

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VIOLETA MIKŠTIENĖ

ĮGIMTO / PAVELDIMO KLAUSOS SUTRIKIMO GENOMIKA: ĮTAKA
PATOGENEZEI IR FENOTIPINEI IŠRAIŠKAI LIETUVOS POPULIACIJOJE

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, Medicina (06 B)

Vilnius, 2017 metai

Disertacija rengta 2013–2017 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas,
biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Loreta Cimbalistienė (Vilniaus universitetas,
biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
I. ĮVADAS	21
I.1.Tiriamoji problema, jos aktualumas	21
I.2.Tyrimo tikslas	23
I.3.Tyrimo uždaviniai	23
I.4.Darbo naujumas ir reikšmė	23
I.5.Ginamieji teiginiai.....	24
I.6.Darbo aprobacija	24
II. TYRIMŲ APŽVALGA	28
II.1. Klausos sutrikimo apibrėžtis.....	28
II.2. Klausos sutrikimo klasifikacija.....	28
II.3. Klausos jutimo organų sistemos ir jos ligų tyrimų istoriniai aspektai.....	29
II.4. Modernieji klausos sutrikimo genetiniai tyrimai	31
II.5. Klausos jutimo organų sistemos vystymasis	37
II.6. Garso suvokimo procesas klausos jutimo organų sistemoje.....	40
II.7. Įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo etiologija.....	42
II.8. Paveldimo klausos sutrikimo mechanizmai.....	43
II.9. Klinikiniai paveldimo klausos sutrikimo aspektai.....	56
II.10. Paveldimo klausos sutrikimo genetinė diagnostika.....	64
II.11. Klausos sutrikimo gydymo perspektyvos.....	66
II.12. Klausos sutrikimo genomikos reikšmė.....	69
III. METODAI	70
III.1. Mokslinio tyrimo plano sudarymas	70

III.1.1. Tiriamųjų asmenų atrankos kriterijų pasirinkimas.....	71
III.1.2. Tiriamųjų asmenų duomenų rinkimas.....	72
III.1.3. Tiriamųjų genetinio tyrimo plano sudarymas	72
III.1.4. Duomenų analizės plano ruošimas	74
III.1.5. Genetinės klausos sutrikimo diagnostikos rekomendacijų rengimas...	74
III.1.6. Mokslinė rezultatų sklaida	75
III.2. Empirinis tyrimas.....	75
III.2.1. DEAFGEN biomedicininio tyrimo grupės klinikinių duomenų rinkimas	75
III.2.2. Genetiniai tyrimai DEAFGEN tiriamųjų asmenų grupėje	76
III.2.3. LITGEN tiriamųjų asmenų grupės genetinių tyrimų duomenų rinkimas	84
III.3. Duomenų analizė	85
IV. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	87
Lietuvos populiacijos tiriamųjų asmenų, turinčių klausos sutrikimą, grupė.....	87
IV.1. Izoliuotą (nesindrominį) klausos sutrikimą turinčių tiriamųjų asmenų pogrupio duomenų analizės rezultatai	88
IV.1.1. Klinikinio ištyrimo rezultatai	88
IV.1.2. Genetinio tyrimo rezultatai.....	89
IV.1.3. Klausos sutrikimo etiologinė struktūra	123
IV.1.4. Nustatytų genetinių pokyčių koreliacijos su tiriamųjų fenotipu tyrimo rezultatai.....	128
IV.2. Sindrominio klausos sutrikimo pogrupio charakterizavimas	135
IV.2.1. Klinikinio ištyrimo rezultatai	135
IV.2.2. Klausos sutrikimo etiologinė struktūra	136

IV.2.3. Retas (pirmas Lietuvoje) sindrominio klausos sutrikimo atvejis.....	141
IV.3. Genetinio tyrimo rezultatai sveikų lietuvių populiacijos asmenų grupėje (LITGEN)	149
IV.3.1. AR paveldėjimo KS genų tyrimo rezultatai	149
IV.3.2. XR paveldėjimo KS genų tyrimo rezultatai	152
IV.3.3. AR paveldėjimo klausos sutrikimo dažnis lietuvių populiacijoje.....	156
IV.4. Įgimto / paveldimo klausos sutrikimo genetinio ištyrimo gairės	158
V. IŠVADOS	166
LITERATŪRA	168
PRIEDAI	202

SANTRUMPOS

1000genomes_all – 1000 genomų projekto visų tirtų populiacijų duomenys

A – adeninas

AAV – su adenovirusu susijęs virusas (angl. *adeno-associated virus*)

ABR – klausos sukeltų smegenų kamieno potencialų tyrimas (angl. *auditory brainstem response*)

ACMG – Amerikos medicinos genetikos ir genomikos kolegija (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics*)

ACTG1 – gama aktino genas 1 (angl. *actin, gamma 1*)

AD – autosominis dominantinis paveldėjimas

Ala – alaninas

AntiGAD65 – antikūnai prieš kasos beta ląstelių glutamino rūgšties dekarboksilazę (angl. *anti glutamic acid decarboxylase*)

Anti-IA2 – antikūnai prieš kasos beta ląstelių tirozino fosfatazę (angl. *anti tyrosine phosphatase*)

AR – autosominis recesyvus paveldėjimas

Arg – argininas

Asn – asparaginas

Asp – aspartatas

ASSR – stabilios būsenos sukeltųjų potencialų tyrimas (angl. *Auditory steady state response*)

Atoh1 – transkripcijos veiksnį koduojantis genas pelių genome (angl. *atonal, drosophila, homolog of, 1*)

ATOH1 – transkripcijos veiksnys žmogaus ląstelėse (angl. *atonal, drosophila, homolog of, 1*)

ATP – adenzino trifosfatas

AUNA1 – autosominio dominantinio paveldėjimo klausos neuropatija 1 (angl. *Auditory neuropathy, autosomal dominant, 1*)

BAM – binarinio sekoskaitos duomenų formato failas (angl. *binary file format*)

BTD – biotinidazės genas

BMP – kaulų morfogenetinis baltymas (angl. *bone morphogenetic protein*)

BOR – branchiootorenalinis sindromas

Bp – bazių poros

C – citozinas

CATSPER2 – spermatozoidų katijonų kanalo genas 2 (angl. *Cation channel, sperm-associated, 2*)

CCDC50 – baltymo, turinčio susisukusią spiralę, genas 50 (angl. *Coiled-coil domain-containing protein 50*)

CDH23 – kadherinų šeimos baltymo 23 genas (angl. *Cadherin-related family, member 23*)

CEBPE – transkripcijos veiksnys (angl. *CCAAT/enhancer-binding protein, epsilon*)

CEACAM16 – su karcinogeniniu antigenu susijusios 16-os ląstelės adhezijos molekulės genas (angl. *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16*)

CHARGE sindromas – akies koloboma, širdies ydos, choanų atrezija, raidos atsilikimas, genitalijų anomalijos, ausų anomalijos ir (ar) kurtumas (angl. *CHARGE association: coloboma of the eye; heart anomaly; atresia, choanal; retardation of mental and somatic development; microphallus; ear abnormalities and/or deafness*)

CHD7 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *Chromodomain helicase DNA-binding protein 7*)

Chr – chromosoma

CHREBP (MLX) – transkripcijos veiksnys (angl. *Carbohydrate response element-binding protein, rat, homolog of*)

CLDN14 – klaudino 14 genas (angl. *Claudin 14*)

ClinVAR – NCBI duomenų bazė, kurioje kaupiami duomenys apie genomo variantų patogeniškumą

CMV – citomegaloviruso infekcija

COCH – kochlino genas (angl. *Cochlin*)

COL2A1 – 2-o tipo kolageno $\alpha 1$ grandinės genas (angl. *Collagen, type II, alpha-1*)

COL4A3 – 4-o tipo kolageno $\alpha 3$ grandinės genas (angl. *Collagen, type IV, α -3*)

COL4A4 – 4-o tipo kolageno $\alpha 4$ grandinės genas (angl. *Collagen, type IV, α -4*)

COL4A5 – 4-o tipo kolageno $\alpha 5$ grandinės genas (angl. *Collagen, type IV, α -5*)

COL11A1 – 11-o tipo kolageno $\alpha 1$ grandinės genas (angl. *Collagen, type XI, α -1*)

COL11A2 - 11-o tipo kolageno $\alpha 1$ grandinės genas (angl. *Collagen, type XI, α -2*)

Cys – cisteinas

CRISPR/Cas9 – genomo redagavimo sistema (angl. CRISPR – *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Casp9 – kaspazė 9)

Cx26 – koneksinas 26

dB – decibelas

dbSNP – genų variantų duomenų bazė (angl. *Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations*)

DEAFGEN – biomedicininio tyrimo „Įgimto / paveldimo klausos sutrikimo genomika: įtaka patogenezei, fenotipinei išraiškai, gydymo efektyvumui“ akronimas

Delta1 – ląstelių diferenciaciją reguliuojantis veiksnys, Notch receptorių ligandas (angl. *Delta, drosophila, homolog of, 1*)

DEC2 (BHLHE41) – transkripcijos veiksnys, *spiralė – kilpa – spiralė* baltymų šeimos narys E41 (angl. *Basic helix-loop-helix family, member E41*)

