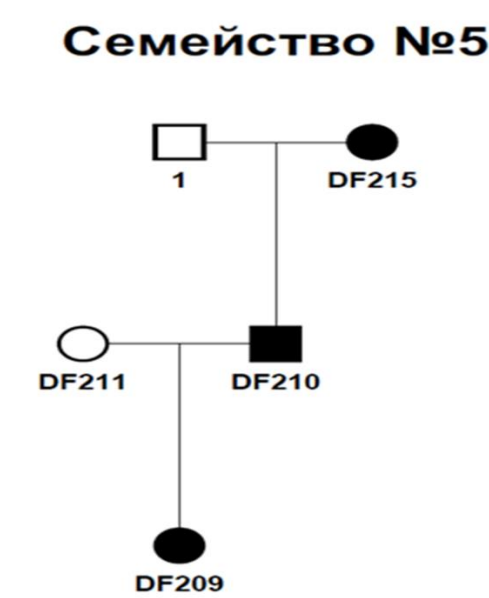


Фигура 57. Родословно дърво на пробанд DF182.

При това семейство се предполага, че глухотата е унаследена по автозомно доминантен път. Не може да се изключи и вероятността за митохондриално унаследяване, тъй като в родословието се наблюдава, че всички жени с глухота имат деца с глухота. Поради тази причина проведохме директно секвениране на

митохондриалните гени MT-RNR1, MT-CO1 (MT-TS1), MT-TN1, MT-ND1, MT-TL1. В тези гени не се откриха патогенни мутации и поради тази причина се изключи възможността слуховата загуба в семейството на DF182 да се дължи на митохондриално унаследени мутации.

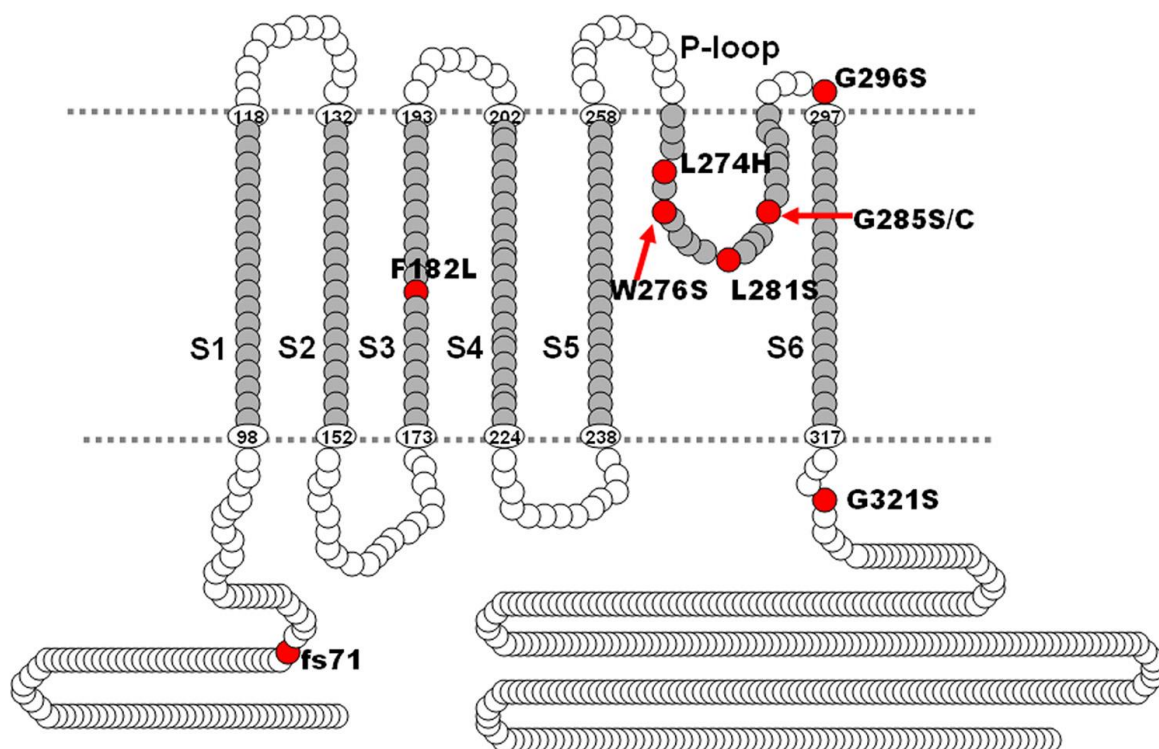
**При пациент DF210** (мъж на 43 годишна възраст) се откри в хетерозиготно състояние варианта с.853G>A (p.Gly285Ser) в екзон 6 на гена *KCNQ4* (NM\_004700.3, NP\_004691.2).



Фигура 58. Родословно дърво на пробанд DF210.

Известно е, че йонните канали играят важна роля в сигналната трансдукция и в регулацията на йонното съдържание в интра- и екстрацелуларните течности. Мутации в някои йонни канали се свързват с развитието на глухота [Kubisch C. et al, 1999]. *KCNQ4* е всъщност един  $K^+$  канал (hKv7.4), който се образува от хомомерни канали, транспортиращи йони главно във вътрешното ухо [Bal M. Et al, 2008]. Мутации в *KCNQ4* се свързват с развитието на автозомно доминантна

слухова загуба [Kim HJ. et al 2011; Wang H. et al, 2014]. Част от патогенните мутации открити в този ген са представени на Фигура 59.



Фигура 59. Схематично представяне на белтъчната структура на hKv7.4. Част от известните мутации са показани с червени стрелки. Номерирането на аминокиселините и шесте трансмембрални домена S1–S6 и поровия регион са базирани на UniProtKB/Swiss-Prot P56696 [Kim HJ. et al 2011]

Откритият вариант с.853G>A (p.Gly285Ser) при DF210 е известен патогенен вариант, чиято позиция се вижда на Фигура 3. Тази мутация засяга първият глицинов остатък в GYG аминокиселинната последователност в пората. Глициновият остатък е високо консервативен сред различните класове K<sup>+</sup> канали при различни видове. Кристалната структура на *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> канала показва че GYG последователността се локализира в най-тесната част на пората. Мутации в тези аминокиселини води до нарушаване на селективността на филтрация и в повечето случаи нарушават напълно функциите на канала [Kubisch C. et al, 1999].

Резултати от сегрегационния анализ: При семейство №3, за да се определи патогенността на вариантите в *MYO1C* и *GABRR2* открити при DF139 проведохме

директно секвениране. Използваните двойки праймери за амплификация и секвениране са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Използвани праймерни двойки за MYO1C и GABRR2

Наименование на праймера	Последователност 5' към 3'	Дължина в bp
MYO1C_ex12_F	CCCTCTCCTGGTCCTGTG	18
MYO1C_ex12_R	GCTCTGCCCTGTCTACTCA	21
GABRR2_ex7_F	CTCAGATGGAACCTCATTGG	20
GABRR2_ex7_R	AAATAACCACCTACCACACCTT	23

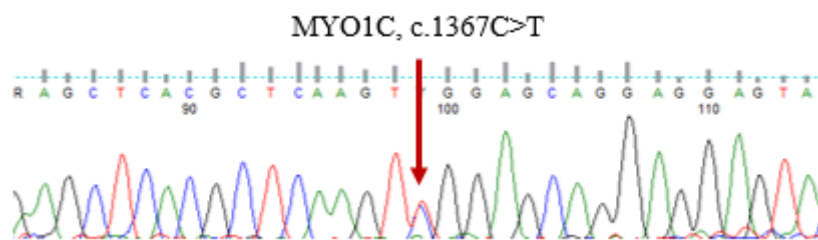
Носителството на вариантите при DF139 открити чрез новогенерационно секвениране се потвърди при проведеното директно секвениране.

Генотипите, установени при директното секвениране на членовете на семейството, са представени в Таблица 6.

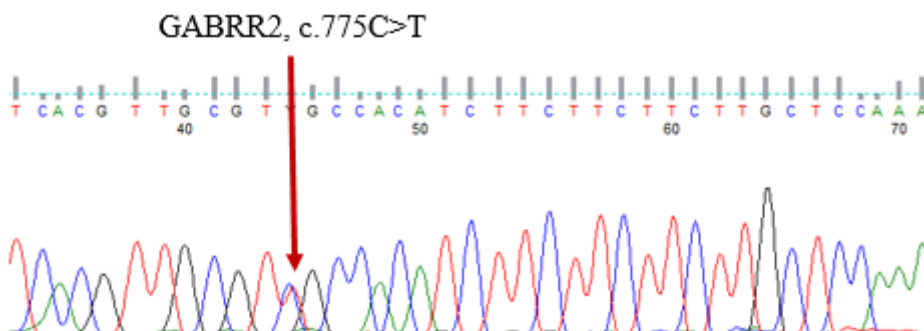
Таблица 6. Генотипи установени при директното секвениране на екзон 12 на гена MYO1C и екзон 7 на гена GABRR2 при семейство №3

Член от семейството	Генотип за MYO1C с.1367C>T	Генотип за GABRR2 с.775C>T
DF139 пробанд	C/T	C/T
DF137	C/C	C/C
DF138	C/C	C/C
DF140	C/T	C/C
DF141	C/C	C/C
DF202	C/C	C/C
DF203	C/C	C/C

Вариантът в *MYO1C* открит в DF139 е унаследен от неговата майка (DF140), която също е с намален слух. Вариантът в *GABRR2* не се открива в никой от секвенираните родственици. Тъй като вариантите и в двата гена не се откриват в засегнатите родственици на изследвания пробанд, вероятно те не се причина за възникналата слухова загуба в семейството. В това семейство възможна причина за слуховата загуба е дупликацията в *OTOA*. Но това трябва да се потвърди първоначално в пробанда с друг метод и след това да се изследват родствениците му за носителство.



