

**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**

АВТОРЕФЕРАТ

на 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

Дисертационният труд е написан на 166 машинописни страници и е онагледен с 63 фигури и 8 таблици.

Библиографският списък съдържа 247 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по ушни, носни и гърлени болести при Медицински факултет на Медицински университет – София на 10 юли 2019 г., съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 10 октомври 2019 г. от 12.00 часа в аудиторията на Клиниката по УНГ болести, УМБАЛ «Царица Йеонна – ИСУЛ» ЕАД, съгласно чл.76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София и въз основа на заповед N РК36-1249/26.07.2019 на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Председател: проф.д-р Диана Попова, дмн – вътрешен член и рецензент

Членове:

1. проф.д-р Карен Джамбазов – външен член и рецензент
2. проф.д-р Валентин Стоянов, дм – външен член
3. проф.д-р Диляна Вичева, дм – външен член
4. доц.д-р Стефан Стоянов, дм – външен член

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

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

Съдържание:

1.Въведение	4
2. Цел и задачи	4
2.1 Цел	4
2.2 Задачи	5
3. Материали и методи	5
3.1 Материали	5
3.1.1 Биологичен материал	6
3.2 Методи	6
3.2.1 Клинични методи	6
3.2.2 Аудиологични методи	6
3.2.2.1 Тонална прагова аудиометрия	6
3.2.2.2 Детска игрова аудиометрия	6
3.2.2.3 Тимпанометрия и рефлексометрия	7
3.2.2.4 Транзиентни отоакустични емисии	7
3.2.2.5 Слухови стволови евокирани потенциали	8
3.2.2.6 EARS	9
3.2.3 Образни изследвания	9
3.2.4 Генетични методи	9
3.2.4.1 Полимеразна верижна реакция (Polimerase Chain Reaction – PCR)	10
3.2.4.2 Директно секвениране	10
3.2.4.3 Таргетно новогенерационно секвениране	11
3.2.5 Биоинформатични методи	13
3.2.6 Статистически методи	13
4.Резултати	13
4.1 Демографски анализ	14
4.2 Дескриптивен анализ	15
4.3 Статистически анализ	21
4.4 Генетичен анализ	36
5. Дискусия	44
6. Заключение	51
7. Изводи	52
8. Приноси	53
Библиография	54
Списък с публикациите свързани с дисертационния труд	55

1. Въведение

Невросензорната загуба на слуха, НСЗС (*Sensorineural hearing loss, SNHL*) е комплексно заболяване, повлияно от взаимодействието на множество ендегенни 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.

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 автосомно доминантно, а под 1% са митохондриалното, miRNA и X- свързаното унаследяване [1].

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 несиндромна 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. 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 сменя 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, включително и здрави такива, 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

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. Представените 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. 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.

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

При изследваните пациенти са използвани импедансметри НОМОН – Tympr4000M 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.

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

3.2.2.4 Транзиентни отоакустични емисии

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

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

За TEOAE 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 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.

3.2.2.5 Слухови стволови евокирани потенциали

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 systems Corona.

3.2.2.6 EARS

Провеждането на рехабилитация при кохлеоимплантираните пациенти 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®). 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.

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, MTP3) - с три думи;
- Възприемане на прости въпроси (Glendonald Auditory Screening Procedure,GASP)
- Изследва способностите за имитиране (повтаряне) на непознати думи изречения с различна синтактична структура (Spoken Language Skill Test, SLS words).

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

3.2.3 Образни изследвания

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

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 молекулярна 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:

- *Изолитране на високомолекулна ДНК от венозна кръв.*

Целта на изолитрането 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 изолитране на високомолекулна ДНК е чрез автоматизирана магнититна сепарация, която беше използвана в това изследване. ДНК беше изолитрана с помощта на Chemagen® magnetic separation station.

- *Оценка на качеството и количеството на изолитраната 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 изолитраната ДНК беше определяна спектрофотометрично чрез апарат NANODROP.

Аналитична обработка:

- *Изследване за носителство на мутации в connexin 26, 30 и 31.*

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

PCR амплификацията се осъществи като се използва 1 µl от предварително приготвените 50 ng/µl 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 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. 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:

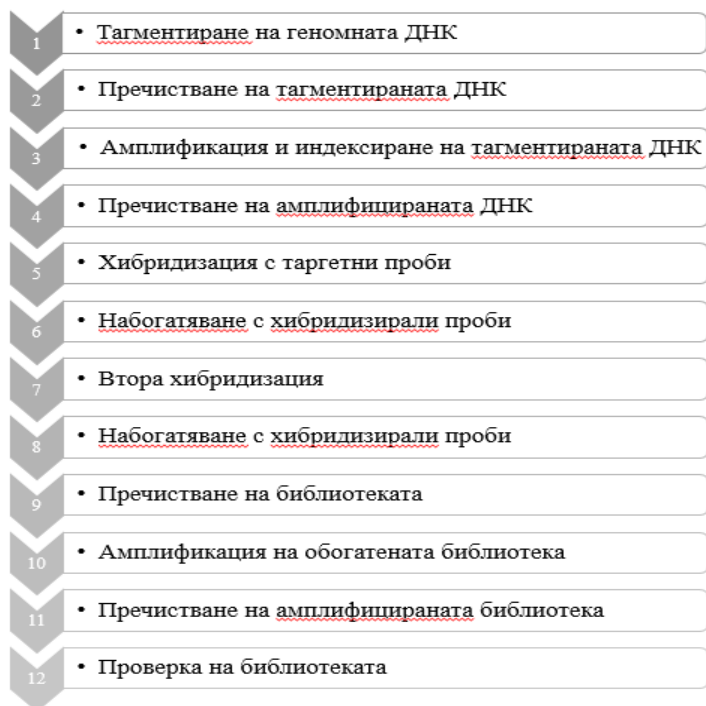
- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR.
- Пречистване на продукта с ExoSAP.
- Секвенционна реакция. Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1 (Applied Biosystems) включва ДНК – полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към 3'-края 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.
- Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди.

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 молекулярна 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 проучването се подбраха петима пациента с фамилна история за НСЗС, изследвани за носителство на мутации в Sx26 (GJB2), Sx30 (GJB6) и Sx31 (GJB3), при които не бе открита генетичната причина за възникналата слухова загуба. При тези пациенти проведехме :

3.2.4.3 Таргетно новогенерационно секвениране

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. 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 1.



Фигура 1. Основни стъпки в подготовка на библиотеки

Преди започването на протокола за подготовка на библиотеки ДНК концентрациите на избраните проби се нормализират. 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 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. 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. 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., Bozeman, MT, 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.

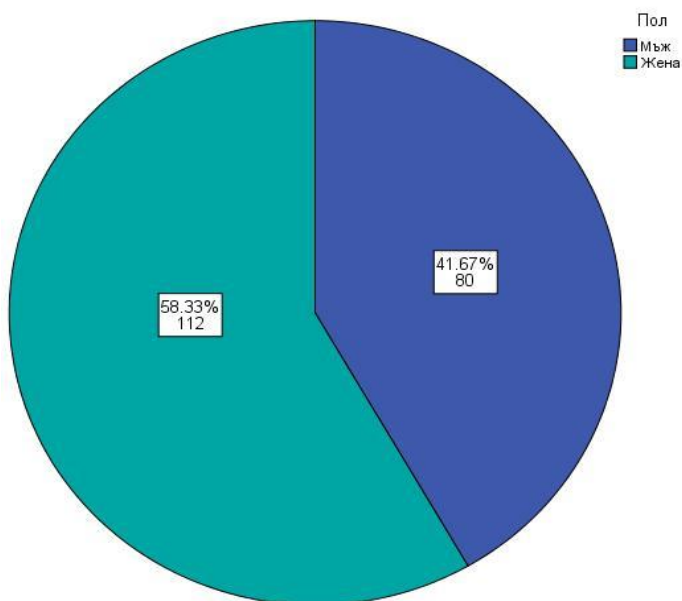
3.2.6 Статистически методи

Статистическият анализ се извърши беше използван статистически пакет SPSS 21.0.

4. Резултати

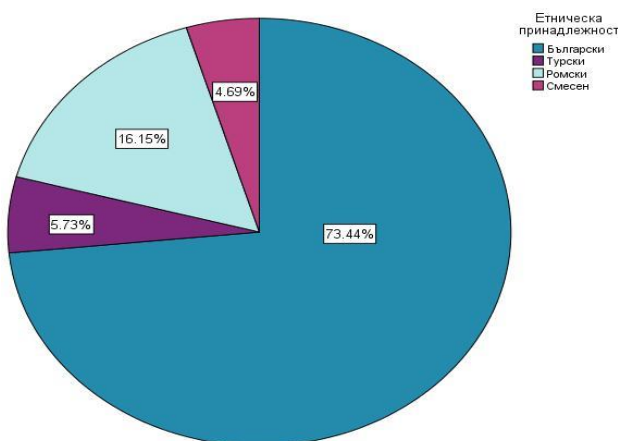
4.1 Демографски анализ

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 2. Разпределение на пациентите по пол.

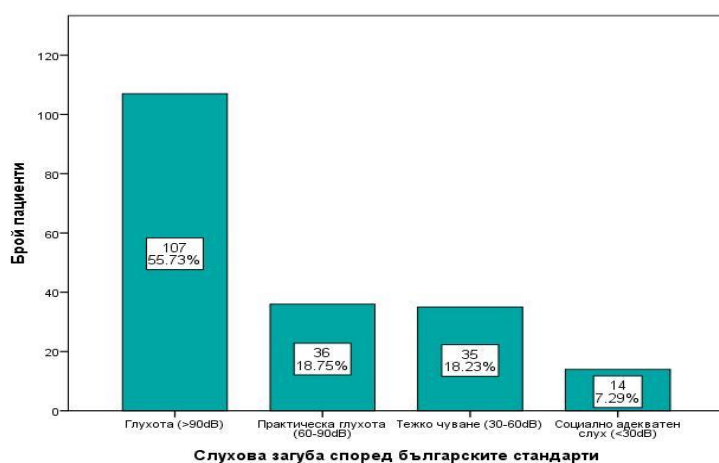
От изследваните пациенти 73.44% (n = 141) се самоопределят като българи, 16.15% (n = 31) като роми, 5.73% (n = 11) като турци, 4.69% (n = 9) са от смесени бракове.