DFNA – genetinė sritis, siejama su autosominio dominantinio paveldėjimo klausos sutrikimu

DFNB – genetinė sritis, siejama su autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu

DFNM – genetinė sritis, modifikuojanti klausos sutrikimą

DFNX – genetinė sritis, siejama su X recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu

DIAPH1 – baltymo, reguliuojančio ląstelės morfologiją ir citoskeleto sandarą, genas 1 (angl. *Diaphanous, drosophila, homolog of, 1*)

DIAPH3 – baltymo, reguliuojančio ląstelės morfologiją ir citoskeleto sandarą, genas 3 (angl. *Diaphanous, drosophila, homolog of, 3*)

Dlx5 – transkripcijos veiksnys (angl. *Distal-less homeobox 5*)

Dlx6 – transkripcijos veiksnys (angl. *Distal-less homeobox 6*)

DNR – deoksiribonukleino rūgštis

DSPP – dentino sialofosfoproteino genas (angl. *Dentin sialophosphoprotein*)

DVD – klausos sutrikimo genų variantų duomenų bazė (angl. *Deafness Variation Database*)

EDN3 – endotelino 3 genas (angl. *Endothelin 3*)

EDNRB – endotelino receptoriaus B genas (angl. *Endothelin receptor, type b*)

EGR1 – ankstyvo augimo atsako baltymas 1 (angl. *Early growth response 1*)

EKG – elektrokardiograma

EMQN – Europos molekulinų genetinių tyrimų kokybės kontrolės tinklas (angl. *The European molecular genetics quality network*)

ENCODE – tarptautinis funkcinų genomo elementų analizės konsorciumas (angl. *Encyclopedia of DNA Elements*)

ESPN – espino genas (angl. *Espin, mouse, homolog of*)

ESRRB – į estrogeno receptorių panašaus baltymo beta genas (angl. *Estrogen-related receptor, beta*)

ESRRA – į estrogeno receptorių panašus baltymas alfa (angl. *Estrogen-related receptor, alpha*)

ExAC – viso egzomo duomenų kaupimo ir analizės konsorciumas (angl. *The Exome Aggregation Consortium*)

ExAC_all – ExAC konsorciumo visų populiacijų duomenys

EYAI – baltymo, reguliuojančio genus, koduojančius augimo veiksnius ir ląstelių proliferacijai svarbias signalines molekules, genas 1 (angl. *Eyes absent 1*)

EYA4 – baltymo, reguliuojančio genų, koduojančius augimo veiksnius ir ląstelių proliferacijai svarbias signalines molekules, genas 4 (angl. *Eyes absent 4*)

F – tiesioginis pradmuo (angl. *forward*)

FGF – fibroblastų augimo veiksnys (angl. *fibroblast growth factor*)

FOSL1 – transkripcijos veiksnys, svarbus kaulų formavimuisi ir remodeliacijai (angl. *Fos-like antigen 1*)

Foxi1/3 – transkripcijos veiksniai, reguliuojantys ląstelių proliferacijos, diferenciacijos procesuose dalyvaujančių genų raišką (angl. *Forkhead box 1,3*)

Esp6500siv2_all – Egzomo sekoskaitos projekto (angl. *NHLBI GO Exome Sequencing Project – ESP*) visų tirtų asmenų duomenys

Fs – rėmelio poslinkis (angl. *frameshift*)

G – guaninas

Gbx2 – transkripcijos veiksnys, reguliuojantis smegenų vystymosi procese dalyvaujančių genų raišką (angl. *Gastrulation brain homeobox 2*)

GEN+ – izoliuoto klausos sutrikimo tiriamųjų pogrupio asmenys, kuriems genetinė ligos priežastis nustatyta

GEN+/- – izoliuoto klausos sutrikimo tiriamųjų pogrupio asmenys, kuriems nustatytas vienas AR paveldėjimo heterozigotinis variantas

GEN- – izoliuoto klausos sutrikimo tiriamųjų pogrupio asmenys, kuriems genetinė ligos priežastis nenustatyta

GERP++ – bioinformacinės analizės įrankis (angl. *Genomic Evolutionary Rate Profiling*)

GJB2 – plyšinių tarpląstelinių jungčių baltymą 2 koduojantis genas (angl. *gap junction binding 2*)

GJB3 – plyšinių tarpląstelinių jungčių baltymą 3 koduojantis genas (angl. *gap junction binding 3*)

GJB6 – plyšinių tarpląstelinių jungčių baltymą 6 koduojantis genas (angl. *gap junction binding 6*)

Gly – glicinas

Gln – glutaminas

Glu – glutamatas

GPR98 – su G baltymu susijusio receptoriaus genas 98 (angl. *G protein-coupled receptor 98*)

GRHL2 – transkripcijos veiksnys, dalyvaujantis epitelio morfogenezėje ir epidermio vystymosi procese (angl. *Grainyhead-like 2*)

Hb – hemoglobino koncentracija kraujyje

HbA1c – gliukuoto hemoglobino dalis

Hey1 – transkripcijos veiksnys 1, svarbus ląstelių diferenciacijai ir jungčių formavimuisi (angl. *Hairy/enhancer of split-related with YRPW motif 1*)

Hey2 – transkripcijos veiksnys 2, svarbus ląstelių diferenciacijai ir jungčių formavimuisi (angl. *Hairy/enhancer of split-related with YRPW motif 2*)

HGMD – Žmogaus genų patogeninių variantų duomenų bazė (angl. *The Human gene mutation database*)

His – histidinas

Hmx2 – transkripcijos veiksnys, dalyvaujantis embriogenezėje (angl. *H6 family homeobox 2*)

Hmx3 – transkripcijos veiksnys, dalyvaujantis embriogenezėje (angl. *H6 family homeobox 3*)

H-V – Hardžio ir Vainbergo pusiausvyra

ILDRI – į imunoglobuliną panašų domeną turintis receptoriaus genas (angl. *Immunoglobulin-like domain-containing receptor 1*)

Ile – izoleucinas

IP3 – inozitolio trifosfatas

IQ domenas – baltymą kalmoduliną prijungiantis domenas (angl. *IQ motif*)

iRNR – informacinė RNR

ĮKS – įgimtas klausos sutrikimas

ĮPKS – įgimtas paveldimas klausos sutrikimas

JLNS2 – *Jervell* ir *Lange–Nielsen* sindromas 2

Kb – kilobazė (1000 bazių porų)

KCNE1 – kalio kanalą formuojantį baltymą koduojantis genas E1 (angl. *Potassium channel, voltage-gated, ISK-related subfamily, member 1*)

KCNE2 – kalio kanalą formuojantį baltymą koduojantis genas E2 (angl. *Potassium channel, voltage-gated, ISK-related subfamily, member 2*)

KCNJ10 – kalio kanalą formuojantį baltymą koduojantis genas J10 (angl. *Potassium channel, inwardly rectifying, subfamily j, member 10*)

KCNQ1 – kalio kanalą formuojantį baltymą koduojantis genas Q1 (angl. *Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1*)

KCNQ4 – kalio kanalą formuojantį baltymą koduojantis genas Q4 (angl. *Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 4*)

KID – keratodermos, ichtiozės, kurtumo sindromas (angl. *keratoderma, ichthiosis, deafness*)

KLF6 – transkripcijos veiksnys (angl. *Kruppel-like factor 6*)

KS – klausos sutrikimas

KT – kompiuterinė tomografija

Leu – leucinas

Lfng – fukozei specifinės beta-1,3-N-acetilgliukozaminiltransferazės genas (angl. *Lunatic fringe*)

LITGEN – projekto „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ akronimas

Lys – lizinas

LOVD – atvira Leideno variantų duomenų bazė (angl. *Leiden Open Variation Database*)

LOXHD1 – homologišką lipoksigenazei domeną turinčio baltymo genas 1 (angl. *Lipoxygenase homology domain-containing 1*)

LRT – bioinformacinės analizės tyrimo įrankis (angl. *Likelihood ratio test*)

LRTOMT – leucino pasikartojimų gausaus baltymo 51 genas (angl. *Leucine-rich repeat-containing protein 51*)

LRRFIP1 – transkripcijos veiksnys, sąveikaujantis su leucino pasikartojančiomis sekomis (angl. *Leucine-rich repeat in FLII-interacting protein 1*)

LTF – transkripcijos veiksnys laktotransferinas (angl. *Lactotransferrin*)

MARVELD2 – MARVEL domeną turinčio baltymo genas 2 (angl. *MARVEL domain-containing protein 2*)

MAF – retojo alelio dažnis (angl. *minor allele frequency*)

MCH – vidutinis hemoglobino kiekis eritrocite (angl. *mean cell hemoglobine*)

MCV – vidutinis eritrocito tūris (angl. *mean cell volume*)

MELAS sindromas – miopatijos, encefalopatijos, laktato acidozės, į insultą panašių epizodų (angl. *mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) sindromas

MERFF sindromas – miokloninės epilepsijos su suirusiomis raumenų skaidulomis (angl. *Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers*) sindromas

Met – metioninas

Mg²⁺ATPazė – ląstelės fermentas (angl. *ATP phosphohydrolase (Mg²⁺-importing)*)

MIDD sindromas – motininės kilmės cukrinis diabetas su klausos sutrikimu (angl. *Diabetes and deafness, maternally inherited*)