Фигура 60. Част от електрофореграма на екзон 12 на MYO1C при пациент DF139, показваща хетерозиготното носителство на вариант c.1367C>T



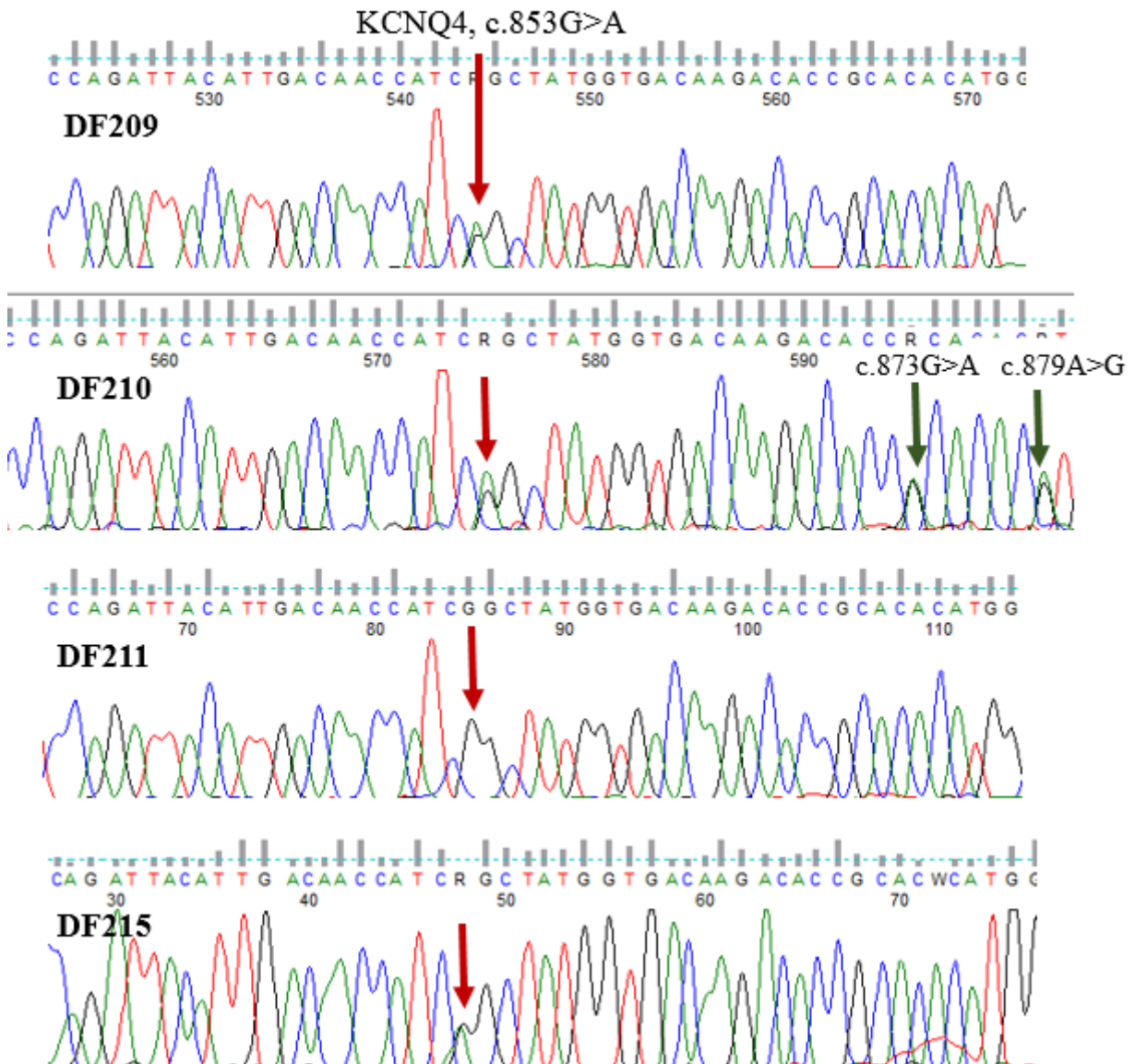
Фигура 61. Част от електрофореграма на екзон 7 на GABRR2 при пациент DF139, показваща хетерозиготното носителство на вариант c.775C>T

При семейство №5 мутацията в *KCNQ4* c.853G>A (p.Gly285Ser) бе потвърдена чрез директно секвениране в изследвания пробанд DF210 и също така носителството и бе определено в дъщерята и майката на пробанда. Използваните праймери са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Последователност и дължина на праймерите използвани за анализ на мутацията открита в екзон 6 на *KCNQ4*.

Наименование на праймера	Последователност 5' към 3'	Дължина в bp
KCNQ4_ex6_F	CCCAACAAGCCGTAGGTG	18
KCNQ4_ex7_R	GACACACCAGTGCAGTCACA	20

Вариантът в *KCNQ4* се открива в хетерозиготно състояние в дъщерята и майката на пробанда, при които е установено намаление на слуха. Вариантът не се открива в съпругата на пробанда.



Фигура 62. Електрофореграми, показващи част от секвенцията на екзон 6 на гена KCNQ4 при семейство №5. Вариантите показани със зелени стрелки при DF210 са синонимни: с.873G>A (p.Pro291Pro) и с.879A>G (p.Thr293Thr). С червени стрелки е показан варианта с.853 G>A.

Благодарение на петте проекта, финансирани от МУ София се създаде ДНК биобанка в Центъра по молекула медицина на пациенти с несиндрома слухова загуба, която в бъдеще може да бъде допълнително разширена.

## 5. Дискусия

При прегледа на публикуваната литература може да се обобщи, че това е първият обособен клиничен подход за комплексно диагностициране и лечение на наследствената слухова загуба в България, който включва първо клиничното, а след това и генетичното поставяне на диагнозата, проследяване и анализиране на резултатите от хирургичното лечение. Изследваните 192 пациента са деца и възрастни с доказана НСЗС -178 от тях, и 14 пациента, със социално адекватен слух. Последните са родственици на лицата с доказана НСЗС и тяхно ДНК е изследвано при търсене на генетични мутации повлияващи слуха. При шестима от тях е открита мутация в Sx26.

Изследването на слуха след въвеждането на неонаталният слухов скрининг започна още в неонаталните отделения. Точността на ОАЕ по международни данни е 90% . При липса на регистрирани ОАЕ, каквато е отчетена в 94% от нашите случаи се пристъпва към провеждането на ССЕР. При 40.1% от изследваните деца (n = 77) ССЕР не се регистрират- т.е. те са с глухота.

Събирането на пациенти започва 2009 година и продължава до 2018 година в рамките на няколко проекта. Изследани са лица от български, турски, ромски произход и такива от смесени бракове.

По литературни данни и като обобщение на нашия опит с изследваната група пациенти с НСЗС, генетичното тестване трябва да започне с търсене на мутации в GJB2 гена (мутации в Sx26 протеина) като установена най-честа причина за глухота сред



пациентите и в българската популация. С търсене на мутации в Сх26 започна скринирането и на пациентите, участващи в проучването. Етническият произход играе важна роля в разпространението и честотата на мутациите, както става ясно от получените резултати, цитирани в литературния обзор, при изследваните мутации в евреите ашкенази (167 delT), азиатците (23delC), кавказците (35delG). Тези наблюдения се потвърждават и от получените от нас резултати. В българската популация при изследвания ромски етнос с НСЗС се наблюдава висока честота на мутацията p.W24X в хомозиготно състояние. В световната литература висока честота на тази мутация е описана при индийците. При изследване сред бразилци [243] тази мутация не е регистрирана. Мутацията с.35delG, описана с висока честота при кавказците, се среща с най-висока честота сред изследваните българи с НСЗС, а освен това беше открита при изследваните турци и при пациентите от смесени бракове (с турски, български, сръбски произход). Изводът, който следва да бъде направен е, че етническият произход на изследвания пациент трябва да бъде фактор при вземане на решение за клиничния подход за диагностициране и определяне най-подходящият тип генетичен анализ, който да бъде направен. Генното секвениране, каквото сме използвали и ние в търсенето на генетични мутации в гените, отговорни за слуха, е най-изчерпателния и категоричен метод, тъй като дава възможност да бъдат открити почти всички точкови мутации, както и малки делеции и инсерции. Сравнително малкият размер на GJB2 гена го прави подходящ за този подход. В сравнение с проучените публикации, където посочват честота на мутациите в GJB2 гена от 18 до 40%, при нас честотата се изчисли на 43.75% като в 29.69% от случаите се касае за мутантни алели в хомозиготно състояние и в 14.06% от случаите - в хетерозиготно състояние.

По литературни данни при пациентите с мутация в Сх26 слуховата загуба започва прелингвално. Резултатите от проведеното проучване демонстрира доминиране на прелингвалната слухова загуба в случаите с установена мутация в GJB2 гена близо пет пъти над постлингвалната. При пациентите с открита мутация в други гени, различни от конексиновите, се наблюдава изцяло постлингвална глухота.

В световен мащаб втора стъпка при подхода за диагностициране на наследствена слухова загуба е търсенето на мутации в GJB6 гена, в случаите когато не се намери хомозиготна мутация в GJB2 гена. И при нашите пациенти, взели участие в проучването, подходът беше такъв - при липса на мутация в Сх26 или при наличието на такава в хетерозиготно състояние, скрининга продължи с търсенето на мутации в