Фигура 3. Разпределение по етническа принадлежност

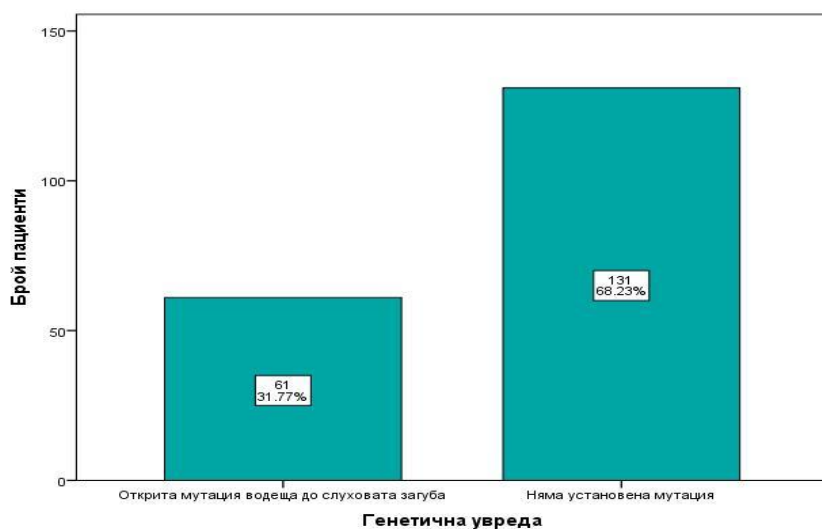
4.2 Дескриптивен анализ

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.



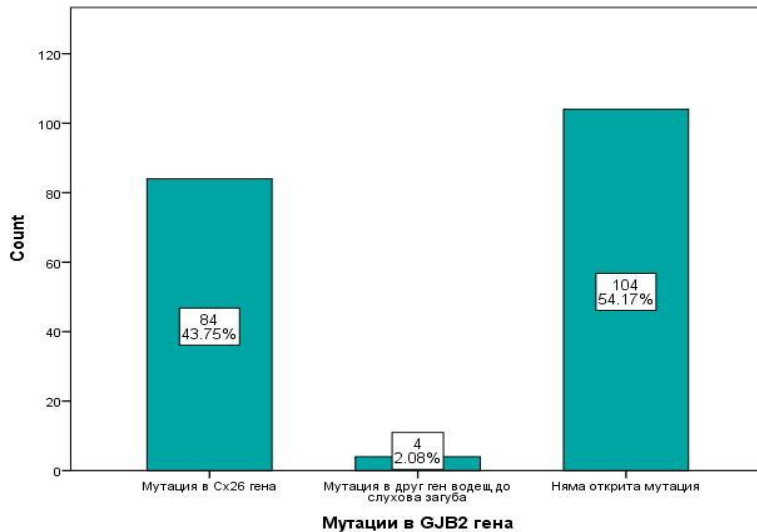
Фигура 4. Разпределение на слуховата загуба според българските стандарти

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 5. 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.



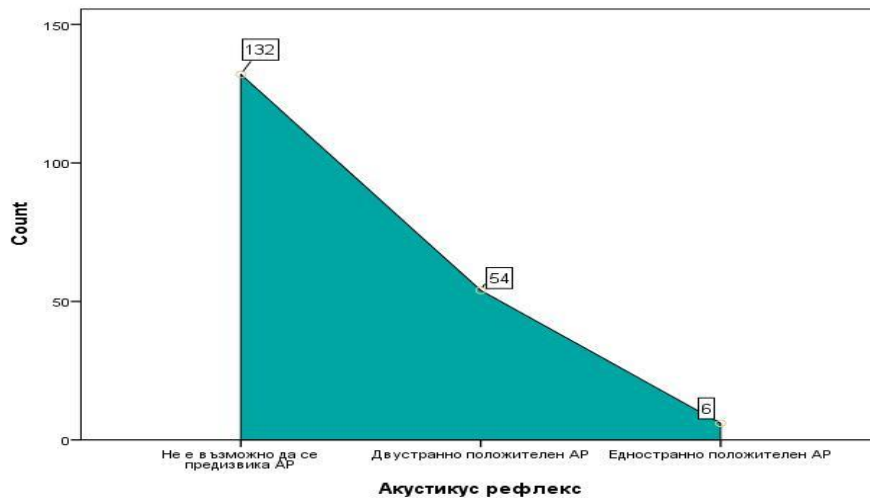
Фигура 6. Видове генетични увреди в изследваните пациенти.

При 29, 69% (n = 57) от изследаните 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 изследаните не се установи причината за слуховата загуба.



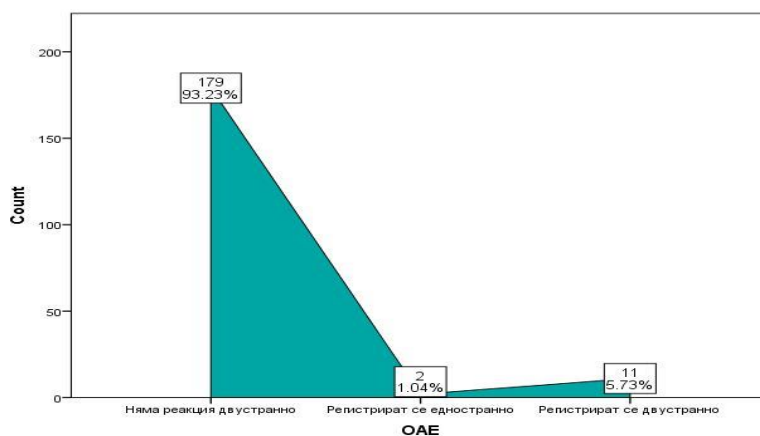
Фигура 7. Видове генетични увреди в изследваните пациенти.

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 двустранно- 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.



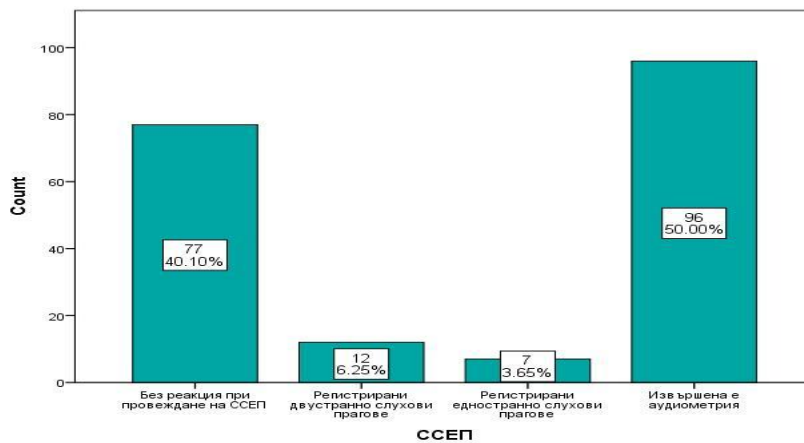
Фигура 8. Измерване на акустичен рефлекс

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.



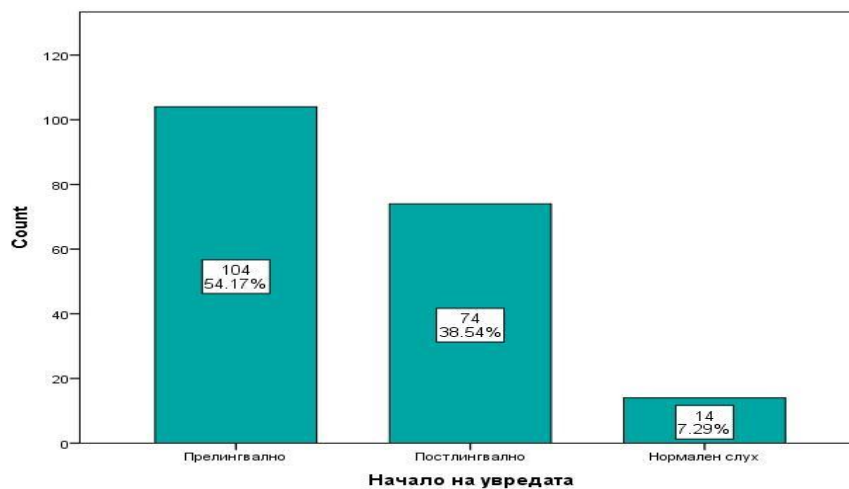
Фигура 9. Регистриране на отоакустични емисии, ОАЕ.

При 50% от изследваните пациенти намалението на слуха е регистрирано чрез ТПА (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 ССЕР. При всички пациенти под 3 годишна възраст слухът се изследва чрез измерване на ССЕР (n = 96). При 40.10% (n = 77) от изследваните деца ССЕР не са били регистрирани. При 6.25% (n = 12) от изследваните са се регистрирали ССЕР, а в 3.65% от случаите ССЕР са регистрирани едностранно.



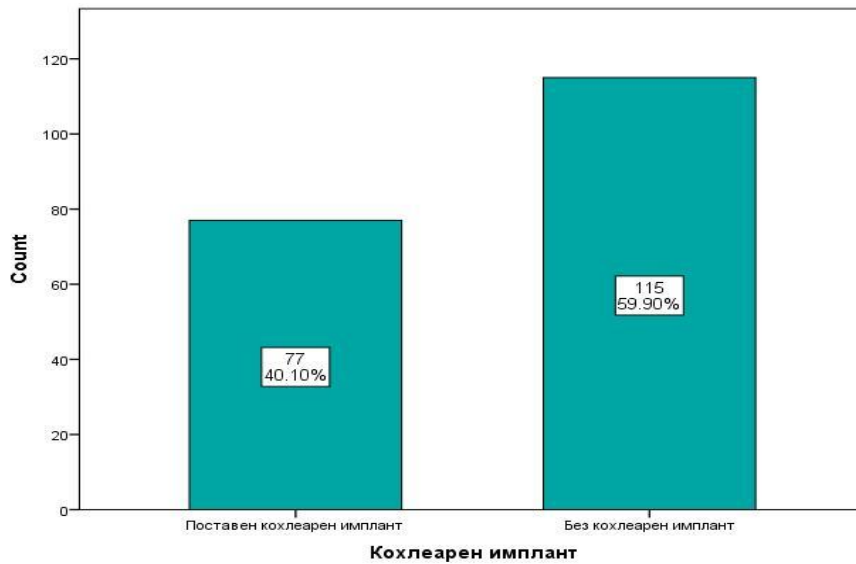
Фигура 10. Регистриране на ССЕР.

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.



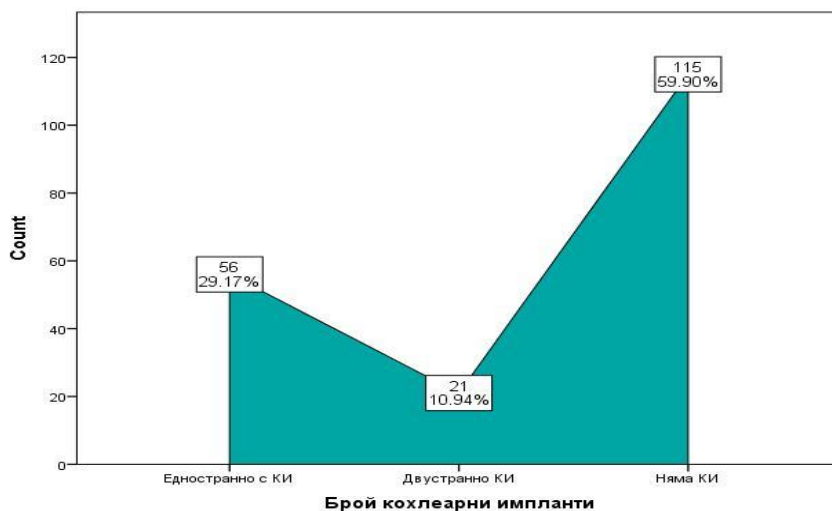
Фигура 11. Начало на слухова увреда.