MIM – pagal Mendelio dėsnius paveldimų ligų katalogas (angl. *Mendelian Inheritance in Man*)

MIR96 – mikroRNR 96 genas (angl. *MicroRNA 96*)

miRNR – mikroRNR

MITF – su mikrooftalmija susijusio transkripcijos veiksnio genas (angl. *Microphthalmia-associated transcription factor*)

MLPA – dauginė liguojamų zondų amplifikacija (angl. *multiple ligatable probe amplification*)

MLX – transkripcijos veiksnys (angl. *Max-like protein x*)

mtDNR – mitochondrijų DNR

MT-CO1 – mitochondrijų kvėpavimo grandinės IV komplekso citochromo C oksidazės I subvieneto genas (angl. *Complex iv, cytochrome C oxidase subunit I*)

MT-RNR1 – mitochondrijų ribosomų 12S RNR genas (angl. *Ribosomal RNA, mitochondrial, 12S*)

MT-TE – mitochondrijų transportinės RNR, nešančios glutaminą, genas (angl. *Transfer RNA, mitochondrial, glutamic acid*)

MT-TK – mitochondrijų transportinės RNR, nešančios liziną, genas (angl. *Transfer RNA, mitochondrial, lysine*)

MT-TL1 – mitochondrijų transportinės RNR, nešančios leuciną, genas (angl. *Transfer RNA, mitochondrial, leucine*)

MT-TS1 – mitochondrijų transportinės RNR, nešančios seriną, genas (angl. *Transfer RNA, mitochondrial, serine*)

MYH9 – miozino sunkiosios grandinės genas 9 (angl. *Myosin, heavy chain 9, nonmuscle*)

MYH14 – miozino sunkiosios grandinės genas 14 (angl. *Myosin, heavy chain 14, nonmuscle*)

MYO1A – miozino 1a genas (angl. *Myosin 1a*)

MYO3A – miozino 3a genas (angl. *Myosin 3a*)

MYO6 – miozino 6 genas (angl. *Myosin 6*)

MYO7A – miozino 7a genas (angl. *Myosin 7a*)

MYO14 – miozino 14 genas (angl. *Myosin 14*)

MYO15A – miozino 15a genas (angl. *Myosin 15a*)

MyTH4 – baltymo domenas (angl. *myosin tail like homology region 4*)

MZF1 – transkripcijos veiksnys (angl. *Myeloid zinc finger gene 1*)

NCBI – JAV Nacionalinis biotechnologijų informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NeuroD1 – transkripcijos veiksnys (angl. *Neurogenic differentiation 1*)

Neurog1 - transkripcijos veiksnys (angl. *Neurogenin 1*)

NF2 – neurofibromino 2 genas (angl. *Neurofibromin 2*)

NTS – netransliuojama geno seka

Notch – transmembraninių baltymų, reguliuojančių ląstelių diferenciaciją, šeimos genas (angl. *Notch, drosophila, homolog of, 1*)

OAE – otoakustinė emisija

OCLN – okludino genas (angl. *Occludin*)

OMIM – pagal Mendelio dėsnius paveldimų ligų elektroninis katalogas (angl. *Online Mendelian Inheritance in Man*[®])

OR – tikimybių santykis (angl. *odds ratio*)

OR5I1 – uoslės receptorius (angl. *Olfactory receptor, family 5, subfamily I, member 1*)

OTOA – otoankorino genas (angl. *Otoancorin*)

OTOF – otoferlino genas (angl. *Otoferlin*)

P2RX2 – P2X receptoriaus genas (angl. *Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2*)

P19ink4d (*cdkn2d*) – nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitorius 2d (angl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2d*)

p27kip1 (*Cdkn1b*) – nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitorius 1b (angl. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1b*)

p21cip1 (*Cdkn1a*) – su *Cdkn1a* sąveikaujantis baltymas (angl. *Cdkn1a-interacting zinc finger protein 1*)

Pax2 – porinės dėžutės baltymas 2 (angl. *Paired box 2*)

PAX3 – porinės dėžutės baltymo 3 genas (angl. *Paired box gene 3*)

Pax8 – porinės dėžutės baltymas 8 (angl. *Paired box 8*)

PCDH15 – protokadherino genas 15 (angl. *Protocadherin 15*)

PDZ domenai – signalinių baltymų domenai (angl. *postsynaptic density protein*)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

Phe – fenilalaninas

PhyloP – bioinformacinės analizės įrankis (angl. *phylogenetic P-values*)

PI – pasiklivimo intervalas

PJKK – pejvakino genas (angl. *pejvakin*)

PLT – trombocitai (angl. *platelets*)

PMCA2 (ATP2B) – plazminės membranos Ca²⁺ pernešanti ATPazė (angl. *ATPase, Ca(2+)-transporting, plasma membrane, 2*)

PMEAH sindromas – progresuojančios miokloninės epilepsijos, ataksijos, klausos sutrikimo sindromas

Polyphen-2 – bioinformacinės analizės įrankis (angl. *Polymorphism Phenotyping v2*)

POSSUM – dismorfologijos duomenų bazė (angl. *Pictures of standard syndromes and undiagnosed malformations*)

POU domenas – POU baltymų šeimos bendras domenas (angl. *POU domain*)

POU4F3 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *POU domain, class 4, transcription factor 3*)

POU3F4 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *POU domain, class 3, transcription factor 4*)

PPARG – peroksisomų proliferacijos aktyvuojamas gama receptorių (angl. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*)

PRDM5 – PR domeną turintis baltymas 5 (angl. *PR domain-containing protein 5*)

PTPRQ – receptorinės tirozino fosfatazės genas (angl. *protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, Q*)

Pro – prolinas

PUBMED – elektroninė medicinos mokslo publikacijų, gyvybės mokslų žurnalų, elektroninių knygų duomenų bazė

QTc – koreguotas QT intervalas (elektrokardiogramoje)

R – atvirkštinis pradmuo (angl. *reverse*)

Rb1 – retinoblastomos genas 1 (angl. *Rb1*)

RBC – eritrocitų kiekis kraujyje (angl. *red blood cells*)

RDX – radiksinos genas (angl. *radixin*)

RFX1 – transkripcijos veiksnys (angl. *regulatory factor X, 1*)

RNR – ribonukleino rūgštis

RREB1 – RAS atsako elementus sujungiantis baltymas (angl. *RAS-responsive element binding protein 1*)

s. – sindromas

SbTh – sulbutiaminas

Serrate2 – Notch receptoriaus ligandas

SH3 domenas – signalinių kelių baltymų domenas (angl. *SRC Homology 3 Domain*)

Shh – morfogenas (angl. *sonic hedgehog*)

SIFT – bioinformacinės analizės įrankis (angl. *Sorting Tolerant From Intolerant*)

Six1 – transkripcijos veiksnys (angl. *Sine oculis homeobox, drosophila, homolog of, 1*)

SIX1 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *Sine oculis homeobox, drosophila, homolog of, 1*)

SIX5 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *Sine oculis homeobox, drosophila, homolog of, 5*)

SLC12A2 – transmembraninio jonų nešiklio genas (angl. *Solute carrier family 12 (sodium/ potassium/ chloride transporter), member 2*)

SLC17A8 – transmembraninio nešiklio genas (angl. *Solute carrier family 17 (vesicular glutamate cotransporter), member 8*)

SLC19A2 – transmembraninio nešiklio genas (angl. *Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2*)

SLC26A4 – transmembraninio nešiklio genas (angl. *Solute carrier family 26, member 4*)

Sox2 – transkripcijos inhibitorius (angl. *SRY-box 2*)

Sox9 – reguliuojančio baltymo genas (angl. *SRY-box 9*)

SOX10 – transkripcijos veiksnio genas (angl. *SRY-box 10*)

Sp1 – transkripcijos veiksnys (angl. *Transcription factor Sp1*)

SPI1 – transkripcijos veiksnys (angl. *Spleen focus forming virus proviral integration oncogene SPI1*)

STRC – stereocilino genas (angl. *Stereocilin*)

SVEIDRA – sveikatos draudimas

T – timinas

Tbx1 – transkripcijos veiksnys (angl. *T-box 1*)

TCOF1 – Treacher–Collins sindromo genas (angl. *TCOF1 gene*)

TECTA – alfa tektorino genas (angl. *Tectorin, alpha*)

Ter – priešlaikinė baltymo sintezės baigmė

TFCP2L3(*GRHL2*) – transkripcijos veiksnio genas (angl. *Grainyhead-like 2*)

Thr – treoninas

TIMM8A vidinės mitochondrijų membranos translokazės 8 genas A (angl. *Translocase of inner mitochondrial membrane 8, yeast, homolog of, A*)

Tyr – tirozinas

TJP2 – sandariąją jungtį sudarančio baltymo genas (angl. *Tight junction protein 2*)

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

TMC1 – į transmembraninį kanalą panašaus baltymo genas 1 (angl. *Transmembrane channel-like protein 1*)

TMHS – plaukuotųjų ląstelių streocilijų membranos baltymo genas (angl. *Tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia*)

TMIE – transmembraninio vidinės ausies baltymo genas (angl. *Transmembrane inner ear-expressed gene 1*)

TMPRSS3 – transmembraninės serino proteazės genas 3 (angl. *Transmembrane protease, serine 3*)