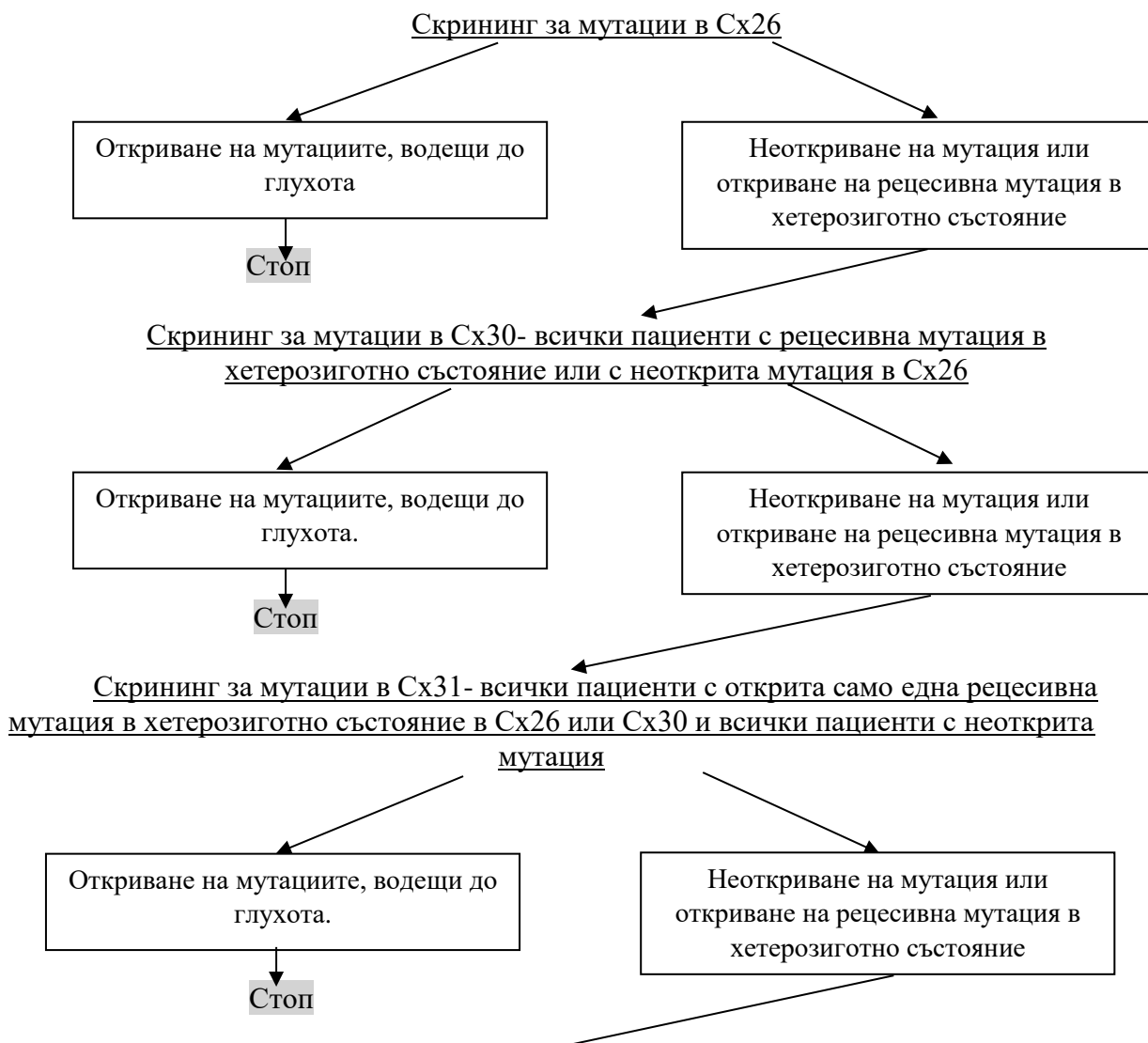
последователно в GJB6 и GJB3 гените, кодиращи съответно конексин 30 и конексин 31 протеина.

При пряко взаимодействие между Cx26 и Cx30 протеините, се съобщава за засягане функцията на каналите (gap junction channels) [237]. От проведените проучвания за ко-експресия става ясно, че Cx26 и Cx30 олигомеризират, за да образуват хетеромерни съединения (connexons) и някои мутации оказват доминантно отрицателен ефект върху двата конексина. Проучвания също съобщават, че взаимодействието между Cx30 и Cx26 модифицира пропускливостта на клетките. Съобщената честота при някои проучвания [238] за дигенни мутации с глухота в Cx30 е между 15.9% (в USA) и 67% (Испания). Сред изследваните от нас 192 пациента не се попадна на мутация в гена, кодиращ Cx30 протеина, което не е необичайно предвид ниската ѝ честота сред населението – 0.65% [238]. В проучване проведено сред 303 индийци [244] също не е открита мутация в GJB6.

Мутации в Cx31 също не бяха открити. По литературни данни те могат да доведат както до доминантна, така и до рецесивна форма на несиндромна слухова загуба, характеризираща се с късно начало, с умерена слухова загуба, засягаща предимно високите честоти [246]. Функционалните анализи показват, че някои мутации, свързани с глухотата (например p.V27M, p.V43M и p.V84I) може да се насочи към плазмената мембрана, за да образува междинни плаки, но губи пропускливост за багрила и йони. Съобщава се, че мутация Cx31 p.V174M не може да се насочва към плазмената мембрана и се натрупват в лизозомите в мутант-трансфектираните HeLa клетки [247]. Мутантът може също да понижи Cx26 /WT вътреклетъчния трафик към плазмената мембрана, но не повлиява трафика на Cx31/ WT.

Като последваща стъпка при диагностицирането на наследствената слухова загуба въведохме използването на таргетно новогенерационно секвениране. Подбрахме семейства, в които НСЗС имат няколко от членовете в няколко поколения като целта беше търсене на рядко срещани мутации в гените, кодиращи слуха.

### Алгоритъм на генетичния скрининг:



Таргетно новогенерационно секвениране- при пациенти, при които от скрининга за често срещани мутации (в Сх26, Сх30, Сх 31) водещи до глухота не е открита мутация.

Фигура 63. Алгоритъм на генетичен скрининг.

Голям брой публикации установят корелация между пациентите, носители на мутации в Сх26 в хомозиготно състояние и наличието на пълна слухова загуба, появила се прелингвално. Нашите резултати потвърждават това- установява се статистическа значимост между степента на слухова загуба и наличието на хомозиготни мутации на Сх26 протеина.

Анамнестично 8.85% от пациентите са съобщили за употреба на ототоксични медикаменти преди поява на увреден слух. При статистическата обработка на данните се получи статистически значими резултати, показващи че медикаментозната терапия не повлиява степента на слухова загуба.

Установихме статистическа значимост между наличието на мутации в гените, отговорни за слуха, и началото на слуховата увреда. Пациентите, при които не се установиха мутации в гените, отговорни за намаляването на слуха, са приблизително равномерно разпределени между прелингвалната (в 30.9% от случаите) и постлингвалната (в 35.39% от случаите) слухова загуба.

Откри се статистическа значимост между генетичната увреда и началото на слуховата загуба ( $p < 0.05$ ) сравнявайки наличието на мутации в гените отговорни за слуха и началото на слуховата увреда. При пациенти със слухова загуба, в резултат на мутация, доминира прелингвалната (27.53% от случаите) над послингвалната (в 6.18% от случаите) глухота. При пациентите, при които няма установени мутации, разпределението между прелингвално и постлингвално начало на слуховата увреда е приблизително еднакво.

В изследваната от нас група с НСЗС в 31.77% от случаите е установена причината за глухотата- открита е генетичната причина- като за 29.69% ( $n= 57$ ) от случаите се касае за мутация в Sx26 (в хомозиготно състояние), което отговаря на публикуваните данни в световната литература за мутации в Sx26 от 18 до 40% от случаите при пациенти с НСЗС. В останалите 2.08% от случаите се откриха редки мутации, отговорни за глухотата при пациентите.

При 14.06% от случаите се попадна на мутация в гена, кодиращ Sx26 , в хетерозиготно състояние. Тази находка сама по себе си не може да обясни изневидео на увреден слух.

При 54.17% ( $n = 104$ ) от пациентите слуховата загуба започва прелингвално. При прелингвалната слухова загуба прогресия сред изследваните пациенти се открива едва в 7.39%. Това е очаквано нисък процент, тъй като при 40% от изследваните ( $n = 77$ ) деца ССЕР не се регистрират. 50% от изследваните пациенти са на достатъчно голям възраст, за да бъде изследван слухът при тях с аудиометрия.

От изследваната група пациенти в 40% от случаите са поставени кохлеарни импланти- при 29% едностранно, а при 14% двустранно. От представената статистика става ясно,

че КИ са поставяни с най- висока честота сред лицата между 24 и 36. навършен месец . От сравнението сред КИ изследвани пациенти между тези с открита генетична мутация и тези, при които не се откри генетична мутация, не се установи статистически значима разлика във възрастта на провеждане на хирургично лечение. Литературните данни са категорични за наличието на по- добри резултати след кохлеоимплантация при пациенти с налична мутация в Sx26 и поставяне на имплант до навършване на 30.месец.

Много от кохлеоимплантираните пациенти с прелингвална слухова загуба постигат голяма точност в речевото възприятие и развиват почти нормални езикови умения. Един от използваните от нас тестове за оценка на слуховото възприятие - Lip теста- показва плавно подобряване на резултатите през първата година и достигане на максимално ниво на 18. месец. По литературни данни се наблюдава бързо темпо на нарастване на резултатите и достигане на максимално ниво през 12.месец [242]. Lip теста е предназначен за деца над две годишна възраст като в изследваната от нас група участват и деца под 24 месеца (фигура 32).

МТРЗ теста, предназначен за разпознаване на сричковата структура на думата, също е препоръчан за провеждане при деца над две годишна възраст. Близки до максималните резултати се постигат в изследваната група на 6.месец от кохлеоимплантацията, а максимални- на 18.месец. По литературни данни максимални резултати са постигнати на 12.месец след поставяне на КИ [240, 241]. Нашите резултати са близки с тези, публикувани от други автори. В литературата се посочва , че деца, които са КИ по- рано, се развиват по- добре езиково, отколкото деца, имплантирани в по- късна възраст. От фигура 32 е видно, че сред изследваните КИ пациенти, възрастта, в която са поставени най- много КИ е между 24 и 36 месеца. Fryauf-Bertschy H и съавтори O'Donoghue GM и съавтори [240,241] отбелязват, че възрастта на пациента по време на кохлеоимплантацията е основен фактор, влияещ върху езиковото развитие. Според Hammes и съавтори (2002) различия в уменията за идентифициране на думи и развитието на езика при деца с импланти, се срещат до 30.месечна възраст на КИ. Те съобщават, че деца, получили КИ след навършване на 30 месеца, имат по- малко възможности и забавят развитието на слуховите и словестните умения, в сравнение с деца, имплантирани преди да навършат 30 месечна възраст. Уменията за слушане, оценени с LiP теста, значително се увеличават при КИ и след това Sainz и съавтори

[242] отбелязват, че това подобрение се забелязва още през първият месец на използване на КИ, което съответства и на нашите резултати.

GASP тестът, оценяващ способността за разбиране на прости въпроси, показва по-бавно постигане на максимални резултати като нивото на покачване продължава до 48.месец. Резултатите при отделните пациенти за GASP теста са твърде вариращи. Тестът е с по-голяма сложност и е предназначен за обследване на деца навършили 4 годишна възраст. Това е една от възможните причини за забавеното достигане на максималните резултати. Представихме резултатите след дванайстият постоперативен месец.

По сходна причина са представени резултатите след дванайстият оперативен месец и от теста, оценяващ способността за слухово възприятие на непознати изречения (SLS). Тестът е предназначен за деца над пет годишна възраст и градира по трудност спрямо предходните тестове.