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



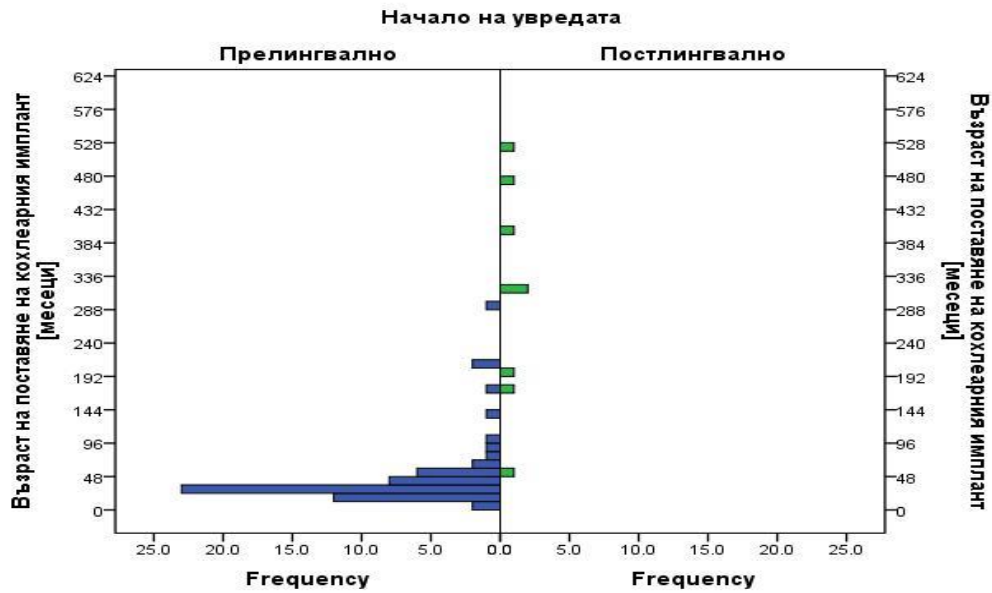
Фигура 12. Брой пациенти, при които е проведено хирургично лечение - кохлеоимплантация

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



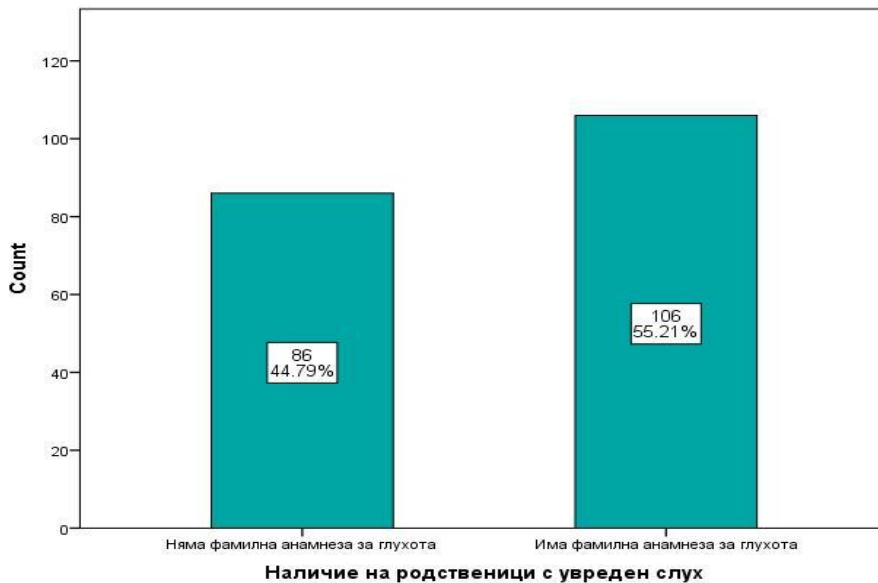
Фигура 13. Брой поставени кохлеарни импланти

Фигура 14 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 14. Възраст на кохлеоимплантиране .

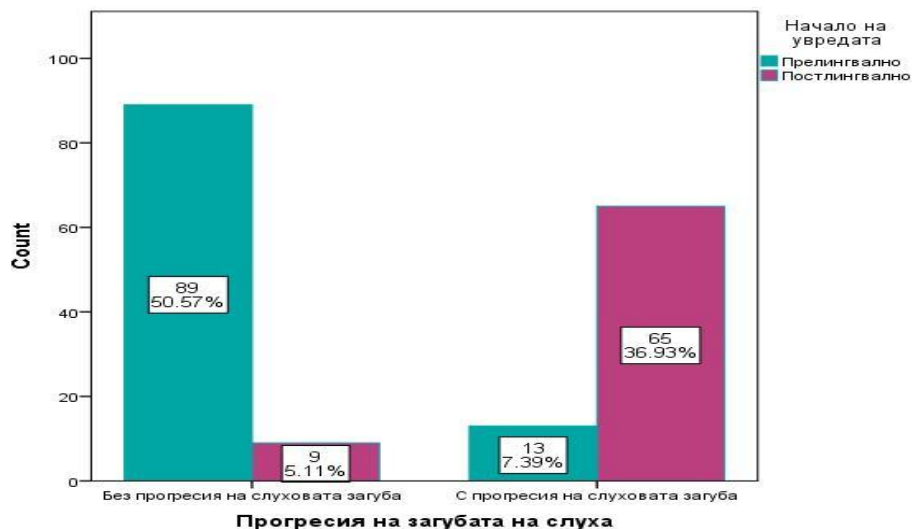
55.21% (n = 106) от изследваните случаи съобщават, че и други членове от семейството им имат увреден слух.



Фигура 15. Фамилна обремененост.

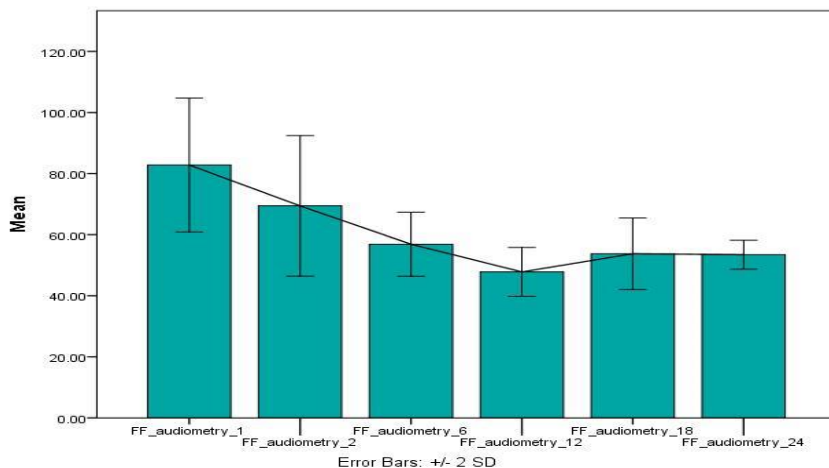
4.3 Статистически анализ

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.



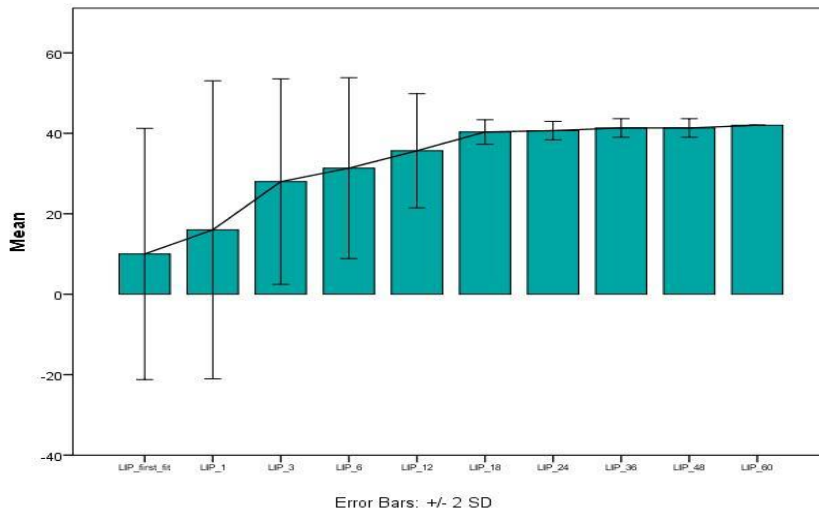
Фигура 16. Прогресия на слуховата загуба при пре- и постлингвална глухота.

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 двавет 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.



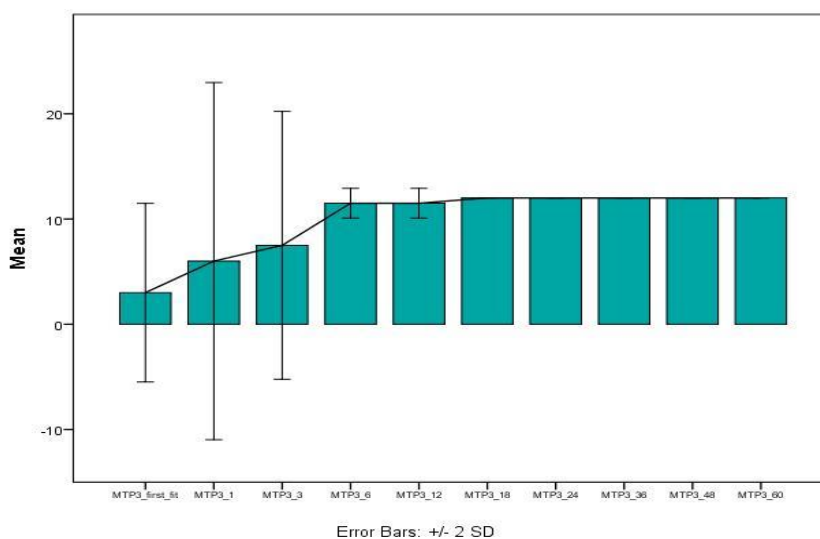
Фигура 17. Freefield, FF аудиометрия при кохлеоимплантирани.

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.