TPRN – taperino genas (angl. *Taperin*)

TRIC – triceliulino genas (angl. *Tricellulin*)

TRIOBP – TRIO domeną ir F-aktiną sujungiančio baltymo genas (angl. *TRIO- and F-actin-binding protein*)

TRMA sindromas – nuo tiamino priklausoma megaloblastinė anemija (angl. *thiamine responsive megaloblastic anemia*)

tRNR – transportinė RNR

Trp – triptofanas

TV – transkripcijos veiksnys

UCSC – Kalifornijos Santa Kruzo universitetas, JAV (angl. *University of California Santa Cruz*)

USF1/2 – transkripcijos veiksniai (angl. *Upstream stimulatory factor 1 and 2*)

USH1C – Usher sindromo genas 1C (angl. *USH1C gene*)

USH1G (SANS) – Usher sindromo genas 1G (angl. *USH1G gene*)

USH2A – Usher sindromo genas 2A (angl. *USH2A gene*)

Val – valinas

VES – viso egzomo sekoskaita

VLGR1B (ADGRV1) – su G baltymu susijusio adhezijos receptoriaus V1 genas (angl. *adhesion G protein-coupled receptor V1*)

VGLUT3 (SLC17A8) – glutamato nešiklio per vezikulių (pūslelių) membraną genas (angl. *solute carrier family 17 (vesicular glutamate cotransporter), member 8*)

vLGH – vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija

VNP-LGH – vieno nukleotido polimorfizmo genotipavimo lyginamoji genomo hibridizacija

VNV – vieno nukleotido variantas

Vs – lyginant (lot. *versus*)

VŠĮ VUL SK ANGC – Viešosios įstaigos Vilniaus universitetinės ligoninės Santaros klinikų Ausų, nosies ir gerklės centras

VŠĮ VUL SK MGC – Viešosios įstaigos Vilniaus universitetinės ligoninės Santaros klinikų Medicininės genetikos centras

VŠĮ VUL SKF VL – Viešosios įstaigos Vilniaus universitetinės ligoninės Santaros klinikų filialas Vaikų ligoninė

WBC – leukocitų kiekis kraujyje (angl. *white blood cells*)

WFS1 – volframino genas (angl. *Wolframin*)

WHRN – virolino genas (angl. *Whirlin*)

Wnt – signalinis kelias, reguliuojantis ląstelės transkripciją (angl. *Wingless-related integration site*)

XD – su X chromosoma susijęs dominantinis paveldėjimas

XR – su X chromosoma susijęs recesyvus paveldėjimas

ZNF219 – transkripcijos veiksnys „cinko pirštelio“ baltymas 219 (angl. *Zinc finger protein 219*)

ZNF300 – transkripcijos veiksnys „cinko pirštelio“ baltymas 300 (angl. *Zinc finger protein 300*)

ZNF658 – transkripcijos veiksnys „cinko pirštelio“ baltymas 658 (angl. *Zinc finger protein 658*)

I. ĮVADAS

„Aklumas atskiria mus nuo daiktų, o kurtumas – nuo žmonių.“

Helen Keller (1880–1968)

I.1. Tiriamoji problema, jos aktualumas

„Esu tiek pat kurčia, kiek ir akla. Tačiau kurtumas man yra gilesnė, sudėtingesnė ir, ko gero, svarbesnė problema nei aklumas. Kurtumas yra daug didesnė nesėkmė. Nes ji reiškia praradimą gyvybiškai svarbių stimulų – balso garsų, iš kurių kyla kalba, minčių judesys ir bendrumas su šalia esančiu žmogumi“. Šios Helen Keller (humanitarės, pedagogės, aktyvistės, apkurtusios ir apakusios antraisiais gyvenimo metais) mintys iliustruoja ne tik fiziologinį ir psichologinį klausos sutrikimo aspektus, bet ir socialinės atskirties būseną.

Klausa yra vienas iš penkių jutimo organų, kuriuo kuriamas ryšys su aplinka. Ikikalbinis klausos pažeidimas sutrikdo vaiko kalbinę, emocinę ir intelektinę raidą. Žmogus, būdamas bendruomeninės prigimties, turi bendravimo, santykio su kitais žmonėmis kūrimo poreikį, todėl negalėjimas girdėti yra tiek asmeninė, tiek visuomenės problema, kelianti ilgalaikių socialinių ir ekonominių padarinių. Humaniškos visuomenės siekinys – visų jos narių bendrystė, kuri įmanoma tik geriau pažinus ir pašalinus (arba bent jau sumažinus) tam trukdančias priežastis.

Problemos aktualumą demonstruoja ir klausos sutrikimo (KS) paplitimo mastas – statistiniai sergamumo bei ligotumo rodikliai. KS yra dažniausia įgimta ir dažniausia neurosensorinė liga išsivysčiusiose šalyse. Vienas du iš 1000 naujagimių turi įgimtą KS, šis rodiklis padidėja iki 3,5 iš 1000, sulaukus paauglystės. Su amžiumi ligos dažnis turi tendenciją didėti – Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, apie 5 proc. populiacijos – 360 mln. (iš jų 328 mln. suaugusiųjų ir 32 mln. vaikų) turi įvairaus laipsnio klausos sutrikimą, apribojantį asmens gebėjimą išgirsti ir suvokti garsus [1]. Lietuvoje, 2015 m. SVEIDROS duomenimis, turinčių kurtumą ir prikurtimą nepilnamečių asmenų buvo 1 702 (3,26 iš 1 000 vaikų) [2].

Nepaisant didelio ligos dažnio, etiologinio ligos gydymo šiuo metu nėra, atliekama tik klausos rehabilitacija klausos aparatais arba implantais.

Mokslo pažanga biologijos, genetikos, genų inžinerijos srityse ne tik suteikia naujų galimybių nustatyti šios ligos etiologiją ir patogenezės mechanizmus, nagrinėti embriogenezės ir fetogenezės metu vykstančius procesus, analizuoti ir modeliuoti subląstelinio lygmens struktūrinius ir funkcinius pokyčius, bet ir leidžia tikėtis proveržio gydant KS. Mokslinių tyrimų duomenimis, 35–40 proc. ligos atvejų priežasties nepavyksta nustatyti, jie lieka idiopatinės kilmės, todėl akivaizdu, kad identifikuotos ne visos paveldimos ĮKS priežastys [3]. Koduojančių genomo sekų patogeniniai variantai lemia 85 proc. monogeninių ligų priežasčių, todėl atliekant naujos kartos sekoskaitą, kai naujomis technologijomis tiriamos daugelio genų (arba viso egzomo) koduojančios sekos, galima paaiškinti nemažą dalį ligos atvejų, identifikuoti naujus genus kandidatus ĮKS išsivystyti, aptikti žinomų genų naujus patogeninius variantus ir apibūdinti jų lemiamus klinikinius fenotipus.

Aktuali ir genetinių pokyčių sąsajų su klinikiniais ligos rodikliais analizė – tai svarbi paciento sveikatos priežiūros planavimo informacija, leidžianti prognozuoti ligos sunkumą, progresavimą, rehabilitacijos priemonių efektyvumą.

Lietuvos mastu svarbi mūsų populiacijos epidemiologinių ir demografinių duomenų bei klinikinių ir genomo tyrimo rezultatų analizė, norint sudaryti mūsų šalies vaikų, turinčių ĮKS, ištyrimo strategiją, nes skirtingos populiacijos turi joms būdingus geografinius, etninius, socialinius, medicininius, genetinius ir kitus veiksnius, kuriems veikiant formuojasi unikali ligos etiologinė struktūra.

I.2. Tyrimo tikslas

Įvertinti genetinių veiksnių reikšmę klausos sutrikimo patogenezei ir fenotipinei išraiškai Lietuvos populiacijoje.

I.3. Tyrimo uždaviniai

1. Sudaryti įgimtą / paveldimą klausos sutrikimą turinčių Lietuvos populiacijos tiriamųjų grupę, ją charakterizuoti analizuojant epidemiologinius, klinikinius bei genealogijos duomenis; atlikti sergančių asmenų genetinius tyrimus ir rezultatų analizę, įvertinant nustatytų pokyčių įtaką klausos sutrikimo etiopatogenezei.

2. Sudaryti Lietuvos populiacijos įgimto / paveldimo klausos sutrikimo etiologinę struktūrą.

3. Atlikti genetinių pokyčių įtakos klausos sutrikimo fenotipui analizę.

4. Nustatyti su autosominiu recesyviu ir X recesyviu būdu paveldimo ĮPKS siejamų genų patogeninių variantų nešiotojų dažnį lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje, apskaičiuoti paveldimo klausos sutrikimo dažnį lietuvių populiacijoje.

5. Parengti įgimto / paveldimo klausos sutrikimo etiologinės diagnostikos gaires.

I.4. Darbo naujumas ir reikšmė

1. Pirmą kartą tirta Lietuvos populiacijos klausos sutrikimų turinčių asmenų imtis, sudaryta etiologinė struktūra, charakterizuotas ĮPKS patogenezinių mechanizmų poveikis fenotipui.