При сравняване резултатите от слуховата рехабилитация се получиха статистически значими резултати, показващи, че пациентите с мутация, водеща до загуба на слуха се справят по-добре с различаването на звуци, което отговаря на резултатите, публикувани в литературата по темата ( $p = 0.014$ ). Така получените резултати се запазват при провеждането на LiP теста от момента на първата настройка във времето ( $p = 0.017$  – за 24.месец от КИ).

По-добри резултати при пациенти с открита мутация в Sx26 протеина спрямо пациентите без мутации се регистрират и след провеждане на теста за възприемане сричковата структура на думата ( $p = 0.019$ ), както и при теста за възприемане на непознати изречения (SLS) на 12.месец от имплантацията ( $p = 0.028$ ) и 24.месец ( $p = 0.038$ ) и на 48.месец ( $p = 0.006$ ).

Интересен, но не неочакван е резултатът при сравнение на резултатите от теста за разбиране на прости въпроси (GASP) на 3, 6 и 12.месец между имплантирани едностарно и двустранно пациенти. Пациентите с два поставени КИ се справят по-добре с тестовете ( $p = 0.056$  – на 6ти месец;  $p = 0.04$  – на 12ти месец).

След провеждането на таргетно новогенерационно секвениране сред подобрените семейства, при всички от които се предполагаше наличие на генетична увреда в гените,

отговорни за слуха, се получиха интересни резултати . При семейства №1, №2 и №4 не се установиха известни мутации.

В семейство №3 при изследваният пробанд с помощта на CNV анализът се откри при изследваната пациентка дупликация на 51 базови двойки в ОТОА гена (16:21679026-21679076), засягащ екзон 3 и частично интрон 1-2 и интрон 2-3. Установено е, че CNV се свързват все повече с развитието на несиндромна слухова загуба (Sloan-Heggen SM. et al, 2016; Shearer AE. Et al, 2014). Shearer и съавтори осъществяват CNV анализ на 686 пациента със слухова загуба. Установяват че CNV най-често се откриват в (73% от откритите CNVs) и в ОТОА (13%). Както дупликации, така и делеции в ОТОА се свързват с клиничен фенотип при автозомно рецесивна несиндромна глухота [Shearer AE. Et al, 2014].

При семейство №5 замяната p.Gly285Ser е мутация, водеща до загуба на функции, а така също има и силно доминантно негативен ефект върху дивия тип KCNQ4 канали [Mencía A. Et al. 2008; Gao Y. et al, 2013]. Доказано е, че в ооцити на Xenopus мутацията води до липса на K<sup>+</sup> потоци [Kubisch C. et al, 1999]. Дисфункционализирането на KCNQ4 вероятно се свързва с дегенеративни процеси, каквито са наблюдавани и при много други генетични заболявания, засягащи нервната система. Поради тази причина слуховата загуба при пациентите с мутации в този ген прогресира. При тях унаследяването е автозомно доминантно [Jentsch TJ. 2000].

Докладвани са и случаи на автозомно рецесивно унаследяване на носители на мутации в KCNQ4. Wasano K и съавтори съобщават семейство с автозомно рецесивна форма на несиндромна глухота, при които се открива в хомозиготно състояние мутацията с.1044\_1051del8. Пробандът е диагностициран с тежка слухова загуба , която е вродена или възникнала в много ранна детска възраст. Дъщерята на пробанда е хетерозиготен носител на мутацията и при нея не се наблюдавала намаление на слуха [Wasano K. et al, 2015].

Откритият вариант в **KCNQ4** косегрегира със заболяването в семейството и обяснява възникналата слухова загуба. Мутации в този ген се свързват с прогресивна слухова загуба, възникваща постлингвистично (след проговаряне). При дъщеричката на пробанда намалението на слуха е диагностицирано на 3 месечна възраст. До този момент в литературата няма описани случаи на носители на мутацията с.853G>A (p.Gly285Ser), които да са с вродено намаление на слуха. Възможно е при това

момиченце да има наличие на вариант в друг ген или същия ген, който да отежнява клиниката.

Причините за неоткриването на генетичният фактор на възникналата слухова загуба при семейства №1, №2 и №4 могат да са много различни. Установено е, че много заболявания често не се дължат на чести, нито на редки варианти, а по-скоро като комбинация от варианти. До този момент това не е установено при генетичните форми на несиндромна глухота. Епигенетичните промени са свързани с развитието на множество заболявания. При глухотата има много малко епигенетични проучвания. Освен епигенетичните механизми мутации в цис регулаторни елементи също имат важна роля в регулацията на генната експресия. До този момент не са открити всички гени, водещи до глухота. Не са изяснени напълно структурните, мутационните и епигенетичните промени свързани с развитието на глухота [Vona B. et al, 2015].

Таблица 8.Обобщаващи данни за откритите мутации, водещи до глухота и за КИ пациенти с установена мутация.

Гени, в които са открити мутации	Вид мутация/установени генотипове	КИ	Брой пациенти	Процент от всички пациенти	Протичане	Степен на намаление на слуха
1.GJB2	<i>c.35delG/c.35delG</i>	25	2	1.04%	Без прогресия	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
			6	3.11%	Без прогресия	тежка слухова загуба ( 71- 95 dB HL)
			29	15.03%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>c.35delG/WT</i>	7	1	0.52%	Без прогресия	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
			1	0.52%	Без прогресия	тежка слухова загуба ( 71- 95 dB HL)
			12	6.22%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>p.Leu90Pro/p.Ile121Asn</i>	1	1	0.52%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>p.Arg127His/WT</i>	1	2	1.04%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>c.35delG/c.312del14/WT</i>	1	1	0.52%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>p.W24X/WT</i>	1	1	0.52%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>p.W24X/p.W24X</i>	5	4	2.07%	Без прогресия	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
			2	1.04%	Без прогресия	тежка слухова загуба ( 71- 95 dB HL)
10			5.18%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)	



	<i>p.Val27Ile/WT</i>	0	1	0.52%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
	<i>p.Val37Ile/WT</i>	0	1	0.52%	Без прогресия	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
	<i>p.Val153Ile/WT</i>	1	1	0.52%	С прогресия	тежка слухова загуба (71- 95 dB HL)
	<i>c.35delG/p.W24X</i>	1	1	0.52%	Без прогресия	пълна загуба на слуха (> 95 dB)
2.KCNQ4	<i>c.853G&gt;A (p.Gly285Ser)</i>	0	3	1.55%	Пргресираща слухова загуба	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
3.ОТОА	дупликация на 51 базови двойки, засягащ екзон 3 и частично интрон 1-2 и интрон 2-3	0	1	0.52%	Пргресираща слухова загуба	средна степен загуба на слуха (41-70 dB HL)
<b>Общо</b>		<b>43</b>	<b>78</b>	<b>41.48%</b>		

Най- честата мутация сред българската популация е *c.35delG*, открита в 43.75% от изследваните пациенти с НСЗС- 29.69% в хомозиготно състояние и в 14.06% от случаите в хетерозиготно състояние. Открита е при пациенти с български и турски произход, но не се открива при пациенти от ромски произход. Честотата на носителството на различните мутации в GJB2 гена се различава в светловен мащаб. Мутациите, наблюдавани в изследваните пациенти са следите: *c.35delG*, *p.W24X*, *p.Leu90Pro/p.Ile121Asn*, *p.Arg127His*, *c.35delG/c.312del14*, *p.Val27Ile*, *p.Val37Ile*, *p.Val153Ile*.

Откриха се редки мутации в резултат на проведеното новогенерационно секвениране в KCNQ4 и в ОТОА гена.

## 6. Заключение

В заключение- поставянето на диагноза „невросензорна слухова загуба“ не затруднява медицинските специалисти, но има своите особености както при децата, така и при възрастните. След въвеждането на универсалния слухов скрининг за наличие на глухота започва да се мисли още в неонаталните отделения. Важна стъпка е насочването на детето към тесен специалист – аудиолог- при регистриране на отрицателни ОАЕ. Следваща стъпка е изследването на ССЕР.

Глухотата е единственият сензорен дефект, който успешно може да бъде лекуван, дори когато се отнася за пълна глухота. Кохлеарната имплантация оказва положителен ефект

в областта на възпроизвеждането и възприемането на реч. Постига се значителна положителна разлика в когнитивната способност и четенето, силно изразена при деца с открита GJB2 мутация, която води до изолирана увреда в кохлеата, без увреждане на VIII.ЧМН или ЦНС. След като се установи причината за слуховата загуба, лечение, каквото е кохлеарната имплантация, може значително да подобри комуникацията и качеството на живот на пациента.

## 7. Изводи

1. Генетичното тестване трябва да започне с търсене на мутации в GJB2 гена (мутации в Sx26 протеина) като установена най-честа причина за наследствена глухота сред пациентите и в българската популация.
2. Мутацията с.35delG в се среща с най-висока честота сред изследваните българи с НСЗС
3. Етническият произход играе важна роля в разпространението и честотата на мутациите- в българската популация при ромският етнос с НСЗС се наблюдава висока честота на мутацията р.W24W в хомозиготно състояние.
4. Доминиране на прелингвалната слухова загуба в случаите с установена мутация в GJB2 гена близо пет пъти над постлингвалната.
5. При пациентите с открита мутация в други гени, различни от конексиновите, се наблюдава изцяло постлингвална глухота.
6. Втора стъпка при подхода за диагностициране на наследствена слухова загуба е търсенето на мутации в GJB6 гена.
7. Сред изследваните от нас 192 пациента не се попадна на мутация в гена, кодиращ Sx30 протеина и Sx31.
8. Установи се статистическа значимост между генетичната увреда и началото на слуховата загуба ( $p < 0.05$ ) - при пациенти със слухова загуба, в резултат на мутация, доминира прелингвалната (27.53% от случаите) над постлингвалната (в 6.18% от случаите) глухота.
9. В 31.77% от случаите се установи причината за глухотата- в 29.69% (n= 57) от случаите се касае за мутация в Sx26 (в хомозиготно състояние), а в

останалите 2.08% от случаите се откриха редки мутации, отговорни за глухотата при изследваните пациентите.