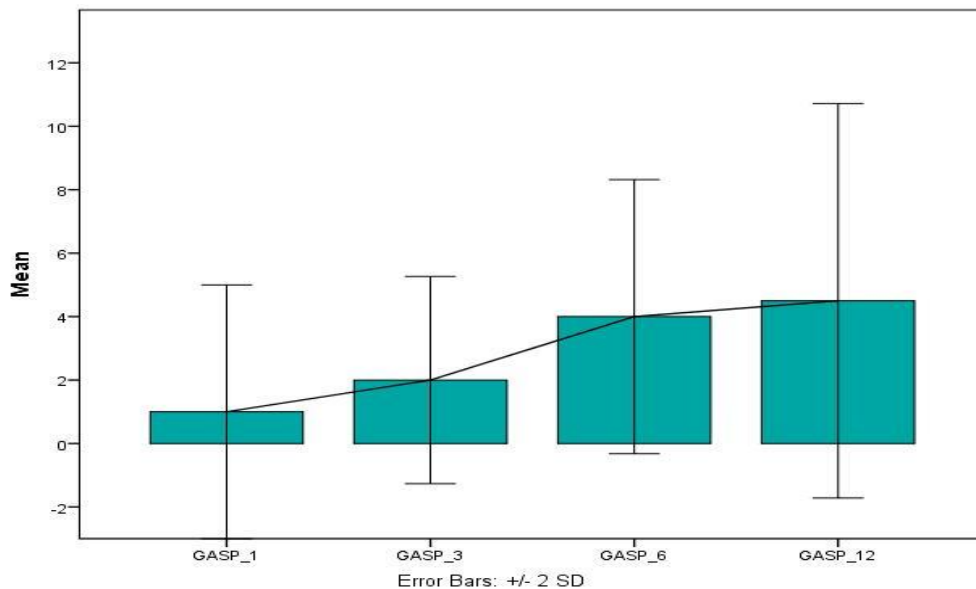
Фигура 18. Резултати от теста за развитие на слуховото възприятие.

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 три думи.

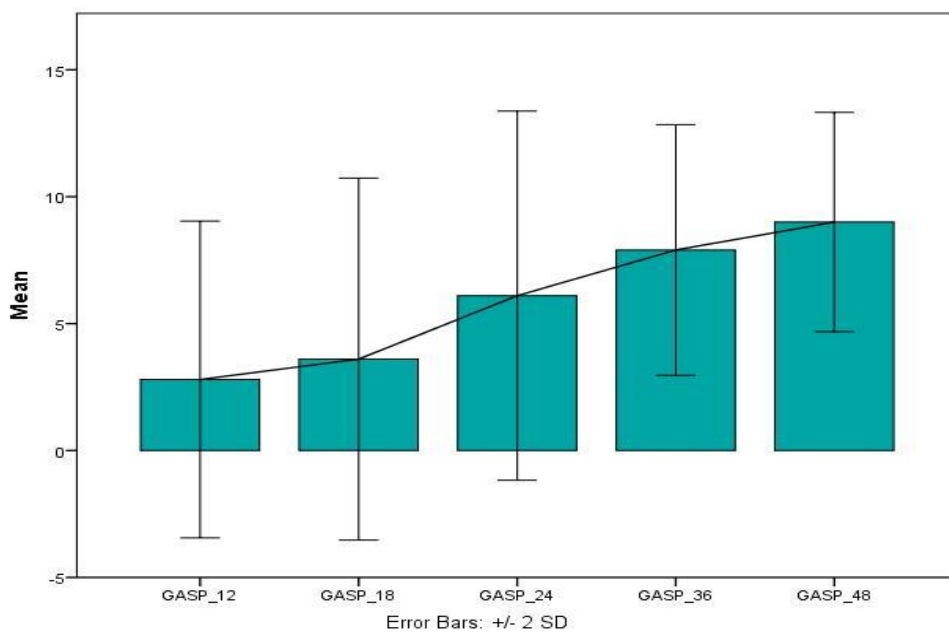


Фигура 19. Резултати от теста за възприемане на сричковата структура на думата (Monosyllable Trochee Polysyllable Test, MTP).

Тестът от отворен тип за възприемане на прости въпроси, GASP, отразен на фигура 20 и фигура 21, показва постепенно и сравнително по-бавно подобряване в резултатите, продължаващо до 48 месец от поставянето на кохлеарния имплант.

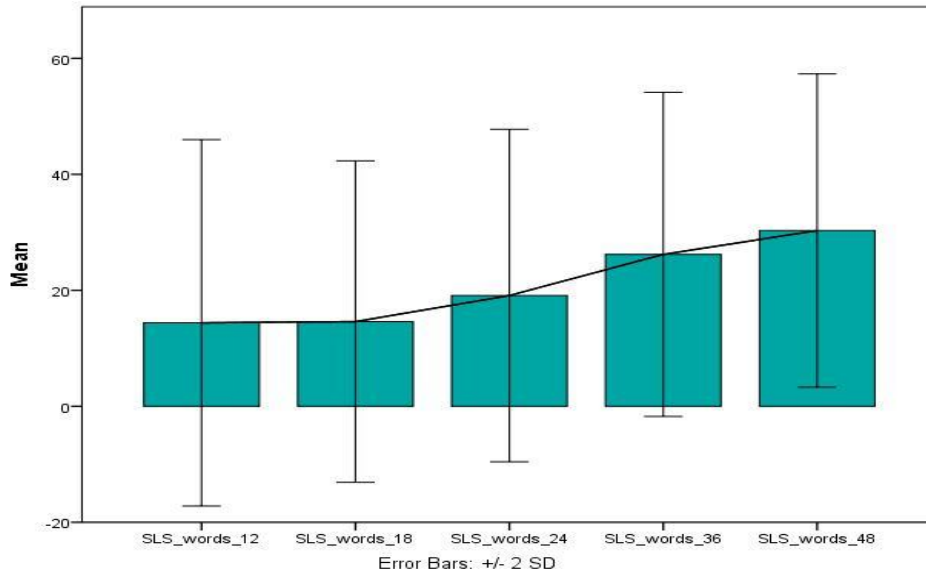


Фигура 20. Резултати от теста за възприемане на прости въпроси (Glendonald Auditory Screening Procedure, GASP)



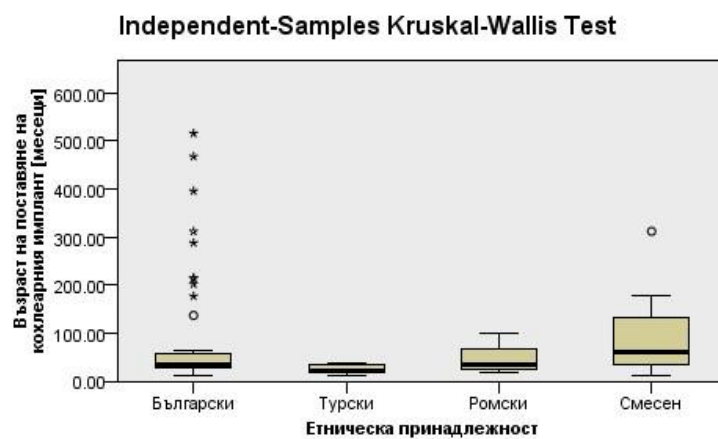
Фигура 21. Резултати от теста за възприемане на прости въпроси (GASP) 12 до 48 месец

Резултатите от теста за възприемане на 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 23. 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.

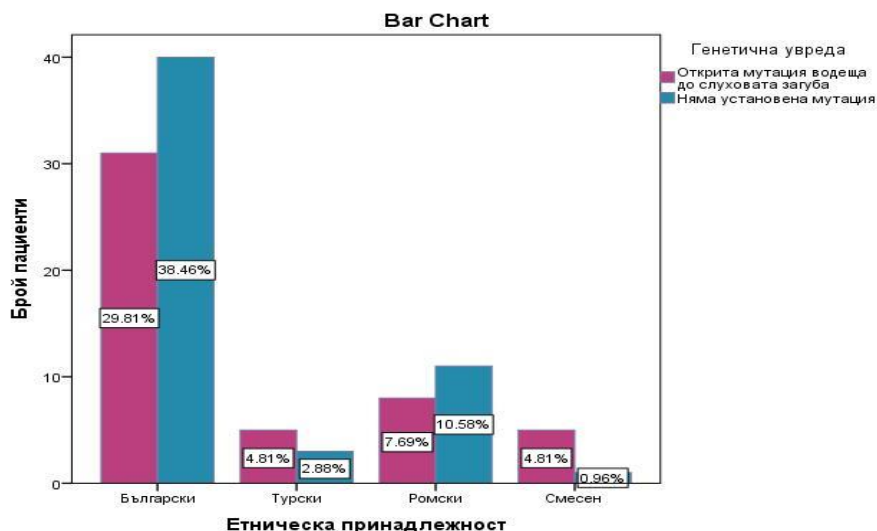


Total N	69
Test Statistic	4.177
Degrees of Freedom	3
Asymptotic Sig. (2-sided test)	.243

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.

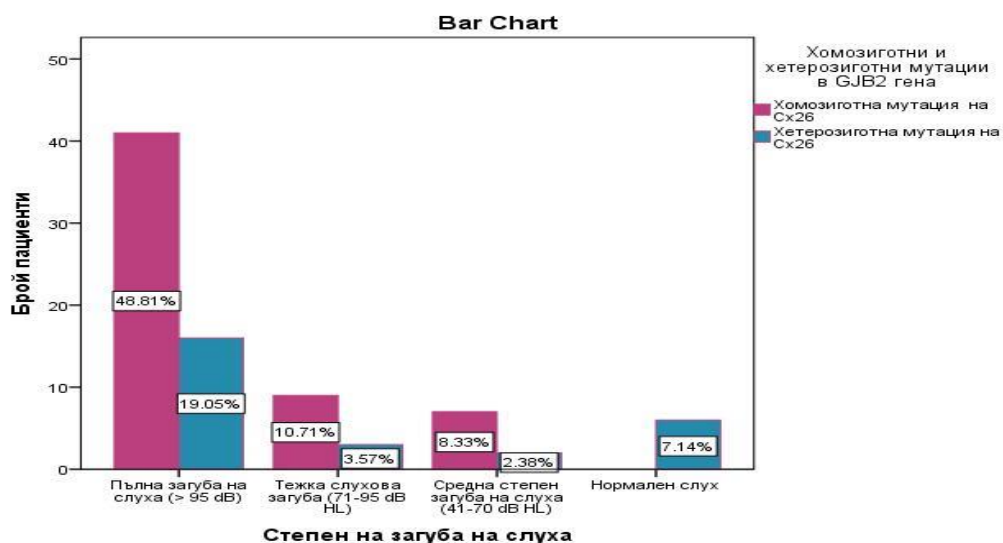
Фигура 24. Възраст на поставяне на КИ в зависимост от етническата принадлежност.

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 25. Генетична увреда в зависимост от етническата принадлежност.