2. Pirmą kartą Lietuvoje klausos sutrikimu sergančių asmenų tyrimui taikytos naujausios ir efektyviausios genetinių tyrimų technologijos, nustatyti nauji nepublikuoti patogeniniai / galimai patogeniniai klausos sutrikimą lemiantys variantai.

3. Pirmą kartą įvertintas autosominiu recesyviu ir X recesyviu būdu paveldimo ĮPKS dažnis lietuvių populiacijoje, parengtos ligonių ištyrimo gairės.

Naujų žinomais sindromais sergančių pacientų klinikinių požymių apibūdinimas, ĮPKS patogenezinių mechanizmų supratimas, poveikio fenotipui charakterizavimas, dažnio populiacijoje įvertinimas yra svarus indėlis ĮPKS mokslo srityje, pagrindas ateityje kurti naujas ištyrimo ir gydymo strategijas.

I.5. Ginamieji teiginiai

1. Genetiniai veiksniai yra dažniausia klausos sutrikimo priežastis, Lietuvos populiacijai būdinga savita etiologinė klausos sutrikimo struktūra, turinti unikalių ypatybių.
2. Genetiniai veiksniai dažniau lemia sunkesnio laipsnio simetrišką klausos sutrikimą esant teigiamai ligos genealogijai.
3. Lietuvių populiacija turi didelį autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimo dažnį.
4. Genetinė konsultacija ir ištyrimas – kertinis etiologinės klausos sutrikimo diagnostikos etapas.

I.6. Darbo aprobacija

Išspausdintos publikacijos

1. Aleksiūnienė B, Matulevičiūtė R, Matulevičienė A, Burnytė B, Krasovskaja N, Ambrozaitytė L, **Mikštienė V**, Dirsė V, Utkus A, Kučinskas V. Opposite chromosome constitutions due to a familial translocation t(1;21)(q43;q22) in two cousins with development delay and congenital anomalies: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr; 96(16): e6521. **IF 1.803**.
2. Preiksaitienė E, Benušienė E, Ciuladaite Z, Šliužas V, **Mikstiene V**, Kucinskas V. Recurrent foetal syndromic spina bifida associated with 3q26.1-qter duplication

and 5p13.33-pter deletion due to familial balanced rearrangement. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2016 June; 55(3): P410–414. **IF 0.988.**

3. **Mikstiene V**, Jakaitiene A, Byckova J, Gradauskiene E, Preiksaitiene E, Burnyte B, Tumiene B, Matuleviciene A, Ambrozaityte I, Uktveryte I, Domarkiene I, Rancelis T, Cimbalistiene L, Lesinskas E, Kucinskas V, and Utkus A. The high frequency of *GJB2* gene mutation c.313_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population. BMC Genetics. 2016 Feb 19; 17: 45. **IF 2.397.**

4. **Mikstiene V**, Songailiene J, Byckova J, Rutkauskiene G, Jasinskiene E, Verkauskiene R, Lesinskas E, Utkus A. Thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome: a novel homozygous *SLC19A2* gene mutation identified. American Journal of Medical Genetics Part A. 2015 Jul; 167(7): 1605-9. **IF 2.159**

5. **Mikštienė V**, Preikšaitienė E, Utkus A. Paveldimas klausos sutrikimas. Genetiniai veiksniai kurtumo etiopatogenezėje. Medicinos teorija ir praktika. 2015; 21 (1): 55–64.

Žodiniai pranešimai:

1. Byčkova J, **Mikštienė V**, Černytė G, Gromova M, Kiverytė S, Lesinskas E. Klausos sutrikimo etiologija KI naudotojų tarpe. Lietuvos otorinolaringologų draugijos mokslinė praktinė konferencija „Otorinolaringologijos seminarai“, 2017 m., Druskininkai, Lietuva.

2. **Mikštienė V**, Jakaitienė A, Byčkova J, Gradauskienė E, Preikšaitienė E, Burnytė B, Tumienė B, Matulevičienė A, Ambrozaitytė L, Kavaliauskienė I, Domarkienė I, Rančelis T, Cimbalistienė L, Lesinskas E, Kučinskas V, Utkus A. The high frequency of *GJB2* gene mutation c.313_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population. Trečioji tarptautinė konferencija „Evoliucinė medicina: šiuolaikinių sveikatos problemų evoliuciniai mechanizmai ir dėsninčiai“, 2016 m., Vilnius, Lietuva.

3. Matulevičienė A, Aleksūnienė B, **Mikštienė V**, Krasovskaja N, Griškevičius L, Utkus A, Kučinskas V. Dup (1) (q43–q44) & del (21) (q22.2–q22.3) characterized by facial dysmorphism, congenital heart defect and mental retardation. European dysmorphology meeting, 2014 m., Strasbūras, Prancūzija.

4. **Mikstiene V**, Songailiene J, Byckova J, Rutkauskiene G, Jasinskiene E, Verkauskiene R, Lesinskas E, Utkus A. Rogers syndrome (thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome): first case in Lithuania. 6th Baltic ENT Congress, 2014 m., Kaunas, Lietuva.

5. **Mikstiene V**, Songailiene J, Byckova J, Rutkauskiene G, Jasinskiene E, Verkauskiene R, Lesinskas E, Utkus A. Thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome: first case in Lithuania. Baltijos šalių paveldimųjų medžiagų apykaitos ligų konferencija, 2014 m., Vilnius, Lietuva.

6. **Mikstiene V**, Byckova J, Jakaitiene A, Lesinskas E, Utkus A. The contribution of *GJB2* gene mutations to development of early onset hearing loss in affected group of patients in Lithuanian population. Lietuvos ir Lenkijos otorinolaringologų kongresas, 2013 m., Druskininkai, Lietuva.

Stendiniai, pranešimai ir tezės

1. **Mikštienė V**, Songailienė J, Byčkova J, Rutkauskienė G, Jašinskienė E, Verkauskienė R, Lesinskas E, Utkus A. Treatment of thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome with sulbutiamine. ESHG konferencija, 2017 m., Kopenhaga, Danija.

2. **Mikštienė V**, Byčkova J, Gradauskienė E, Lesinskas E, Utkus A. The prevalence of *GJB2* gene mutations in Lithuanian patients with congenital hearing loss. 13-as Europos pediatrių otorinolaringologų draugijos kongresas, 2016 m., Lisabona, Portugalija.

3. **Mikstiene V**, Vebraitė I, Alzbutas G, Rancelis T, Utkus A, Pependikyte V. Multiplex PCR and NGS in detection of mutations of target genes associated with

hearing loss. Europos Žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2016 m., Barselona, Ispanija.

4. **Mikštienė V**, Byčkova J, Gradauskienė E, Lesinskas E, Utkus A. The contribution of *GJB2* gene mutations to development of early onset hearing loss in affected group of patients in Lithuanian population. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2015 m., Glazgas, Jungtinė Karalystė.

5. **Mikstiene V**, Songailiene J, Byčkova J, Rutkauskiene G, Jasinskiene E, Verkauskiene R, Lesinskas E, Utkus A. Diverse dynamics of clinical signs and subtle biochemical findings in thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome. SSIEM 2014 Annual Symposium, 2014 m., Insbrukas, Austrija.

6. **Mikštienė V**, Songailienė J, Byčkova J, Rutkauskienė G, Jašinskienė E, Verkauskienė R, Lesinskas E, Utkus A. Rogers's syndrome (thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome): the success of multidisciplinary approach. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2014 m., Milanai, Italija.

7. Byčkova J, Gradauskienė E, Lesinskas E, **Mikštienė V**, Utkus A. Early Outcomes of Cochlear Implantation in Children. 11 Europos vaikų kochlearinės implantacijos simpoziumas, 2013 m., Stambulas, Turkija.

II. TYRIMŲ APŽVALGA

II.1. Klausos sutrikimo apibrėžtis

Klausos sutrikimu vadinamas dalinis arba visiškas, laikinas arba nuolatinis negalėjimas girdėti. Klausos sutrikimas diagnozuojamas, jei girdėjimo slenkstis viena ausimi viršija 25 dB.

II.2. Klausos sutrikimo klasifikacija

Didelis ligos heterogeniškumas turi įtakos ir fenotipinei išraiškai, todėl, siekiant tiksliai įvertinti sergančio asmens fenotipą, svarbu kuo tiksliau apibūdinti ligą remiantis klasifikavimo principais (1 lentelė).