10. В 40% от е извършено хирургично лечение – поставени са кохлеарни импланти- при 29% едностранно, а при 14% двустранно.
11. Максимални резултати при провеждане на LiP теста са постигнати на 18. постоперативен месец.
12. Възрастта, в която са поставени най- много КИ, е между 24 и 36 месеца.
13. Установиха се статистически значими резултати от слуховата рехабилитация, показващи, че пациентите с мутация, водеща до загуба на слуха се справят по- добре с различаването на звуци.
14. Пациентите с два поставени КИ се справят по- добре с тестовете, изследващи слуховото възприятие ( $p = 0.056$  – на 6ти месец;  $p = 0.04$  – на 12ти месец), в сравнение с едностранно имплантираните.
15. Устави се рядка генетична мутация в при пациентка от семейство №3- дупликация на 51 базови двойки в ОТОА гена (16:21679026-21679076), засягащ екзон 3 и частично интрон 1-2 и интрон 2-3 свързвана с клиничен фенотип при автозомно рецесивна несиндромна глухота.
16. Установи се рядка генетична мутация в резултат на провеждане на новогенерационно секвениране, използвайки генен панел, при семейство №5 в гена KCNQ4 с автозомно доминантно унаследяване.

## 8. Приноси

1. Първият обособен клиничен подход за комплексно диагностициране и лечение на наследствената слухова загуба в България.
2. Въведохме използването на таргетно новогенерационно секвениране при подбрани семейства, в които има фамилна обремененост за НСЗС, търсейки рядко срещани мутации в гените, кодиращи слуха.
3. Създаде се биобанка в Център по молекулярна медицина, където се съхраняват проби, с цел да се проследи генетичните причини за наследствената слухова загуба.

4. За първи път у нас се прилагат и интерпретират напълно обективни методи свързани с генетичните причини за глухата и резултатите от кохлеарната имплантация.
5. За първи път у нас е изработена оптимална схема за генетично изследване на пациенти с вродена прелингвална и постлингвална глухота.
6. За първи път се направиха генетични изследвания, с които се доказва най-разпространената генетична причина за наследствената глухота.
7. За първи път в страната обективно се разглежда причината за разликата в резултатите от кохлеарната имплантация при деца, на базата на генетичните резултати.
8. За първи път в страната се прави анализ на говорното развитие при едностранна и двустранна кохлеарна имплантация.

#### Библиография:

1. NIOSH. Centers for disease Control and Prevention – National Institute for Occupational Safety and Health. Available at: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/noise>. Accessed November 3, 2011.
2. Dror A, Avraham K. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet* 2009;43:411–37.
3. Bindu LH, Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual nonsyndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol* 2008;47:702–7.
4. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview, GeneReviews® [Internet]. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
5. Изследване на слуха при новородени чрез ОАЕ. Българско национално списание по оторинология. Д.Попова,Й.Спиридонова,С.Върбанова
6. Pickles, J.O., Comis, S.D., & Osborne, M.P. (1984). Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Research*, 15, 103-112.
7. Kiang NY-S., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C., & Ryugo, D.K. (1982) Hair cell innervation by spiral ganglion cell in adult cats. *Science*, 217, 175-177.
8. Bron, M.C., Berglund, A.M., Kiang, N.Y.-S. & Ryugo, D.K. (1988). Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 227, 581-590.
9. Warr, B., & Guinan, J.J. (1979). Efferent innervation of the organ of Corti: Two separate systems. *Brain Research*, 173, 152-155.
10. Ryan, A.F., Schwartz, I.R., Helfert, R.H., Keithley, E., & Wang, Z.X. (1987). Selective retrograde labeling of lateral olivocochlear neurons in brainstem based on preferential uptake of 3H-D-aspartic acid in the cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, 255, 606-616.

11. Ryan, A.F., Scharz, I.R., Keithley, E.M., & Wang, Z.X. (1992). Selective retrograde transport of nipecotic acid identifies the cells of origin of endings which preferentially accumulate GABA. . *Journal of Comparative Neurology* , 326, 337-346.
12. Ryan, A.F., & Dallos, P. (1975). Absence of cochlear outer hair cells: Effect on behavioural auditory thresholds. *Nature*, 253, 44-46.
13. Russell, I.J., Richardson, G.P., & Cody, A.R. (1986). Mechanosensitivity of mammalian auditory hair cells in vitro. *Nature*, 321, 517-519.
14. Dallos, P. (1992). The active cochlea. *Journal of Neuroscience*, 12, 4575-4585.
15. Dallos, P., & Wang, C-Y. (1974). Bioelectric correlates of kanamycin intoxication. *Audiology*, 13, 277-89.
16. Ryan, A.F., and Dallos, P. (1996). The physiology of the cochlea. In J. Northern (Ed.), *Hearing disorders* (3rd ed., pp 15-31). Boston: Allyn and Bacon.
17. Reuter, G., Gitter, A.H., Thurm, U., & Zenner, H.P. (1992). High frequency radial movements of the reticular lamina induced by outer hair cell motility. *Hearing Research*, 60, 236-246.
18. Evans, B. (1990). Fatal contraction: Ultrastructural and electromechanical changes in outer hair cells following transmembranous electrical stimulation. *Hearing Research*, 45, 265-282.
19. Santos-Sacchi, J. (1993). Harmonics of outer hair cell motility. *Biophysics Journal*, 65, 2217-2227.
20. Santos-Sacchi, J. (1991). Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance. *Journal of Neuroscience*, 11, 3096-3110.
21. Iwasa, K.H., & Chadwick, R.S. (1992). Elasticity and force generation of cochlear outer hair cells. *Journal of the Acoustical Society of America*, 92, 3169-3173.
22. Mammano, F., & Ashmore, J.F. (1993). Reverse transduction measured in the isolated cochlea by laser Michaelson interferometry. *Nature*, 365, 838-841.
23. Dallos, P. (1983). Some electrical circuit properties of the organ of Corti: I. Analysis without reactive elements. *Hearing Research*, 12, 89-119.
24. Bron, M.C. (1989). Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hearing Research*, 40, 93-110.
25. Liberman, M.C., & Bron, M.C. (1986). Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hearing Research*, 24, 17-36.
26. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
27. Davis A, Parving A. Towards appropriate epidemiology data on childhood hearing disability: a comparative European study of birth-cohorts 1982-1988. *J Audiol Med* 1994;3:35-47.
28. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993;46:486-91.
29. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996;14:385-91.
30. Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 1989;18:911-7.
31. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM Jr, eds. Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford monographs on medical genetics. No. 28. New York: Oxford University Press, 1995:337-9.
32. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997;60:758-64.
33. Van Camp G, Willems PJ, Kunst H, Marres H, Smith RJH. Recent developments in genetic hearing impairment. *J Audiol Med* 1998;7:120-33.
34. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998;7:1589-97.
35. Martini A, Read A, Stephens D, eds. Genetics and hearing impairment. London: Whurr, 1996
36. The Antwerp homepage on hereditary hearing loss. (See <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>.) (See NAPS document no. 05541 for 7 pages, c/o Microfiche Publications, 248 Hempstead Tpk., West Hempstead, NY 11552.)
37. The Boys Town Research Registry for hereditary hearing loss. (See <http://www.boystown.org/hhrr>.) (See NAPS document no. 05541 for 51 pages, c/o Microfiche Publications, 248 Hempstead Tpk., West Hempstead, NY 11552.)
38. The HEAR homepage. (See <http://hear.unife.it>.) (See NAPS document no. 05541 for 8 pages, c/o Microfiche Publications, 248 Hempstead Tpk., West Hempstead, NY 11552.)

39. De Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995;267:685-8.
40. De Kok YJ, Vossenaar ER, Cremers CW, et al. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. *Hum Mol Genet* 1996;5:1229-35.
41. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev* 1991;5:897-907
42. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995;374:60-1.
43. Weil D, Küssel P, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 1997;16:191-3.
44. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997;16:188-90
45. Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular internet: on-line with connexins. *Bioessays* 1996;18:709-18.
46. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84:381-8.
47. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997;6:1605-9.
48. Estivill X, Fortina P, Surrey S, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998;351:394-8.
49. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998;339:1500-5.
50. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998;62:792-9.
51. Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJH. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998;391:32
52. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 1998;393:319-20.
53. Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein b-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998;20:371-3. [Erratum, *Nat Genet* 1999;21:241.]
54. Richard G, Smith LE, Bailey RA, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet* 1998;20:366-9.
55. Coucke P, Van Camp G, Djoyodiharjo B, et al. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N Engl J Med* 1994;331:425-31.
56. Couke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, et al. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 1999;8:1321-8.
57. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999;96:437-46.
58. Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King M-C. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5181-4
59. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welch PL, Leon PE, King MC. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science* 1997;278:1315-8.
60. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997;17:1411-22.
61. Van Hauwe P, Everett LA, Coucke P, et al. Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:1099-104.
62. Coyle B, Reardon W, Herbrick J-A, et al. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:1105-12.
63. Reardon W, Trembath RC. Pendred syndrome. *J Med Genet* 1996;33:1037-40.
64. Phelps PD, Coffey RA, Trembath RC, et al. Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin Radiol* 1998;53:268-73.

65. Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G, Kimberling WJ. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* 1999;104:188-92.
66. Tong KA, Harnsberger HR, Dahlen RT, Carey JC, Ward K. Large vestibular aqueduct syndrome: a genetic disease? *AJR Am J Roentgenol* 1997;168:1097-101.
67. Li XC, Everett LA, Lalwani AK, et al. A mutation in PDS causes nonsyndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1998;18:215-7.
68. Greinwald JH Jr, Wayne S, Chen AH, et al. Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *Am J Med Genet* 1998;78:107-13.
69. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999;20:440-3.
70. Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP. The mouse tectorins: modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem* 1997;272:8791-801.
71. van Camp G, Coucke P, Balemans W, et al. Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15. *Hum Mol Genet* 1995;4:2159-63.
72. Huizing EH, van Bolhuis AH, Odenthal DW. Studies on progressive hereditary perceptible deafness in a family of 335 members. I. Genetical and general audiological results. *Acta Otolaryngol* 1966;61:35-41
73. Van Laer L, Huizing EH, Verstreken M, et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet* 1998;20:194-7.
74. Thompson DA, Weigel RJ. Characterization of a gene that is inversely correlated with estrogen receptor expression (ICERE-1) in breast carcinomas. *Eur J Biochem* 1998;252:169-77.
75. Khetarpal U, Schuknecht HF, Gacek RR, Holmes LB. Autosomal dominant sensorineural hearing loss: pedigrees, audiologic findings, and temporal bone findings in two kindreds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:1032-42.
76. Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB Jr, et al. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet* 1996;5:1047-50.
77. Robertson NG, Lu L, Heller S, et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 1998;20:299-303.
78. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI, et al. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999;8:1425-9.
79. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999;21:363-9.
80. Reardon W, Harding AE. Mitochondrial genetics and deafness. *J Audiol Med* 1995;4:40-51.
81. Jacobs HT. Mitochondrial deafness. *Ann Med* 1997;29:483-91.
82. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 1994;3:243-7.
83. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. *Am J Otolaryngol* 1995;16:403-8.
84. Seviour KB, Hatamochi A, Stewart IA, et al. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* 1998;75:179-85
85. Verhoeven K, Ensink RJH, Tiranti V, et al. Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNASer(UCN) gene. *Eur J Hum Genet* 1999;7:45-51.
86. Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* 1999;52:1905-8.
87. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993;4:289-94.
88. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1993;14:399-403.
89. Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999;20:151-6.