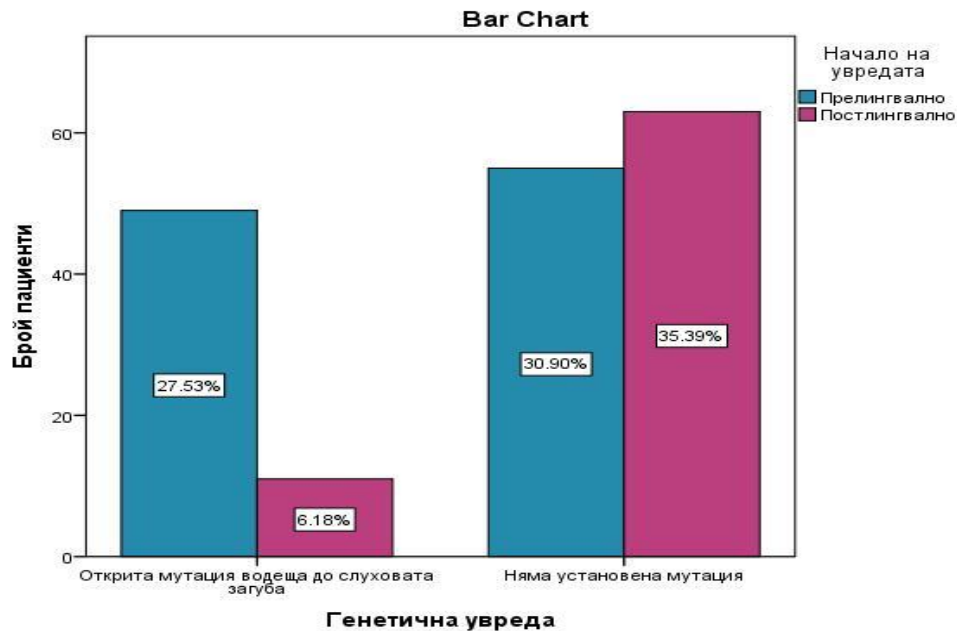
Чрез Chi- Square Test, сравнявайки степента на слухова загуба и откритите мутации в хомозиготно и хетерозиготно състояние в GJB2 гена, се изчисли статистическа значимост – $p < 0.05$. От представената графика се вижда, че най-голям процент от пациентите, носители на мутация в Sx26 в хомозиготно състояние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



Фигура 26. Степен на слуховата загуба в зависимост от наличието на мутации в GJB2 гена.

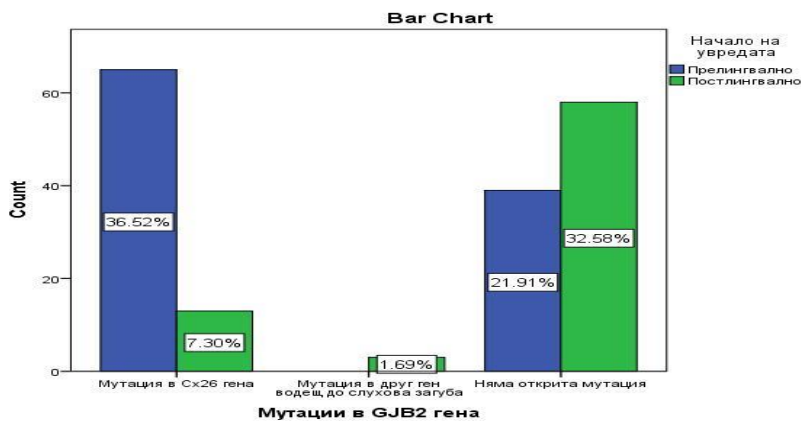
Между генетичната увреда и началото на слуховата загуба с теста Chi- Square се открива статистическа значимост ($p < 0.05$) между наличието на мутации в гените отговорни за слуха и началото на слуховата увреда. Сравнявайки групата на пациенти със слухова загуба в резултат на мутация с групата на пациенти, 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.



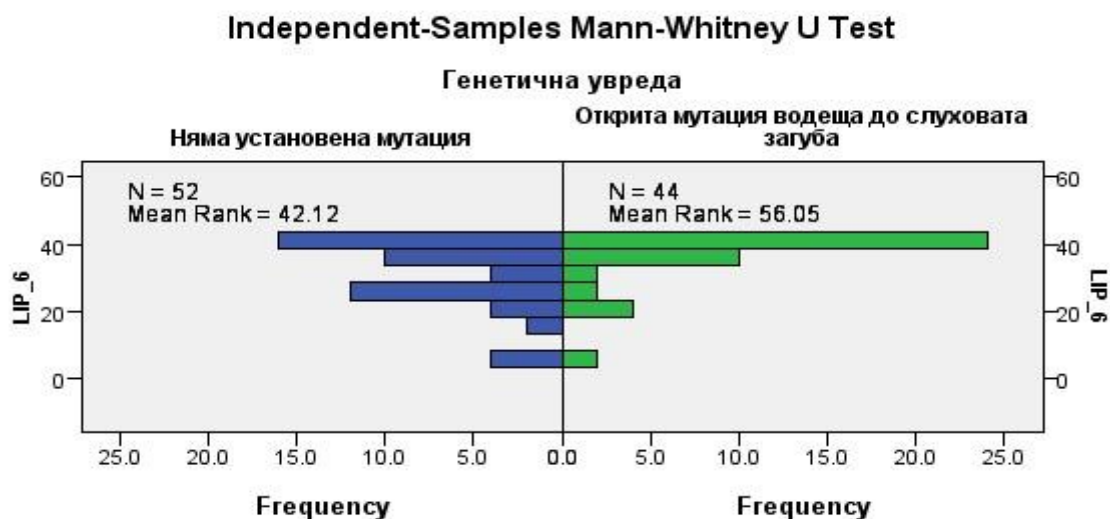
Фигура 27. Наличие на генетична увреда в зависимост от началото на слуховата загуба.

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

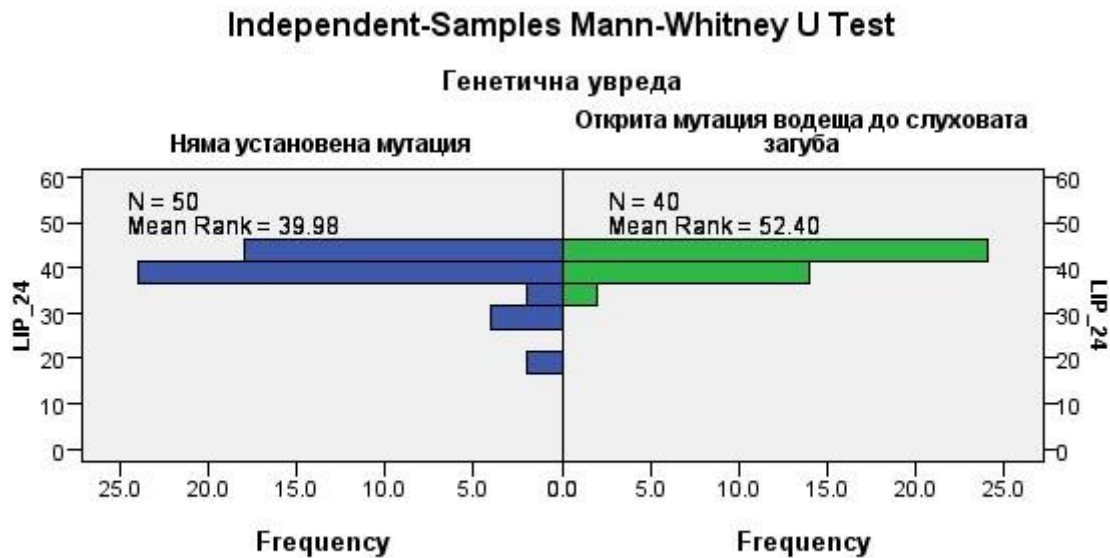
С непараметричният Mann-Whitney U Test се сравниха резултатите от слуховата рехабилитация – развитието на слухово възприятие (LiP Profile) на шестият месец от поставянето на КИ в зависимост от наличието или отсъствието на мутация, водеща до слуховата загуба. Получените резултати показват по-добро справяне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



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

Фигура 29. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на LiP тест в 6.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

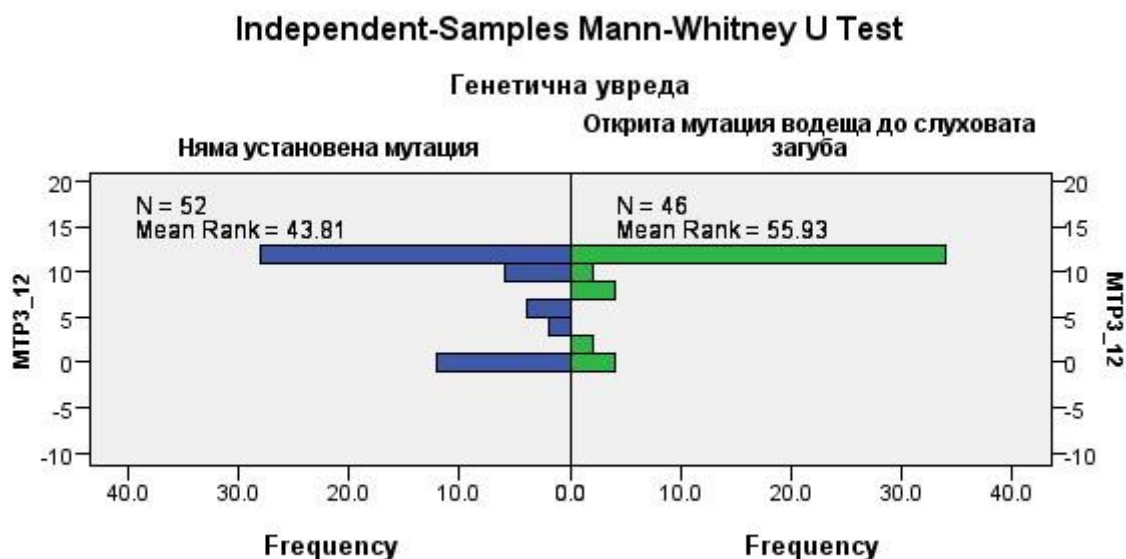
С непараметричният Mann-Whitney U Test се сравниха резултатите от слуховата рехабилитация – развитието на слухово възприятие (LiP Profile) и на двайсет и четвъртия месец от поставянето на КИ, в зависимост от наличието или отсъстието на мутация, водеща до слуховата загуба. Запазва се тенденцията от предходните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



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

Фигура 30. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на LiP тест в 24.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

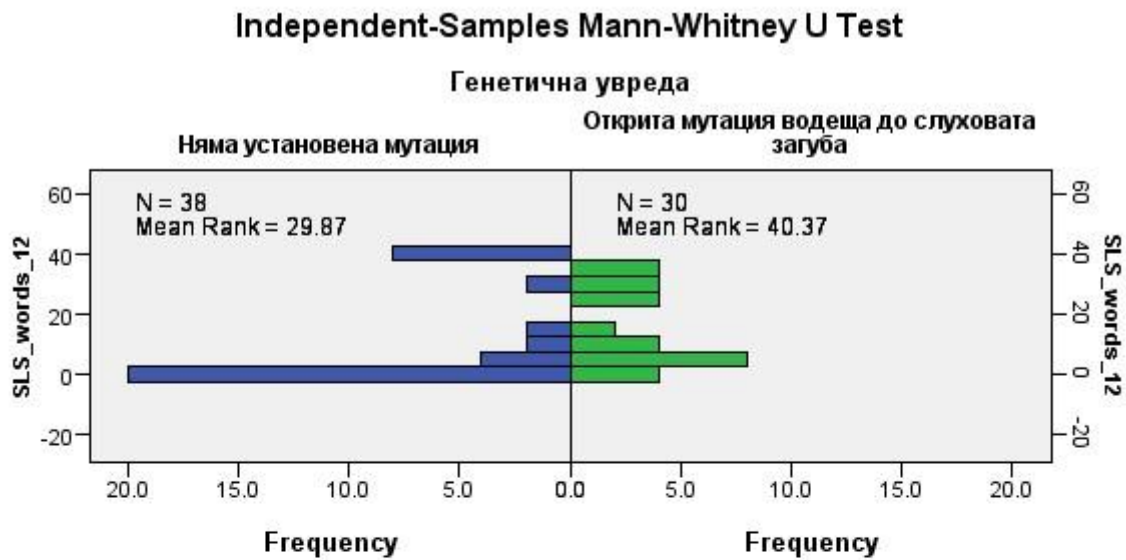
С непараметричният Mann-Whitney U Test се сраниха резултатите от слуховата рехабилитация за възприемане сричковата структура на думата (МТР3) на 12.месец от КИ. Откри се статистическа значимост в получените резултати ($p < 0.05$) – пациентите с открити мутации показат по-добри резултати сравнение с пациентите, при които не е открита генетична уреда.