1 lentelė. Klausos sutrikimo klasifikacija (pagal šaltinį [4])

Klasifikavimo principai	Ligos tipai				
	Pagal etiologiją	Įgytas (40–50 proc.)		Paveldimas (50–60 proc.)	
Pagal paveldėjimą	Autosominis dominantinis	Autosominis recesyvus	X dominantinis	X recesyvus	Mitocho ndrinis
Pagal ligos pradžios amžių	Įgimtas (diagnozuotas nuo gimimo)	Ikikalbinis (angl. <i>prelingual</i>) klausos sutrikimas dar nepradėjęs kalbėti		Pokalbinis (angl. <i>postlingual</i>) – prasidėjęs kalbai išsivysčius	
Pagal sunkumo laipsnį	Lengvas (klausos slenkstis 25–40 dB)	Vidutinis (klausos slenkstis 41–70 dB)	Sunkus (klausos slenkstis 71–90 dB)	Gilus (klausos slenkstis >91 dB)	
Pagal simetriją	Vienpusis		Abipusis		
Pagal pažeidimo vietą	Kondukcinis (išorinės ir vidurinės ausies ligos)	Neurosensor inis (vidinės ausies ir klausos nervo ligos)	Mišrus	Centrinė klausos disfunkcija	
Pagal ligos eigą	Stabilus		Progresuojantis		
Pagal kitų organų patologiją	Sindrominis		Nesindrominis		
Pagal audiogramą	Žemų dažnių (<1 Hz)	Vidutinių dažnių (1–2 Hz)	Aukštų dažnių (>2 Hz)		

II.3. Klausos jutimo organų sistemos ir jos ligų tyrimų istoriniai aspektai

Klausos reikšmę suprato jau senųjų civilizacijų gyventojai, jų bandymai suprasti priežastis, paaiškinti mechanizmus ir išgydyti ligonius užfiksuoti kelis tūkstančius metų prieš mūsų erą. Seniausi rašytiniai šaltiniai, kuriuose klausos funkcija buvo susieta su anatominėmis kaukolės struktūromis ir jų kraujotaka, rasti atliekant archeologinius tyrimus Egipte – Edwino Smitho chirurgijos papirusas (angl. *Edwin Smith Surgical Papyrus*) [5], datuojamas apie 2500 metus p. m. e. ir Eberso papirusas (angl. *Ebers Papyrus*) [6], datuojamas 1534 metais p. m. e.

Ausies ir kvėpavimo takų sandarą tyrinėjo Hipokratas 400 metų p. m. e. [7], Avicena (Ibn Sina) savo veikale „Gydymo mokslo kanonas“ (XI amžius) aprašė klausos organų sistemos anatomines ypatybes ir dažniausias patologijas [8].

Pirmosios diskusijos ir nuomonės apie paveldimą klausos sutrikimų prigimtį siekia XVI–XVII a. Paulas Zacchias (1584–1659) – Italijos gydytojas, medicinos mokslo dėstytojas, medicinos teisės specialistas, filosofas ir poetas, savo traktate *Quaestiones Medico-legales* [Roma, 1621] rašė, kad kurtieji ir nebylieji turėtų susilaikyti nuo santuokų <...> visuomenės naudai, nes yra įrodymų, kad jiems gimsta tokie patys vaikai [9].

XVI a. gydytojas Johannesas Schenckas aprašė šeimą, kurioje keletas vaikų buvo kurti, nors abu jų tėvai buvo sveiki. Tikėtina, kad tai autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimas. Šeima, turėjusi autosominio dominantinio paveldėjimo KS aprašyta XVII a. (apžvelgta [10]). Pasakojimas apie *Martha's Vineyard* salą prie Masačuseto (JAV) krantų, kurioje visi kalbėjo ženklų kalba, kadangi apie 60 proc. jos gyventojų, visi vieno asmens palikuonys, buvo kurti, parašytas XIX a. antroje pusėje [11], jame pirmą kartą aprašytas įkūrėjo efektas.

Pirmieji sindrominio klausos sutrikimo – mandibulofacialinės dizostozės – atvejai publikuoti 1846 m. [12], *Usher* sindromas aprašytas 1858 m. [13], *Pendred* sindromas – 1896 m. [14]. Jau tų laikų darbuose buvo matyti heterogeninė ligos

kilmė, pradėti bandymai susisteminti informaciją ir sukurti klausos sutrikimo klasifikavimo principus [15].

XIX a. antroje pusėje nagrinėta giminingų santuokų reikšmė klausos sutrikimo paveldėjimui. Šiuo klausimu mokslininkų nuomonės skyrėsi. Wiliamas R. Wilde'as, atlikęs prospektyvų tyrimą, buvo įsitikinęs, kad giminingose santuokose gimusių vaikų tikimybė turėti klausos sutrikimą didesnė nei negiminingų santuokų palikuonims. Tokio pat požiūrio laikėsi ir keletas kitų mokslininkų (Arthuras Mitchellas, Davidas Buxtonas, kt.). Tačiau George'as Darwinas paneigė šiuos teiginius, atlikęs tyrimą, kuriame nustatė, kad pirmos eilės pusbrolių santuokų dažnis populiacijoje yra panašus kaip ir sergančių asmenų, gimusių giminingose santuokose, dažnis tirtose sergančių asmenų grupėse, todėl teigė esant nepakankamai įrodymų, norint susieti įgimtą patologiją su tėvų giminyse [16]. Nepaisant šių prieštaravimų, jau XIX a. pabaigoje mokslininkų straipsniuose buvo teigiama, kad didžioji dalis klausos sutrikimų priežasčių yra genetinės, dalis jų paveldimos tiesiogiai, kita dalis paveldima netiesiogiai iš protėvių, o gimininga santuoka neabejotinai didina riziką palikuonims sirgti klausos sutrikimu (apžvelgta [10]). Alexanderis Bellas (telefono išradėjas), kurio tiek mama, tiek žmona turėjo klausos sutrikimą, aktyviai prieštaravo asortatyvioms santuokoms tarp vienodą požymį (ligą) turinčių asmenų, kadangi, jo nuomone, tokiu atveju pasikeistų ligų ir požymių balansas visuomenėje, o tai nebūtų labai sveikintina [17]. Šia nuomone labai žavėjosi eugenikos (teorijos, kuria siekta pagerinti žmonių populiacijos paveldimas savybes) sekėjai. Prisidengiant iškilių asmenybių neigiamu požiūriu į paveldimas ligas, nacistinėje Vokietijoje buvo atliekama „rasės higiena“ – vien dėl kurtumo buvo nužudyta 1600, o sterilizuota 17 000 asmenų.

Empirinių klausos sutrikimo tyrimų etape buvo sukaupta ir susisteminta daug informacijos, gautos stebėjimų būdu. Ši informacija buvo ypač reikalinga tolesniems tyrimams, vykdytiems taikant moderniąsias technologijas.

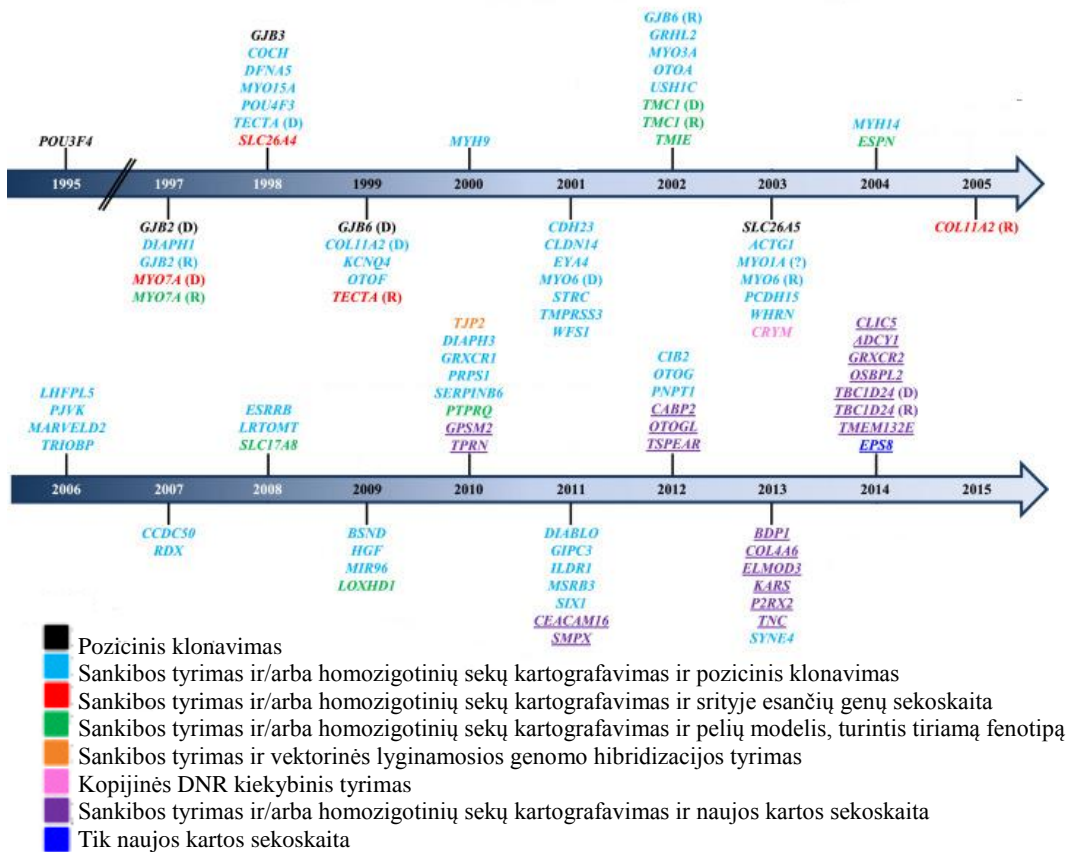
II.4. Modernieji klausos sutrikimo genetiniai tyrimai

Genomo tyrimai. 1953 m. nustačius DNR sandarą [18] ir 1965 m. identifikavus baltymų aminorūgščių kodavimo principus [19], prasidėjo šiuolaikinių genetinių mokslinių tyrimų etapas. Mokslinėje literatūroje pradėta publikuoti vis daugiau straipsnių apie paveldimo klausos sutrikimo atvejus, aprašyti ligos paveldėjimo tipai, atsirado diskusijos apie nešiotojų būklės tyrimo poreikį ir galimybes [20]. Vykstant mokslo ir technologijų pažangai, klausos sutrikimų tyrimams pasitelkti molekuliniai genetiniai metodai. Nors tuo metu jau nebuvo abejojančių dėl genetinės didžiosios dalies klausos sutrikimų prigimties, konkrečių genų identifikuota nebuvo.