90. Maiko Miyagawa, Shin-Ya Nishio, and Shin-Ichi Usami: A Comprehensive Study on the Etiology of Patients Receiving Cochlear Implantation With Special Emphasis on Genetic Epidemiology. *Otol Neurotol*. 2016 Feb; 37(2): e126–e134. Published online 2016 Jan 13.
91. Eppsteiner RW, Shearer AE, Hildebrand MS, et al. Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: The spiral ganglion hypothesis. *Hear Res* 2012;292:51–8.
92. Usami S, Miyagawa M, Nishio SY, et al. Patients with CDH23 mutations and the 1555A>G mitochondrial mutation are good candidates for electric acoustic stimulation (EAS). *Acta Otolaryngol* 2012;132:377–84.
93. Miyagawa M, Nishio SY, Ikeda T, et al. Massively parallel DNA sequencing successfully identifies new causative mutations in deafness genes in patients with cochlear implantation and EAS. *PloS One* 2013;8:e75793.
94. Miyagawa M, Nishio SY, Hattori M, et al. Mutations in the MYO15A gene are a significant cause of nonsyndromic hearing loss: Massively parallel DNA sequencing-based analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):158S–68S.
95. Tsukada K, Ichinose A, Miyagawa M, et al. Detailed hearing and vestibular profiles in the patients with COCH mutations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):100S–10S.
96. Miyagawa M, Nishio SY, Sakurai Y, et al. The patients associated with TMPRSS3 mutations are good candidates for electric acoustic stimulation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):193S–204S.
97. Miyagawa M, Nishio SY, Ichinose A, et al. Mutational spectrum and clinical features of patients with ACTG1 mutations identified by massively parallel DNA sequencing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):84S–93S.
98. Miyagawa M, Nishio SY, Kumakawa K, et al. Massively parallel DNA sequencing successfully identified seven families with deafness-associated MYO6 mutations: The mutational spectrum and clinical characteristics. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):148S–57S.
99. Nishio SY, Usami S. Deafness gene variations in a 1120 non-syndromic hearing loss cohort: Molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 (Suppl 1):49S–60S.
100. Farrer LA, Grundfast KM, Amos J, Arnos KS, Asher JH, Beighton P, Diehl SR, Fex J, Foy C, Friedman TB, et al. Waardenburg syndrome (WS) type I is caused by defects at multiple loci, one of which is near ALPP on chromosome 2: First report of the WS consortium
101. Liu XZ, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type II: phenotypic findings and diagnostic criteria
102. Newton VE. Clinical features of the Waardenburg syndromes
103. Madden C, Halsted MJ, Hopkin RJ, Choo DI, Benton C, Greinwald JH Jr. Temporal bone abnormalities associated with hearing loss in Waardenburg syndrome
104. Merchant SN, McKenna MJ, Baldwin CT, Milunsky A, Nadol JB Jr. Otopathology in a case of type I Waardenburg's syndrome
105. Gregory-Evans K, Bhattacharya SS. Genetic blindness: current concepts in the pathogenesis of human outer retinal dystrophies
106. Möller CG, Kimberling WJ, Davenport SL, Priluck I, White V, Biscone-Halterman K, Odqvist LM, Brookhouser PE, Lund G, Grissom TJ. Usher syndrome: an otoneurologic study
107. Damen GW, Pennings RJ, Snik AF, Mylanus EA. Quality of life and cochlear implantation in Usher syndrome type
108. Pennings RJ, Damen GW, Snik AF, Hoefsloot L, Cremers CW, Mylanus EA. Audiologic performance and benefit of cochlear implantation in Usher syndrome type I.
109. Liu XZ, Angeli SI, Rajput K, Yan D, Hodges AV, Eshraghi A, Telischi FF, Balkany TJ. Cochlear implantation in individuals with Usher type 1 syndrome
110. Zheng QY, Yan D, Ouyang XM, Du LL, Yu H, Chang B, Johnson KR, Liu XZ. Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans
111. Bonnet C, Grati M, Marlin S, Levilliers J, Hardelin JP, Parodi M, Niasme-Grare M, Zelenika D, Délépine M, Feldmann D, Jonard L, El-Amraoui A, Weil D, Delobel B, Vincent C, Dollfus H, Eliot MM, David A, Calais C, Vigneron J, Montaut-Verient B, Bonneau D, Dubin J, Thauvin C, Duvallard A, Francannet C, Mom T, Lacombe D, Duriez F, Drouin-Garraud V, Thuillier-Obstoy MF, Sigaudy S, Frances AM, Collignon P, Challe G, Couderc R, Lathrop M, Sahel JA, Weissenbach J, Petit C,



- Denoyelle F. Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis
112. Vozzi D, Aaspöllu A, Athanasakis E, Berto A, Fabretto A, Licastro D, KülM M, Testa F, Trevisi P, Vahter M, Ziviello C, Martini A, Simonelli F, Banfi S, Gasparini P. Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy
113. Yoshimura H, Iwasaki S, Nishio SY, Kumakawa K, Tono T, Kobayashi Y, Sato H, Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S. Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1
114. Pennings RJ, Fields RR, Huygen PL, Deutman AF, Kimberling WJ, Cremers CW. Usher syndrome type III can mimic other types of Usher syndrome
115. Reisser CF, Kimberling WJ, Otterstedde CR. Hearing loss in Usher syndrome type II is nonprogressive
116. Kile JE. 1993. Identification of hearing impairment in children: A 25 - year review. *Infant Toddler Intervention* 3:155 –160.
117. Vohr BR, Widen JE, Cone-Wesson B, et al. 2000. Identification of neonatal hearing impairment: characteristics of infants in the neonatal intensive care unit and well-baby nursery. *Ear Hear* 21:373 – 382.
118. Roizen NJ. 1999. Etiology of hearing loss in children. *Ped Clin North Am* 46:49–64.
119. Kuriyama M, Tomiwa K, Konishi Y, et al. 1986. Improvement in auditory brainstem response of hyperbilirubinemic infants after exchange transfusions. *Pediatr Neurol* 2:127–132.
120. Perlman M, Fainjmesser P, Sohmer H, et al. 1983. Auditory nerve-brainstem evoked responses in hyperbilirubinemic neonates. *Pediatrics* 72:658.
121. DeVries LS, Lary S, Dubowitz LMS. 1985. Relationship of serum bilirubin levels to ototoxicity and deafness in high-risk low-birthweight infants. *Pediatrics* 76:351–354.
122. Kawashiro N, Tsuchihashi N, Koga K, et al. 1996. Delayed post-neonatal intensive care unit hearing disturbance. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 34:35–43.
123. Madden, C., Wiley, S., Schleiss, M., Benton, C., Meinen-Derr, J., Greinwald, J.,...Choo, D. (2005). Audiometric, clinical and educational outcomes in a pediatric symptomatic congenital cytomegalovirus (CMV) population with sensorineural hearing loss. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 69 (9), 1191–1198.
124. Smith, R. J., Bale, J. F. Jr., & White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*, 365(9462), 879–890.
125. Freij BJ, Sevr JL. 1988. Herpesvirus infections in pregnancy: Risks to embryo, fetus, and neonate. *Clin Perinatol* 15:208 –215.
126. Lopez A, Dietz VJ, Wilson M, et al. Preventing congenital toxoplasmosis. *National Center for Health Statistics. Recommendations Rep* 2000;49(rr02): 57–75
127. Freij BJ, Sever JL. 1991. Toxoplasmosis. *Pediatr Rev* 12:227–236.
128. Brown ED, Chau JK, Atashband S, et al. A systematic review of neonatal toxoplasmosis exposure and sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:707–11
129. McLeod R, Boyer K, Karrison T, et al, Toxoplasmosis Study Group. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-based, congenital toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis* 2006;42(10): 1383–94
130. Roizen NJ, Johnson D. 1996. Congenital infections. In Capute AJ, Accardo PJ [eds]. *Developmental disabilities in infancy and childhood*. 2nd ed. Baltimore:Paul H Brookes. p175.
131. Ames MD, Plotkin SA, Winchester RA, et al. 1970. Central auditory imperception: A significant factor in congenital rubella deafness. *J Am Med Assoc* 213:419–422.
132. Pandey, M., Dudeja, A., Datta, V., Singla, B., & Saili, A. (2013). Congenital rubella syndrome. *The Indian Journal of Pediatrics*, 80(7), 613–614.
133. Lee, J. Y., & Bowden, D. S. (2000). Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 571–587.
134. Webster, W. S. (1998). Teratogen update: Congenital rubella. *Teratology*, 58(1), 13–23
135. Stehel EK, Shoup AG, Owen KE, et al. Newborn hearing screening and detection of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2008;121:970–5
136. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a qualitative assessment. *J Clin Virol* 2008;41:57–62