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

Фигура 31. Резултати от слуховата рехабилитация при проejдане на МТР3 тест в 12.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

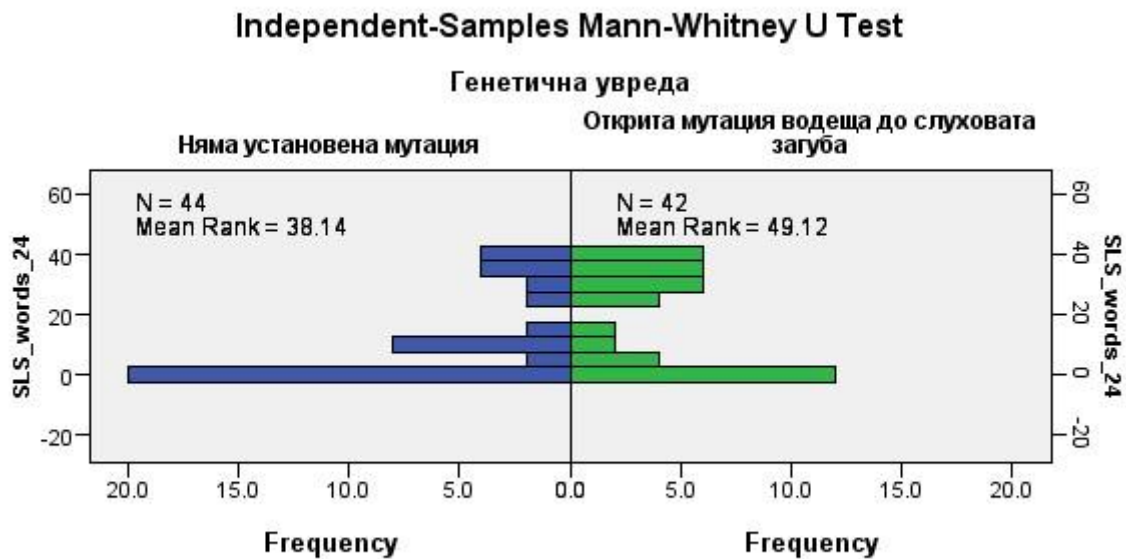
Резултатите от слуховата рехабилитация при КИ пациенти са със статистическа значимост ($p < 0.05$) и при провеждане на теста за възприемане на непознати изречения (SLS) на 12.месец от КИ. По-добри резултати дават пациентите с открита мутация, водеща до слухова загуба.



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

Фигура 32. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест в 12.месец след КИ в зависимост от наличието на генетична увреда.

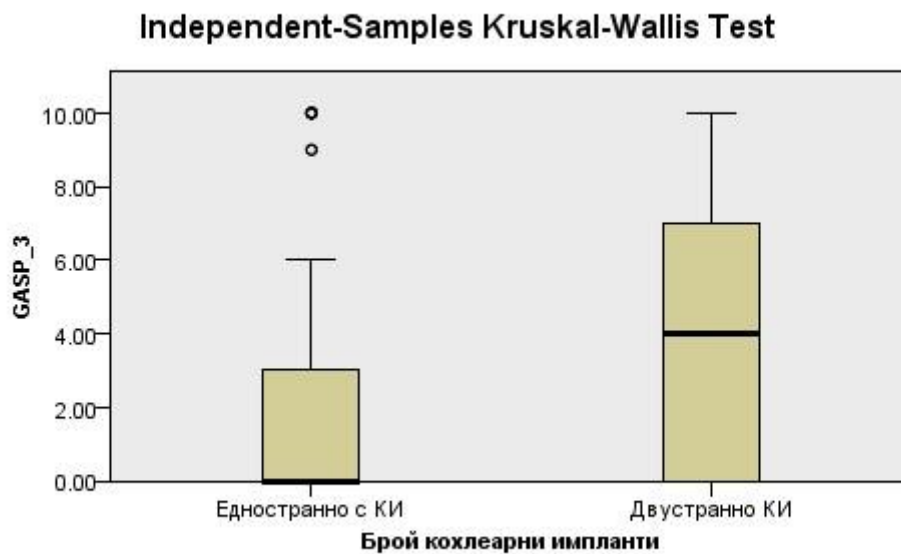
Тенденцията за по-добри резултатите от слуховата рехабилитация при КИ пациенти се запазва при провеждане на теста за възприемане на непознати изречения (SLS) и на 24.месец от КИ като се открива статистическа значимост ($p < 0.05$). По-добри резултати дават пациентите с мутации, водещи до слухова загуба.



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

Фигура 33. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на SLS тест в 24.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.

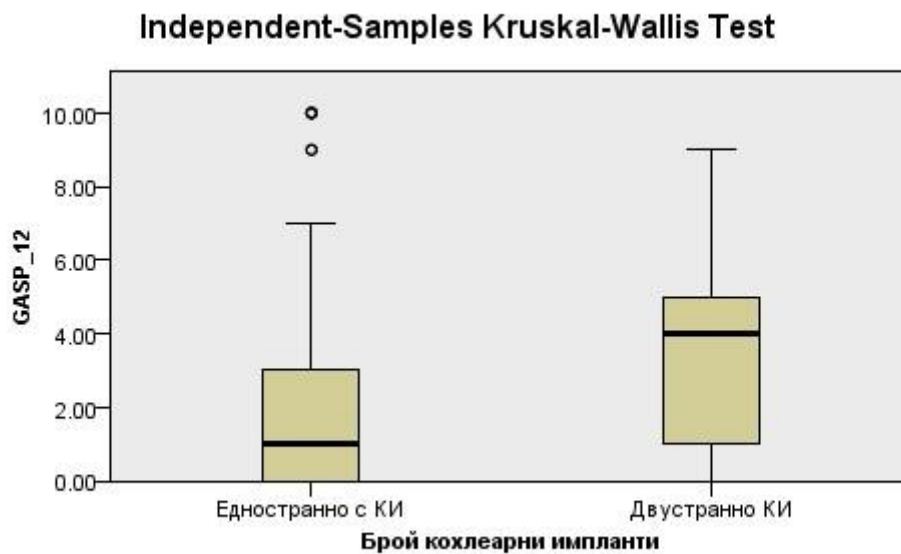


Total N	72
Test Statistic	5.818
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	.016

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

Фигура 34. Резултати от слуховата рехабилитация при провеждане на GASP тест на 3.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. Запазва се статистическата значимост при получените резултати и на дванайстия постоперативен месец ($p < 0.05$) – пациентите с двустранно поставен КИ се представят по-добре в сравнение с тези с едностранен КИ.

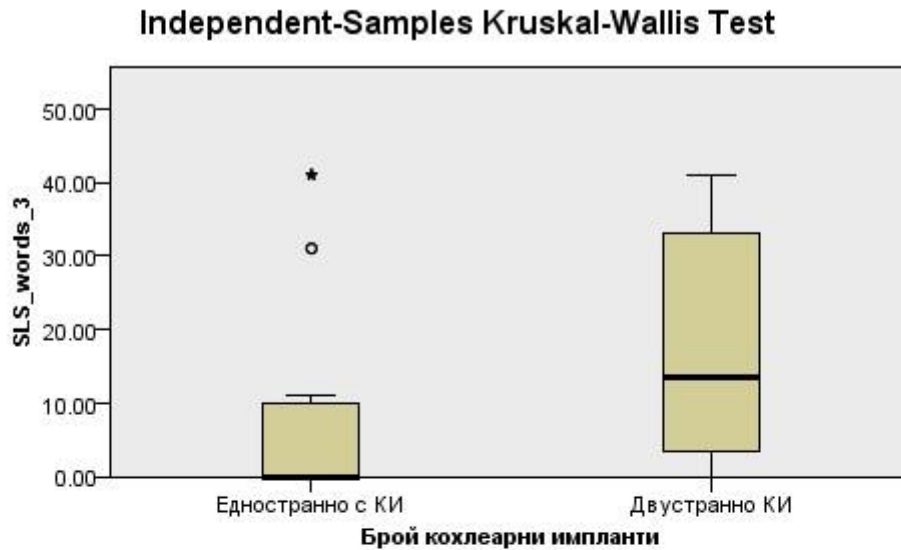


Total N	76
Test Statistic	8.115
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	.004

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

Фигура 35. 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 ($p < 0.05$).



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

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

Фигура 36. 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

При съвместен проект на Катедрата по УНГ болести към УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“ с Центъра по молекулярна 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, използвайки таргетно новогенерационно секвениране; определяне честотата, клиниката и генетичната характеристика на слуховата увреда. Пациенти бяха подбрани сред всички 192 участващи в изследването. Клиничните данни на подбраните пациенти са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Клинични данни на подбраните 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	
DF139	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	Нормален слух	51	

			линия			
DF203		родственик	брат	Тежко чуване (30-60 dB)	23	От около 10 год. възраст
DF182	4	пробанд		Пълна слухова загуба (над 90 dB)	43	В началото на пубертета
DF204		родственик	дъщеря	Тежко чуване (30-60 dB)	21	От детска възраст
DF205		Няма роднинска връзка	съпруг	Нормален слух	45	
DF210		5	пробанд		Тежко чуване (30-60 dB)	43
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 Сх26 (GJB2), Сх30 (GJB6) и Сх31 (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.