Norėdami nustatyti chromosomų sritis, kuriose yra genai, siejami su paveldimomis ligomis (iš jų ir su klausos sutrikimu), mokslininkai pradėjo kartografuoti genomą, taikydami pozicinio klonavimo, nepusiausvirošios sankibos analizę. Tuo tikslu buvo tiriamos didžiulės šeimos, turinčios daug sergančių asmenų. Įvertinus to meto technologinį pajėgumą, šis darbas reikalavo didžiulių laiko, finansinių ir žmogiškųjų išteklių, todėl pažanga vyko lėtai.

1988 m. didelėje Mauricijaus šeimoje sėkmingai kartografuota sritis X chromosomos ilgajame petyje, ji susieta su klausos sutrikimu dėl vidurinės ausies kilpelės fiksacijos, kuris buvo diagnozuotas sergantiems šeimos nariams [21].

POU3F4 genas (MIM 300039), esantis šioje Xq21.1 genetinėje srityje, buvo pirmasis klausos sutrikimo genas, identifikuotas 1995 m. [22].



1 pav. Klausos sutrikimo genų identifikavimo eiga ir būdai. Adaptuota iš [23]

Autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimo *DFNB1* genetinė sritis kartografuota 1994 m. [24], netrukus – 1997 m. buvo nustatytas *GJB2* genas, kurio patogeniniai variantai dažniausiai lemia klausos sutrikimą daugelyje pasaulio populiacijų [25] (1 pav.).

Tobulėjant technologijoms 2003 m. buvo sekvenuotas žmogaus genomas. Žinant referentinę žmogaus genomo seką, atsivėrė galimybės taikyti plataus masto tyrimus naujiems genams identifikuoti. Tiriant genetinius žymenis visame genome, buvo atliekama sankibos analizė. Genai, esantys genetinėje srityje, apribotoje informatyvių žymenų, prioritizuoti pagal funkciją ir raišką audiniuose bei sekvenuoti *Sanger* sekoskaitos būdu. Kiekybinei genomo sričių analizei taikyta vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija. Tokiu būdu buvo identifikuota daug su klausos sutrikimu siejamų genų [23]. Naujos kartos sekoskaita (viso egzomo, viso genomo) sergančių žmonių grupėse naujiems ligos genams nustatyti pradėta taikyti

nuo 2005 m. Būdama akivaizdžiai pranašesnė (mažesnės laiko, finansinių išteklių sąnaudos, didesnis efektyvumas), ši technologija ėmė dominuoti ir perėmė kitų kokybinių ir pozicinių genomo tyrimų funkcijas.

Taikant modernias technologijas, nustatyta daugiau kaip 150 genomo sričių (identifikuota per 100 genų), siejamų su izoliuotu (nesindrominiu) klausos sutrikimu ir per 400 genų, siejamų su sindrominiu klausos sutrikimu [26].

Didelis dėmesys tiriant genomą skiriamas ne tik struktūriniais genų pokyčiams DNR lygmeniu, bet ir jų raiškos reguliavimo mechanizmams. Išanalizuotas epigenetinių veiksnių ir nekoduojančių RNR poveikis klausos organų sistemos vystymuisi, nustatyta miRNR reikšmė genų, aktyvių vidinės ausies vystymosi metu, raiškai [27].

Bioinformaciniais metodais analizuojamas genomas, tiriami funkciškai aktyvūs DNR elementai (ENCODE projektas [28]). Nustatyta reguliacinių sekų (pvz., netransliuojamų 5', 3' *GJB2* geno sekų) svarba transkripcijos veiksnių prisijungimui. Patogeniniai variantai šiose srityse susieti su klausos sutrikimu [29].

Atliekant mokslinius didelių šeimų tyrimus, iškilo modifikuojančių genų įtakos ligos išsivystymui klausimas. Pirmą kartą modifikuojančio geno reikšmė nustatyta atliekant sankibos analizę didelėje šeimoje Pakistane. *DFNB26* genetinė sritis buvo susieta su nesindrominiu neurosensoriniu ikikalbiniu klausos sutrikimu. Aštuoni šios šeimos nariai turėjo didelio laipsnio klausos sutrikimą arba visišką kurtumą. Įdomu tai, kad kiti septyni tos pačios šeimos nariai turėjo homozigotinį *DFNB26* haplotipą, siejamą su liga, bet buvo visiškai sveiki. Šiems asmenims buvo atlikta sankibos analizė, siekiant nustatyti modifikuojančio geno sritį. Tyrėjams pavyko identifikuoti *DFNMI* regioną, esantį 1q24. Visi septyni sveiki homozigotiniai pagal *DFNB26* haplotipą, siejamą su liga, individai turėjo modifikuojantį *DFNMI* haplotipą, o nė vienas iš sergančių šeimos narių neturėjo [30]. Nustatyta, kad genai gali veikti vienas kitą ir reciprokinio principu. Aprašyta šeima, kurios penki nariai serga autosominio recesyvaus paveldėjimo neurosensoriniu klausos sutrikimu, jiems nustatyti homozigotiniai *CDH23* geno

patogeniniai variantai. Analizuojant fenotipą paaiškėjo, kad du sergantys šeimos nariai turi tik aukštų dažnių klausos sutrikimą, o kiti trys – didelio laipsnio KS arba visišką kurtumą. Papildomai atliktų tyrimų metu trims šeimos nariams nustatytas heterozigotinis hipofunkcinis variantas *PMCA2 (ATP2B)* gene, kuris susietas su sunkiu klausos sutrikimu [31]. Tačiau tiriant pelių modelius, turinčius KS dėl *Pmca2* geno patogeninių variantų, *CDH23* genui priskirtas modifikuojantis efektas [32].

Funkciniai klausos sutrikimo tyrimai. Nustačius naujus genus kandidatus, siejamus su kurtumu, arba atliekant genetinius anksčiau identifikuotų genų tyrimus sergantiejiems, susiduriama su retų variantų patogeniškumo įvertinimo problema. Variantų savybės (pvz., susidaro skaitymo rėmelio poslinkis, priešlaikinės baigmės kodonas, kt.), vieta geno sekoje (pvz., pirmasis kodonas, egzono ir introno sandūra), bioinformaciniai įrankiai (*in silico* analizė) yra neabejotinai naudingi vertinant varianto patogeniškumą. Vis dėlto vadovaujantis šiais principais dalies variantų klinikinės reikšmės nepavyksta paaiškinti. Tokiais atvejais pasitelkiami funkciniai tyrimai – analizuojamos ląstelių linijos, išaugintos iš sergančio asmens fibroblastų [33], žmogaus navikinių ląstelių linijos, kuriose genų inžinerijos metodu sukuriama pokyčiai genuose, identiški nustatytiems sergančių asmenų genomuose [34]. Atliekant tokius tyrimus, ne tik patvirtinamas geno / varianto patogeniškumas, bet ir paaiškėja poveikio mechanizmas, nes analizuojami geno koduojamos RNR ir (ar) baltymo vieta ląstelėje, jų kiekybiniai ir kokybiniai, funkcijos pokyčiai, ląstelės struktūros ir funkcijos pokyčiai.

Modeliniai organizmai klausos sutrikimų tyrimuose. Vidinė ausis formuojasi tik stuburinių organizme, todėl jų tyrimai informatyvesni už bestuburių. Pelių (lot. *Mus musculus*) ir zebražuvių (lot. *Danio rerio*) modeliai dažniausiai naudojami klausos sutrikimo tyrimuose. Kuriami (arba tiriami jau esami) modeliniai pelių, zebražuvių organizmai, taikant genų inžinerijos technologijas, keičiama tiriamų genų raiška, juos aktyvuojant arba inaktyvuojant. Modelinių gyvūnų tyrimai ne tik leidžia įvertinti geno įtaką fenotipui, funkciją embriogenezės

laikotarpiu, aplinkos veiksnių (triukšmas, medikamentai) poveikį ligos išsivystymui, bet ir reikšmę plaukuotųjų ląstelių regeneracijos procese [35, 36].

Pirmosios žinios apie neįprastą pelių išvaizdą ir elgesį („valsą šokančios pelės“, angl. *waltzing mouse*) randamos rankraščiuose, parašytuose Hanų dinastijos laikais (apie 80 m. p. m. e.) Kinijoje, kur šios pelės, turinčios geltonos spalvos kailį ir nuolat besisukančios, buvo labai mėgstamos ir auginamos kaip naminiai gyvūnai [37]. XIX a. pabaigoje Japonijoje išspausdinti patarimai, kaip išvesti liniją pelių, turinčių įvairių spalvų kailius – „nuostabiąsias peles“. Knygoje siūlomi patarimai derėjo su Mendelio dėsniais. Joje buvo atkreiptas dėmesys ir į „valsą šokančias“ peles – jos, anot autorių, sunkiai kryžminamos, todėl siūlyta su jomis nedirbti (apžvelgta [38]).