137. Fowler, K. B., McCollister, F. P., Dahle, A. J., Boppana, S., Britt, W. J., & Pass, R. F. (1997). Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Pediatrics*, 130(4), 624–630.
138. Schraff, S. A., Schleiss, M. R., Brown, D. K., Meinen-Derr, J., Choi, K. Y., Greinwald, J. H.,...Choo, D. I. (2007). Macrophage inflammatory proteins in cytomegalovirus-related inner ear injury. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 137(4), 612–618
139. Grosse, S. D., Ross, D. S., & Dollard, S. C. (2008). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: A quantitative assessment. *Journal of Clinical Virology*, 41(2), 57–62.
140. Barbi, M., Binda, S., Caroppo, S., & Primache, V. (2006). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 206–209
141. Foulon, I., Naessens, A., Foulon, W., Casteels, A., & Gordts, F. (2008). A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Pediatrics*, 153(1), 84–88.
142. Fowler, K. B., & Boppana, S. B. (2006). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 226–231
143. Brown ZA, Wald A, Morrow A, et al. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA* 2003;289(2):203–9
144. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the newborn. *Semin Perinatol* 2007;31(1):19–25
145. Westerberg BD, Atashband S, Kozak FK. A systematic review of the incidence of sensorineural hearing loss in neonates exposed to Herpes simplex virus (HSV). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72(7):931–7
146. Palacios, G. C., Montalvo, M. S., Fraire, M. I., Leon, E., Alvarez, M. T., & Solorzano, F. (2008). Audiologic and vestibular findings in a sample of human immunodeficiency virus type-1-infected Mexican children under highly active antiretroviral therapy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 72(11), 1671–1681.
147. Prasad, H. K., Bhojwani, K. M., Shenoy, V., & Prasad, S. C. (2006). HIV manifestations in otolaryngology. *American Journal of Otolaryngology*, 27(3), 179–185.
148. Rarey, K. E. (1990). Otologic pathophysiology in patients with human immunodeficiency virus. *American Journal of Otolaryngology*, 11(6), 366–369
149. Pappas, D. G. Jr., Chandra, H. K., Lim, J., & Hillman, D. E. (1994). Ultrastructural findings in the cochlea of AIDS cases. *American Journal of Otolaryngology*, 15(4), 456–465.
150. Grimaldi, L. M., Luzi, L., Martino, G. V., Furlan, R., Nemni, R., Antonelli, A.,...Pozza, G. (1993). Bilateral eighth cranial nerve neuropathy in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Neurology*, 240(6), 363–366
151. Hashimoto H, Fujioka M, Kinumaki H, Kinki Ambulatory Pediatrics Study Group. An office based prospective study of deafness in mumps. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(3):173–5
152. Stewart BJ, Prabhu PU. Reports of sensorineural deafness after measles, mumps, and rubella immunization. *Arch Dis Child* 1993;69:153–4
153. Fukuda, S., Ishikawa, K., & Inuyama, Y. (1994). Acute measles infection in the hamster cochlea. *Acta Otolaryngologica Supplement*, 514, 111–116.
154. Dunmade, A. D., Segun-Busari, S., Olajide, T. G., & Ologe, F. E. (2007). Profound bilateral sensorineural hearing loss in Nigerian children: Any shift in etiology? *Journal of Deaf Studies and Deaf Education*, 12(1), 112–118.
155. Stephenson, J. (2002). Will the current measles vaccines ever eradicate measles? *Expert Review of Vaccines*, 1(3), 355–362.
156. Suboti, R. (1976). Histopathological findings in the inner ear caused by measles. *The Journal of Laryngology & Otolaryngology*, 90(2), 173–181.
157. Asatryan, A., Pool, V., Chen, R. T., Kohl, K. S., Davis, R. L., Iskander, J. K.,...The VAERS team. (2008). Live attenuated measles and mumps viral strain-containing vaccines and hearing loss: Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, 1990–2003. *Vaccine*, 26(9), 1166–1172. 7.
158. Brodsky, L., & Stanievich, J. (1985). Sensorineural hearing loss following live measles virus vaccination. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 10, 159–163
159. Sweeney, C. J., & Gilden, D. H. (2001). Ramsay Hunt syndrome. *The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 71(2), 149–154.

160. Wayman, D. M., Pham, H. N., Byl, F. M., & Adour, K. K. (1990). Audiological manifestations of Ramsay Hunt syndrome. *The Journal of Laryngology & Otolology*, 104(2), 104–108.
161. Abramovich, S., & Prasher, D. K. (1986). Electrocochleography and brain-stem potentials in Ramsay Hunt syndrome. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 112(9), 925–928
162. Aleksic, S. N., Budzilovich, G. N., & Lieberman, A. N. (1973). Herpes zoster oticus and facial paralysis (Ramsay Hunt syndrome). Clinicopathologic study and review of literature. *Journal of the Neurological Sciences*, 20(2), 149–159
163. Ohtani, F., Furuta, Y., Aizawa, H., & Fukuda, S. (2006). Varicella-zoster virus load and cochleovestibular symptoms in Ramsay Hunt syndrome. *The Annals of Otolology, Rhinology, and Laryngology*, 115(3), 233–238
164. Gantz, B. J., Redleaf, M., Perry, B. P., & Gubbels, S. P. (2010). Chapter 28: Management of Bell's Palsy and Ramsay Hunt Syndrome. In D. E. Brackmann, C. Shelton, & A.A. Arriaga (Eds.), *Otologic surgery* (3rd ed., pp. 335–346). Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
165. Murakami, S., Hato, N., Horiuchi, J., Honda, N., Gyo, K., & Yanagihara, N. (1997). Treatment of Ramsay Hunt syndrome with acyclovir-prednisone: Significance of early diagnosis and treatment. *Annals of Neurology*, 41(3), 353–357
166. Kaberos, A., Balatsouras, D. G., Korres, S. G., Kandiloros, D., & Economou, C. (2002). Audiological assessment in Ramsay Hunt syndrome. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*, 111(1), 68–76.
167. Edmond K, Clark A, Korczak VS, et al. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10(5):317–28
168. Wright T. 1999. Bacterial meningitis and deafness. 1986. *Clin Otolaryngol* 24:385–387.
169. Dodge PR, Davis H, Feigin RD, et al. 1984. Prospective evaluation of hearing impairment as a sequela of acute bacterial meningitis. *N Eng J Med* 311:869 – 874
170. Kaplan SL, Smith EOB, Wills C, et al. 1986. Association between preadmission oral antibiotic therapy and cerebrospinal fluid findings and sequelae caused by *Haemophilus influenzae* type b meningitis. *Pediatr Inf Dis* 5:626 – 632.
171. Vienny H, Despland PA, Lutschg J, et al. 1984. Early diagnosis and evolution of deafness in childhood bacterial meningitis: a study using brainstem auditory evoked potentials. *Pediatrics* 73:579 - 586.
172. Nikolopoulos TP, O'Donoghue GM, Mason SM, et al. 1999. Integrity of the auditory pathway in young children with congenital and postmeningitic deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108:327–350. Niskar AS, Kieszak SM
173. Johnsonbaugh RE, Drexler HG, Light IJ, et al. 1974. Familial occurrence of drug-induced hearing loss. *Am J Dis Child* 127:245 –247.
174. Roizen NJ. 1999. Etiology of hearing loss in children. *Ped Clin North Am* 46:49–64
175. Bergman I, Hirsch RP, Fria TJ, et al. 1985. Cause of hearing loss in the high-risk premature infant. *J Pediatr* 106:95–101.
176. Finitzo-Hieber R, McCracken GH, Brown KC. 1985. Prospective controlled evaluation of auditory function in neonates given netilmicin or amikacin. *J Pediatr* 106:129.
177. Salmay A, Eldredge L, Tooley WH. 1989. Neonatal status and hearing loss in high-risk infants. *J Pediatr* 114:847–852
178. Borradori C, Fawer CL, Buclin T, et al. 1997. Risk factors of sensorineural hearing loss in preterm infants. *Biol Neonate* 7:1–10.
179. Jones KL. 1997. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders.
180. Walton J, Gibson WP, Sanli H, Prelog K. Predicting cochlear implant outcomes in children with auditory neuropathy. *Otol Neurotol* 2008; 29:302 –309
181. Rance G, Starr A. Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. *Brain* 2015; 138:3141 – 31
182. Moore B. *Perceptual consequences of cochlear damage*. Oxford: Oxford University Press; 1995.
183. Amin SB, Wang H, Laroia N, Orlando M. Unbound bilirubin and auditory neuropathy spectrum disorder in late preterm and term infants with severe jaundice. *J Pediatr* 2016; 173:84 – 89
184. Sawada S, Mori N, Mount RJ, Harrison RV. Differential vulnerability of inner and outer hair cell systems to chronic mild hypoxia and glutamate ototoxicity: insights into the cause of auditory neuropathy. *J Otolaryngol* 2001; 30:106 –114

185. Manchaiah VK, Zhao F, Danesh AA, Duprey R. The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75:151 – 158
186. Martin WH, Pratt H, Schwegler JW. The origin of the human auditory brainstem response wave II. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1995; 96:357 – 370.
187. Harrison RV, Gordon KA, Papsin BC, et al. Auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD) and cochlear implantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015; 79:1980 – 1987.
188. Berlin CI, Hood LJ, Morlet T, et al. Multisite diagnosis and management of 260 patients with auditory neuropathy/dy-synchrony (auditory neuropathy spectrum disorder). *Int J Audiol* 2010; 49:30 – 43
189. Walker EA, McCreery RW, Spratford M, et al. Children with ANSD fitted with hearing aids applying the AAA pediatric amplification guideline: current practice and outcomes. *J Am Acad Audiol* 2016; 27:204 – 218
190. Kontorinis G, Lyoid SK, Henderson L, et al. Cochlear implantation in children with auditory neuropathy spectrum disorders. *Cochlear Implants Int* 2014; 15:S51 – S54
191. Teagle HF, Roush PA, Woodard J, et al. Cochlear implantation in children with auditory neuropathy spectrum disorder. *Ear Hear* 2010; 31:325 – 33
192. Humphriss R, Hall A, Maddocks J, et al. Does cochlear implantation improve speech recognition in children with auditory neuropathy spectrum disorder? A systematic review. *Int J Audiol* 2013; 52:442– 454.
193. Kim SH, Choi HS, Han YE, et al. Diverse etiologies manifesting auditory neuropathy characteristics from infants with profound hearing loss and clinical implications. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016; 86:63 – 67.
194. Schmidt CM, am Zehnhoff-Dinnesen A, Matulat P, Knief A, Rosslau K, Deuster D. Nonorganic hearing loss in children: audiometry, clinical characteristics, biographical history and recovery of hearing thresholds. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013;77(7):1190–3.
195. Parodi, M., Rouillon, I., Rebours, C., Denoyelle, F., & Loundon, N. (2017). Childhood psychogenic hearing loss: Identification and diagnosis. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 134(6), 415–418.
196. Pracy JP, et al. Childhood pseudohypacusis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996;37(2):143–9.
197. Legent F. *Audiologie pratique*. 2e éd. Édition Masson; 2002
198. Deguine O, editor. *Rapport de la SFORL, Electrophysiologie en ORL*. L'Européenne d'Éditions; 2008 [chapitre 2.2]
199. Zwislocki, J. J.(1980). Theory of cochlear mechanics. *Hearing Research*, 2, 171- 182.
200. Kemp,D.T., Bray, P., Alexander, L.,&Brown,A.M.(1986). Acoustic emission cochleography:Practical aspects. *Scandinavian Audiology*, 25(Suppl.), 71-82.
- 201.Jonsen,N.J.,& Elberling,C.(1982). Evoked acoustic emissions from the human ear: I.Equipment and response parameters. *Scandinavian Audiology*, 11, 3-11.
202. Prive,B.A.(1992).Otoacoustic emissions in infants and children: Basic characteristics and clinical application. *Seminars in Hearing*,13, 37-52.
203. Kemp,D.T.(1979a). Evidence of mechanical nonlinearity and frequency selective were amplification in the cochlea. *Archives of Otorhinolaryngology*, 224, 37-45.
- 204.Wit, H.P.&van Dijk,P.(1990). Spectral line width of spontaneous optoacoustic emissions. In F.Grandordori, G. Gianfrone,D.T.Kemp(eds.): *Cochlear mechanisms and optoacoustic emissions* (pp.110-116). Basel, Switzerland:Kruger.
- 205.Norton,S.J., Mott,J.B., Champlin,C.A.(1989). Behavior of spontaneous optoacoustic emissions following intense ipsilateral acoustic stimulation. *Hearing Research*, 38, 243-2258.
- 206.Moulin,A.,Collet,L.,Delli,D.,&Morgon,A.(1991). Spontaneous otoacoustic emissions and sensorineural hearing loss. *Acta Oto-Laryngologica*, 111, 835-841.
207. Penner, M.J.,Glottzbach,L.,&Huang,T.(1993). Spontaneous otoacoustic emissions:Measurement and data. *Hearing Research*, 68, 229-237.
- 208.Kok,M.R., van Zanten,G.A.,&Brocaar,M.P.(1993). Aspects of spontaneous otoacoustic emissions in healthy newborns. *Hearing Research*, 69, 115-123.
209. Jerger J. (1970) Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryn*. 92, 311–324.
210. Holte, L., Margolis, R. H. & Cavanaugh, R. M. Jr (1991). Developmental changes in multifrequency tympanograms. *Audiology* 30: 1-24.