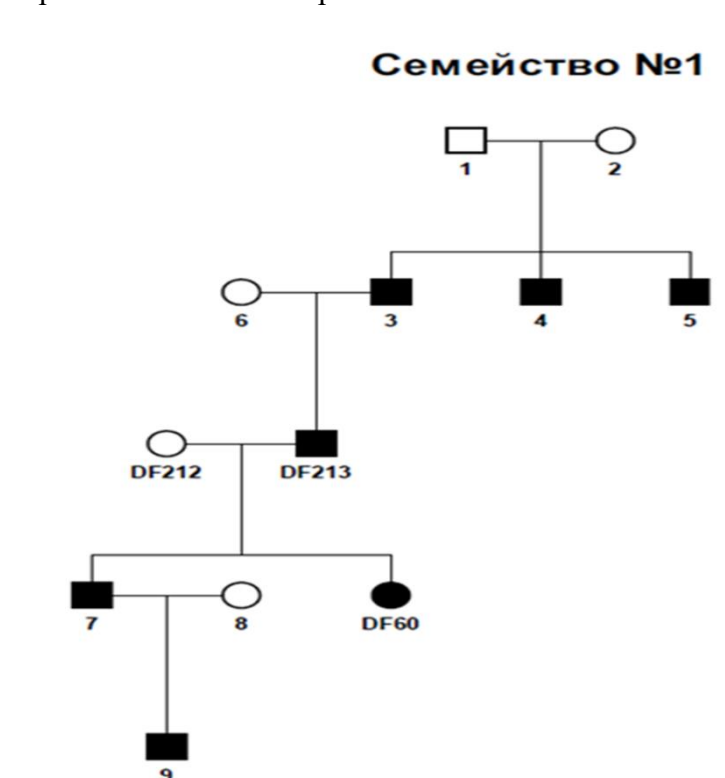
Подбраният генен панел включва 212 гена, които са свързани с развитието на глухота (както синдромна, така и несиндромна):

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, MITF, 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).

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



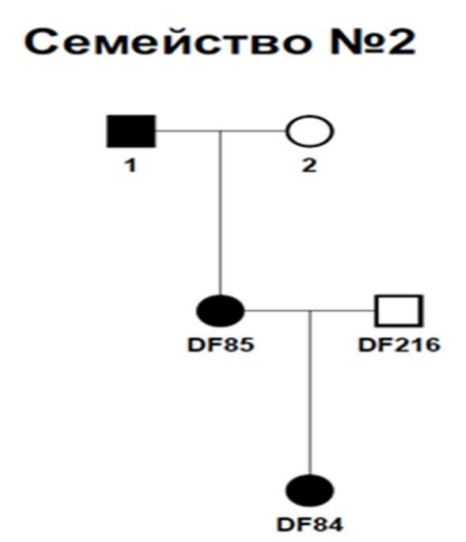
Фигура 37. Родословно дърво на пробанд DF60.

Откриват се два варианта с неясно клинично значение .

Вариантът в *COL9A3* е вариант с неясно клинично значение. Програмите за предикция на патогенността дават противоречиви резултати. 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. 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. 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. Ролята на този вариант в развитието на невросензорна слухова загуба не е потвърдено [Vona B et al, 2014; Arbustini Eloisa AE et al, 2005]. 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.



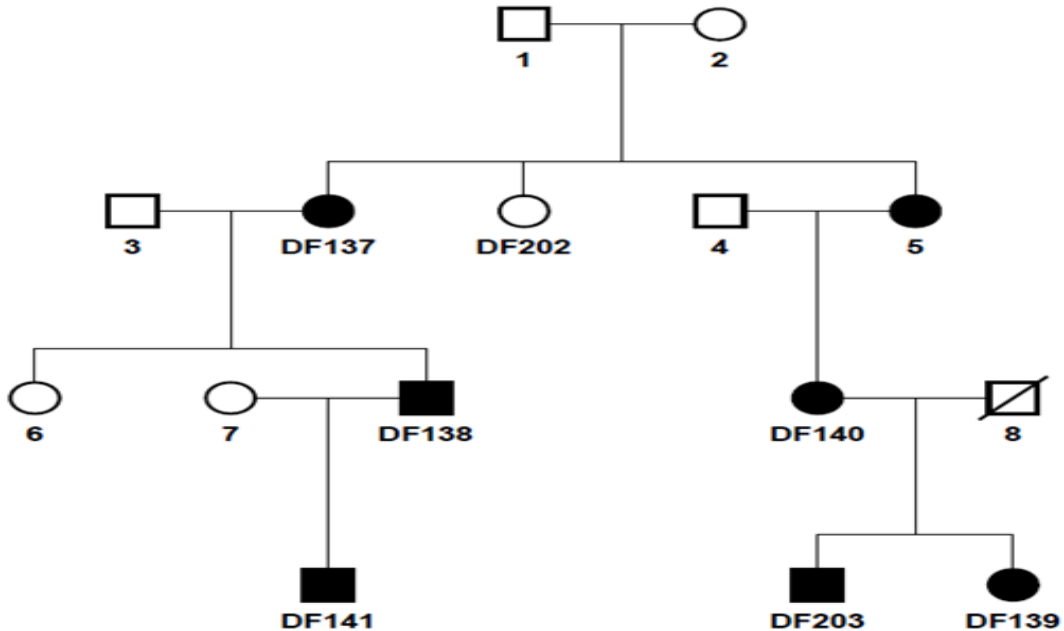
Фигура 38. Родословно дърво на пробанд DF84.

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) 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

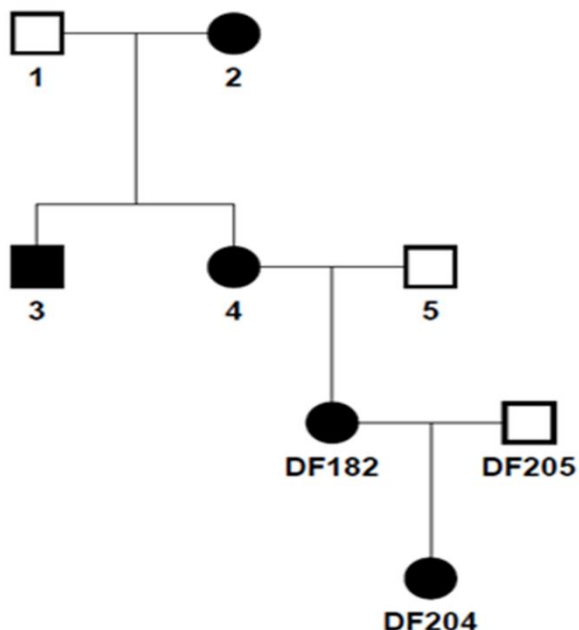


Фигура 39. Родословно дърво на пробанд DF139.

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. ОТОА гена (DFNB22) или отоанкорин кодира протеин, който се експресира във вътрешното ухо. Локализира се между апикалната повърхност на сензорния епител на вътрешното ухо и надлежащия ацелуларен гел. Протеинът участва в прикрепването на ацелуларния гел към апикалната повърхност на клетките. Както дупликации, така и делеции в ОТОА се свързват с клиничен фенотип при автозомно рецесивна несиндромна глухота [Shearer AE. Et al, 2014].

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. 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

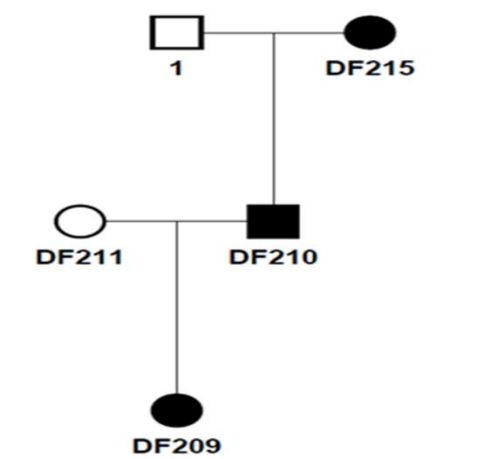


Фигура 40. Родословно дърво на пробанд DF182.

При това семейство се предполага, че глухотата е унаследена по автосомно 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.

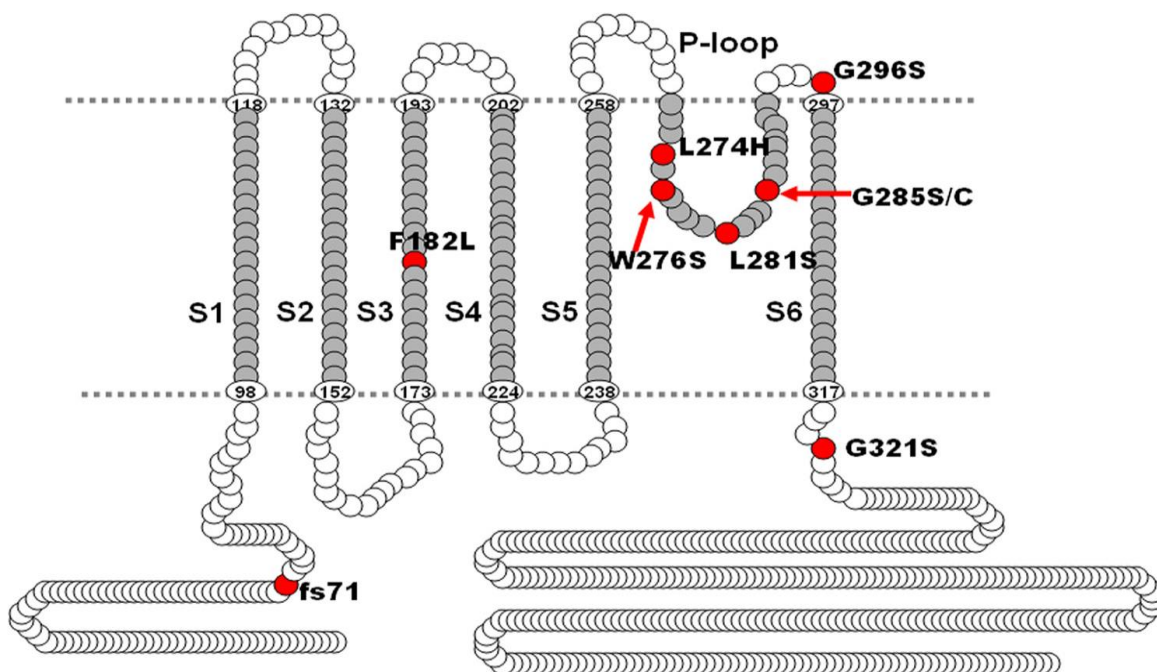
При пациент DF210 (мъж на 43 годишна възраст) се откри в хетерозиготно състояние варианта c.853G>A (p.Gly285Ser) в екзон 6 на гена **KCNQ4** (NM_004700.3, NP_004691.2).

Семейство №5



Фигура 41. 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 42. Схематично представяне на белтъчната структура на hKv7.4. Част от известните мутации са показани с червени стрелки.

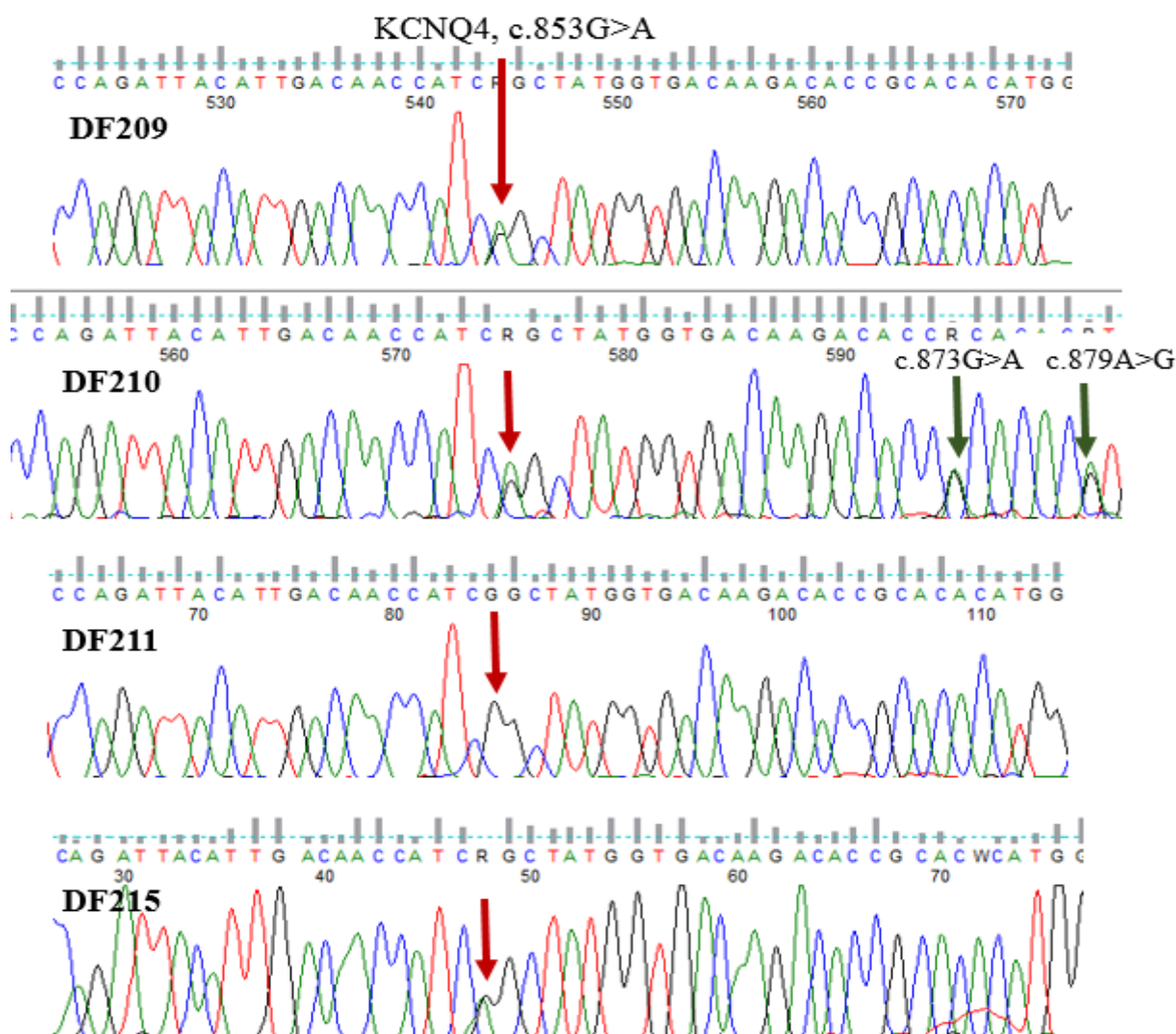
Откритият вариант с.853G>A (p.Gly285Ser) при DF210 е известен патогенен вариант, чиято позиция се вижда на Фигура 42. Тази мутация засяга първият глицинов остатък в GYG аминокиселинната последователност в пората. Глициновият остатък е високо консервативен сред различните класове K⁺ канали при различни видове. Кристалната структура на *Streptomyces lividans* K⁺ 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].

При семейство №5 мутацията в **KCNQ4** с.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 2.

Таблица 2. 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 43. Електрофореграми, показващи част от секвенцията на екзон 6 на гена KCNQ4 при семейство №5. Вариантите показани със зелени стрелки при DF210 са синонимни: c.873G>A (p.Pro291Pro) и c.879A>G (p.Thr293Thr). С червени стрелки е показан варианта c.853 G>A.

6. 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 ССЕП. При 40.1% от изследваните деца (n = 77) ССЕП не се регистрират- т.е 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 Sx26 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.W24W в хомозиготно състояние. В световната литература висока честота на тази мутация е описана при индийците. При изследване сред бразилци [2] тази мутация не е регистрирана. Мутацията c.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 Sx26 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 Sx26 или при наличието на такава в

хетерозиготно състояние, скрининга продължи с търсенето на мутации в последователно в GJB3 гена, кодиращ конексин 31 протеина.

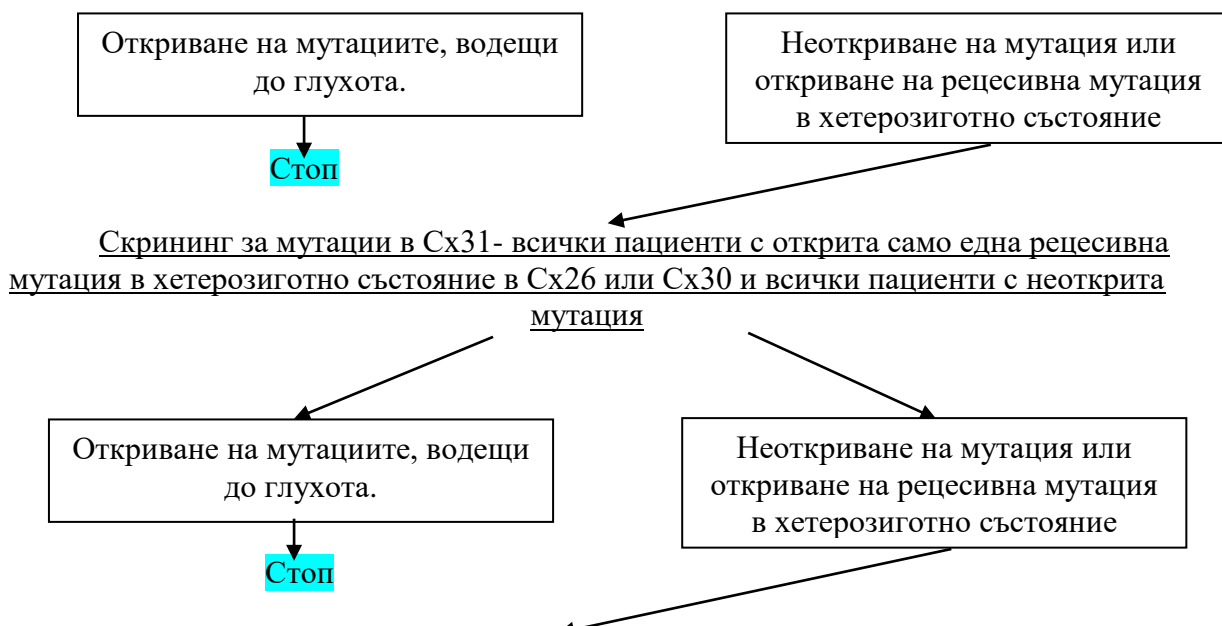
Пряко взаимодействие между Cx26 и Cx30 протеините, засягащо функцията на каналите (gap junction channels) се съобщава [3]. От проведените проучвания за ко-експресия става ясно, че Cx26 и Cx30 олигомеризират, за да образуват хетеромерни съединения (connexons) и някои мутации оказват доминантно отрицателен ефект върху двата конексина. Проучвания също съобщават, че взаимодействието между Cx30 и Cx26 модифицира пропускливостта на клетките. Съобщената честота при някои проучвания [4] 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% [4]. В проучване проведено сред 303 индийци [5] 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 [6]. 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 [7]. Мутантът може също да понижи Cx26 /WT втретклетъчния 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 44. Алгоритъм на генетичен скрининг.

Голям брой публикации установат 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 получиха 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 изневялата 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 голяма 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 [8]. Lip теста е предназначен за деца над две годишна възраст като в изследваната от нас група участват и деца под 24 месеца (фигура 18).

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 [9,10]. 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 14 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 [9,10] 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 [8] отбелязват, че това подобрене 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 подобрите 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 замената 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^+ потоци [Kubisch C. et al, 1999]. Дисфункционирането 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 T.J. 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 хозомозиготно 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 3.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	с.35delG/c.35delG	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)
	с.35delG/WT	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>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)
Общо		43	78	41.48%		

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 c.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 p.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 послингвалната (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-дубликация 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. 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.
2. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, Andressa Barbosa, Marília Santiago, Mariana Provetti, Raquel Spinassé Dettogni, Thais Tristão Tovar, Eliete Rabbi-Bortolini, Iúri 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
3. 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
4. Arti Pandya, MD1, Kathleen S. Arnos, PhD2, Xia J. Xia, PhD1, Katherine O. Welch, MS2, Susan H. Blanton, PhD3, Thomas B. Friedman, PhD4, Guillermina García 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.
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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.
9. 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.
10. O'Donoghue GM, Nikolopoulos TP, Archbold SM. Determinants of speech perception in children after cochlear implantation. *Lancet*, 2000; 356:466–468.

Списък с публикациите свързани с дисертационния труд:

1. Darina Kachakova ¹, Orlin Stoyanov ², Gyulnas Dzhebir ¹, Spiridon Todorov², Sonia Varbanova², Todor Popov², **Venera Dobryanova²**, Vanio Mitev ¹, Diana Popova ² and Radka Kaneva ¹. Association analysis of *RELN* and *BMP2* variants with otosclerosis in Bulgaria. *Доклади на БАН* [in press] [Impact factor 0,32]
2. **В.Добриянова**, И.Станчева, С.Върбанова, Д.Попова. Отоакустични емисии. *MEDICAL Magazine* (специализирано издание за лекари) 57/9.2018
3. Д.Попова, С.Върбанова, Иг.Станчева, **В.Добриянова**. Генетични основи на наследствената слухова загуба. *MED INFO* (медицинско списание) 03/2019
4. Ю.Хаджиев, О.Стойнов, Ст.Йорданов, Ю.Рангачев, С.Вълчева, **В.Добриянова**. Роля на ВРІFА1 протеина при хроничен гноен отит. *MEDICAL magazine* (специализирано издание за лекари) [под печат]

Участия в конгреси свързани с дисертационния труд

1. Пролетна Научна конференция „Съвременни концепции в лечението на ушите, носа и гърлото“ 12-14 април 2019 г., хотел "РИУ Правец", гр. Правец
В. Добриянова, О. Стоянов, Д. Попова, С. Върбанова. Алгоритъм на генетичен скрининг при глухота
2. Научна конференция „Съвременни концепции в лечението на ушите, носа и гърлото“ 19-21 октомври 2018г гр. Пловдив
В. Добриянова, И. Станчева, Д. Попова, С. Върбанова. Търсене на генетичните причини за глухота в пациенти с наследствена слухова загуба
3. 90th Annual Meeting of the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery from 29 May- 01 June 2019 in the congress venue Estrel Congress Center Berlin (Germany)
V.Dobriyanova, D.Popova, D.Kachakova, I.Stancheva, S.Varbanova
Next generation sequencing of the patients with hereditary neurosensory hearing loss to clarify the genetic cause of hearing impairment.

Участия в проекти свързани с дисертационния труд:

Изследователски проект с вх.№8420/08.12.2016г. на тема: „Секвениране от ново поколение на пациенти с наследствена навросензорна слухова загуба за изясняване на генетичната причина за слуховата увреда“ от конкурса „ГРАМТ-2017“ на МУ- София