- 211 Tympanometry in Normal Neonates . Mordechai Z. Himelfarb, Gerald R. Popelka, and Eliahu Shanon . Journal of Speech, Language, and Hearing Research, March 1979, Vol. 22, 179-191
212. Latency of the Acoustic Reflex in Eighth-Nerve Tumor James Jerger, PhD; Deborah Hayes, PhD . Arch Otolaryngol. 1983;109(1):1-5
213. Maturation of the auditory brainstem response from birth through early childhood. Salamy A. Journal of Clinical Neurophysiology .01 Jul 1984, 1(3):293-329
214. Jewett DL, Williston JS. Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. Brain 1971;94:681-96.
215. Singh CB, Mason SM. Simultaneous recording of extratympanic electrocochleography and brainstem evoked responses in clinical practice. J Laryngol Otol 1981;95:279-90.
216. Auditory brainstem response in paediatric audiology. Archives of Disease in Childhood, 1988, 63, 465-467
217. Davis H, Hirsh SK. A slow brainstem response for low-frequency audiometry. Audiology 1979;18:445-61.
218. Imai H, Shimoto T. Auditory evoked potentials from the human midbrain: slow brainstem responses. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1982;53:652-7.
219. Coats AC, Martin JL. Human auditory nerve action potentials and brainstem evoked responses. Arch Otolaryngol 1977;103:605-22.
220. Estimation of the pure-tone audiogram by the auditory brainstem response: a review. Stapells DR<sup>1</sup>, Oates P. Audiol Neurootol. 1997 Sep-Oct;2(5):257-80
221. Click ABR intensity-latency characteristics in diagnosing conductive and cochlear hearing losses H.J. Steinhoff, F. Böhnke, and T.Janssen. Cl Arch Otorhinolaryngol (1988) 245:259-265
222. Hecox K, Galambos R (1974) Brainstem auditory evoked responses in human infants and adults. Arch Otolaryngol 99: 30-339. House J, Brackmann Otorhinolaryngol (1988) 245:259-265
223. Og conduct Arch b O Gerull G., Janssen T., Mroinski D., Thoma J. (1985) Latenzverhalten für akustisch evozierten Potentiale bei Innenohrschwerhörigkeit. Laryngol Rhinol Otol 64:162-168.
224. House J., Brackmann D (1979) Brainstem audiometry in neurologic diagnosis. Arch Otolaryngol 105 : 305-309
225. Estimation of the pure-tone audiogram by the auditory brainstem response: a review. Stapells DR<sup>1</sup>, Oates P. Audiol Neurootol. 1997 Sep-Oct;2(5):257-80
226. Gorga MP, Reiland JK, Beauchaine KA: Auditory brainstem responses from infants. Int J Pediatr ORL 1994;28:93-110.
227. Nozza R, Wilson W. (1984). Masked and unmasked pure-tone thresholds of infants and adults: Development of auditory frequency selectivity and sensitivity. J Speech Hear Res 27: 613–622
228. Nozza R, Sabo D, Mandel E. (1997). A role for otoacoustic emissions in screening for hearing impairment and middle ear disorders in school age children. Ear Hear 18: 227–239
229. Liden G, Kankkunen A. (1969). Visual reinforcement audiometry. Acta Otolaryngol 67: 281–292
230. Primus M. (1992). The role of localization in visual reinforcement audiometry. J Speech Hear Res 35: 1137–1141
231. Wilson W, Moore J. (1978). Pure-tone earphone thresholds of infants utilizing visual reinforcement audiometry (VRA). Paper presented at the American Speech and Hearing Association Convention, San Francisco, CA
232. Diefendorf A. (1988). Behavioral evaluation of hearing-impaired children. In: Bess FN, editor. (ed). Hear Impairment in Children, York Press, Inc., Parkton, MD, 133–151
233. Widen J. (1990). Behavioral screening of high-risk infants using visual reinforcement audiometry. Sem Hear 11: 342–356
- 234 . EARS@ (Evaluation of Auditory Responses to Speech): an internationally validated assessment tool for children provided with cochlear implants. Esser-Leyding, Anderson I. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2012; 74(1):42-51.
235. Bidisha Adhikary<sup>a</sup>, Sudakshina Ghosh<sup>a</sup>, Silpita Paul<sup>a</sup>, Biswabandhu Bankura<sup>a</sup>, Arup Kumar Pattanayak<sup>a</sup>, Subhradev Biswas<sup>b</sup>, Biswanath Maity<sup>a</sup>, Madhusudan Das<sup>a</sup>. Spectrum and frequency

of *GJB2*, *GJB6* and *SLC26A4* gene mutations among nonsyndromic hearing loss patients in eastern part of India; doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.050

236. T Fitzgeralda , S Duvaa , H Ostrerb , K Passa , C Oddouxb , R Rubenc and M Cagganaa a New York State Department of Health, Wadsworth Center, Albany, b New York University School of Medicine, New York, and c Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA. The frequency of *GJB2* and *GJB6* mutations in the New York State newborn population: feasibility of genetic screening for hearing defects. ; CLINICAL GENETICS doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00233.x

237. Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE et al. Mutations in the gene for connexin 26 (*GJB2*) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (8): 805–812

238. Arti Pandya, MD1 , Kathleen S. Arnos, PhD2 , Xia J. Xia, PhD1 , Katherine O. Welch, MS2 , Susan H. Blanton, PhD3 , Thomas B. Friedman, PhD4 , Guillermina Garcia Sanchez, MD5 , Xiu Z. Liu MD, PhD6 , Robert Morell, PhD4 , and Walter E. Nance, MD, PhD1. Frequency and distribution of *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands; *Genet Med.* 2003 Jul-Aug;5(4):295-303.

239. Address reprint requests to Iris Schrijver, M.D., Department of Pathology, L235, Stanford University Medical Center, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss

Transforming Silence to Sound; *J Mol Diagn.* 2004 Nov; 6(4): 275–284

240. Fryauf-Bertschy H, Tyler RS, Kelsey DM, Gantz BJ, Woodworth GG. Cochlear implant use by prelingually deafened children: The influences of age at implant and length of device use. *J Speech Hear Res*, 1997; 40:183–199. 21.

241. O'Donoghue GM, Nikolopoulos TP, Archbold SM. Determinants of speech perception in children after cochlear implantation. *Lancet*, 2000; 356:466–468.

242. Sainz M, Skarzynski H, Allum JHJ, Helms J, et al. Assessment of auditory skills in 140 cochlear implant children using the EARS protocol. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2003; 65:91–96.

243. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, Andressa Barbosa, Marília Santiago, Mariana Proveti, Raquel Spinassé Dettogni, Thais Tristão Tovar, Eliete Rabbi-Bortolini, Íuri Drumond Louro. Mutation analysis of *GJB2* and *GJB6* genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness; *Molecular Biology Reports* February 2011, Volume 38, Issue 2, pp 1309–1313

244. G. Padma, P. V. Ramchander, U. V. Nandur, T. Padma. *GJB2* and *GJB6* gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment; *Journal of Genetics* December 2009, Volume 88, Issue 3, pp 267–272

245. Frank R. Lin, MD, PhD,<sup>1,2,3</sup> Wade W. Chien, MD,<sup>1</sup> Lingsheng Li, M. H. S.,<sup>3</sup> John K. Niparko, MD,<sup>1</sup> and Howard W. Francis, MD; Cochlear Implantation in Older Adults; *Medicine (Baltimore)*. 2012 Sep; 91(5): 229–241. doi: 10.1097/MD.0b013e31826b145a

246. Oh, S. K., Choi, S. Y., Yu, S. H., Lee, K. Y., Hong, J. H., Hur, S. W., et al. (2013). Evaluation of the pathogenicity of *GJB3* and *GJB6* variants associated with nonsyndromic hearing loss. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 285–291. doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.009

247. Li, T. C., Kuan, Y. H., Ko, T. Y., Li, C., and Yang, J. J. (2014). Mechanism of a novel missense mutation, p.V174M, of the human connexin31 (*GJB3*) in causing nonsyndromic hearing loss. *Biochem. Cell Biol.* 92, 251–257. doi:10.1139/bcb-2013-0126