XIX a. ir XX a. atliekant empirinius stebėjimus ir tyrimus, buvo išanalizuoti pelių, pasižyminčių panašiomis į žmogaus fenotipinėmis ypatybėmis, klausos organo makro- ir mikroskopinio lygmens pokyčiai. Pelių ir žmonių linijos evoliucijos eigoje išsiskyrė prieš 90 mln. metų, tačiau daugelis procesų, ląstelių ir organų vystymasis ir funkcija išliko labai panašūs. XIX a. ir XX a. sandūroje pradėti „valsą šokančių“ pelių klausos organų sistemos morfologijos tyrimai, kuriais buvo nustatyti struktūriniai vidinės ausies labirinto pokyčiai, lemiantys šių organų disfunkciją – kurtumą ir pusiausvyros sutrikimą (apžvelgta [38]). XX a. pelių tyrimai suteikė daug informacijos apie klausos organų vystymąsi embriogenezės laikotarpiu ir histologines ypatybes. Gerokai iki genetinių priežasčių identifikavimo buvo aprašytos „valsą šokančių“ pelių linijos (*waltzer*, *shaker-1*, *pirouette*, *shaker-2*, *jerker*, *varitint-vaddler*) [39, 40]. Atlikus *Shaker1* linijos pelių tyrimą, nustatyti histopatologiniai pokyčiai vidinėje ausyje [41]. Vėliau buvo nustatyta koreliacija tarp sraigės histologinių pokyčių (Kortijaus organo ir *stria vascularis*) degeneracijos ir elektrofiziologinių ypatybių [42]. Modeliniai pelių organizmai buvo kuriami ir siekiant nustatyti arba patvirtinti etiologinius veiksnius, lemiančius struktūros ir (ar) funkcijos pokyčius, tiriant vieno organo patologijos įtaką kitų organų formavimuisi [43].

Modelinių gyvūnų kūrimas bei tyrimai svarbūs ir klausos sutrikimo genams identifikuoti bei jų variantų patogeniškumui įvertinti. Vienas iš svarbiausių geno / baltymo funkcinio reikšmingumo požymių yra jo DNR / aminorūgščių sekos konservatyvumas – t. y. labai nedideli evoliuciniai kitimai (ortologinių genų sekos vienodos arba labai panašios net evoliuciškai nutolusiose rūšyse). Ieškodami naujų klausos sutrikimo genetinių priežasčių, mokslininkai susidūrė su mažų šeimų problema – genų kartografavimas įmanomas tik didelėse, daug sergančių asmenų turinčiose šeimose. Atlikus žmogaus ir pelės genomų sekoskaitą, nustatyta, kad sekų sintenija viršija 90 proc. ir 99 proc. žmonių genų turi ortologus pelių genome [44]. Žinodami pelių ir žmogaus embriogenezės, morfologinį, funkcinį ir genetinį panašumą, mokslininkai pradėjo kurti įvairių paveldimų ligų pelių modelius. Šiuos darbus lengvino greito pelių dauginimo aplinkybės, todėl tiriant pelių ortologus buvo nustatyta keletas klausos sutrikimo genų – *MYO7A* (*shaker-1* pelės modelis), *CDH23* (*waltzer* pelės modelis), *TMCI* (*Beethoven* pelės modelis), *TMIE* (*spinner* pelės modelis) ir kt.) [45-47].

Zebražuvių ypatumai (apvaisinimas ir embriogenezė vyksta organizmo išorėje, embrionas optiškai peršviečiamas, turi vidinę ausį, kurios vystymąsi galima stebėti) suteikia tokiems modeliams pranašumo, lyginant su pelėmis, todėl sukurta nemažai zebražuvių modelių įvairioms klausos sutrikimo formoms (branchioto renalinis s., *Usher* s., *Waardenburg* s.) tirti. Tyrimuose naudojamos įvairios genetinės technikos – (1) atsitiktinė mutagenezė ir pakitusių genų klonavimas turintiems tiriamą fenotipą embrionams; (2) konkretaus(-čių) tiriamojo(-ųjų) geno(-ų) raiškos aktyvavimas arba inaktyvavimas, tikintis būdingo fenotipo (pastaruoju metu pradėta naudoti CRISPR/Cas9 technologija) [48]; transgeninių organizmų kūrimas, kurių ląstelėse vyksta žaliai fluorescuojančio baltymą koduojančio geno raiška, veikiant organui specifiniam promotoriui [49]. Zebražuvės modeliai buvo ir tebėra labai naudingi nagrinėjant klausos sutrikimo vystymosi mechanizmus ir galimus gydymo metodus [50].

II.5. Klausos jutimo organų sistemos vystymasis

Daugiausia duomenų apie žmogaus klausos jutimo organų sistemos vystymąsi embriogenezės metu gauta tiriant kitų žinduolių (pelių) arba stuburinių (viščiukų, zebražuvų) embrionus.

Vidinės ausies vystymasis. Vidinės ausies vystymasis prasideda nuo ektodermos sustorėjimų – otinių plakodžių, atsirandančių preplakodinėse srityse abipus besivystančių rombinių smegenų [51]. Preplakodinės srities aktyvaciją indukuoja nervinės plokštelės ir mezodermos, esančios po ja, signalai (*FGF* aktyvacija ir *Wnt* bei *BMP* slopinimas) [52]. Ankstyvi otinės plakodės žymenys – *Pax8*, *Pax2*, *Foxi1/3*, *Sox9* [53]. Susidariusi otinė plakodė įdumba sudarydama otinį įdubimą, kuris vėliau užsidaro suformuodamas otocistą. Vystantis otocistai kartu vystosi ir organo ašys, priekinė–užpakalinė ašis susidaro prieš susiformuojant nugaros–pilvo ašiai.

Priekinės–užpakalinės ašies formavimąsi veikia aplinkinės ektodermos gaminamos retinoinės rūgšties gradientas. Viščiukų embrionų otinės plokštelės priekiniame poliuje vyksta *Fgf10*, *Lunatic Fringe*, *Delta-like 1*, *Neurogenin 1* ir *NeuroD* žymenų raiška [54]. Užpakaliniame poliuje vyksta *Tbx1* raiška. Kitų gyvūnų priekinės–užpakalinės ašies formavimuisi svarbūs ir *FGF* bei *Shh* signaliniai keliai [55]. Šių žymenų tarpusavio santykis lemia tolesnį vidinės ausies struktūrų formavimąsi.

Nugaros–pilvo ašies formavimasis yra vienas svarbiausių susidarant vidinei ausiai, nes nugariniame paviršiuje vystosi pusiausvyros organas, o pilviniame – klausos organas. Nugariniame poliuje vyksta *Dlx5*, *Dlx6*, *Hmx2*, *Hmx3* ir *Gbx2* žymenų raiška, o pilviniame kaupiasi *Lfng*, *Neurog1*, *NeuroD1*, *Sox2*, *Six1* žymenys [56]. Šios ašies vystymąsi indukuoja rombinės smegenys ir notochorda. Rombinės smegenys gamina *Wnt* šeimos signalines molekules dorsaline, o notochorda – *Sonic Hedgehog* morfogeną (*Shh*) ventraline kryptimi nuo otocistos. Šių signalinių kelių aktyvumo santykis turi didelę reikšmę ašies formavimui, tačiau nustatyta, kad egzistuoja daugiau žymenų, dalyvaujančių šiame procese (*BMP*, *Six1*) [57].

Vidinė–šoninė ašis svarbi endolimfiniam latakui, šoniniam pusratiniam kanalui ir ampulei vystytis. Kai kurių genų raiška vyksta vidine–šonine ašimi (*Wnt* genų) [58], šios ašies formavimasis vyksta panašiu metu, kaip ir priekinės–užpakalinės ašies, procesui įtaką daro rombinių smegenų gaminamos signalinės molekulės *Fgf3* [59].

Vienuoliktą pelių embriogenezės dieną prasideda sraigės latako formavimasis, trunkantis 5-ias dienas. Užpakalinėje ventralinėje dalyje esančios otocistos ląstelės, kuriose vyksta *Sox2* raiška, dalindamosi sudaro ertmę, ilgėjančią ir besisukančią priekine–vidine kryptimi, kol pasiekia reikiamą apsisukimų skaičių. Tobula ląstelių dalijimosi ir migracijos reguliacija reikalinga Kortijaus organo struktūrai užtikrinti. Ląstelių proliferaciją palaiko *Wnt* signalinė sistema, dalyvaujant ciklinui D [60]. Embriogenezės 12–13,5 dieną aktyvuojama nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitoriaus *p27kip1* (*Cdkn1b*) raiška, turinti viršūnės–pagrindo gradientą, dėl kurio sustoja tolesnis latako ilgėjimas. Kitų nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitorių raiška taip pat vyksta ląstelėse (*p27kip1* (*Cdkn1b*), *p19ink4d* (*Cdkn2d*), *p21cip1* (*Cdkn1a*) ir *Rb1*), tai svarbu ląstelių būklei po dalijimosi ir gyvybingumui palaikyti.

Keturioliktą embriogenezės dieną vidurinėse sraigės pagrindo ląstelėse aktyvuojama *Atoh1* raiška, reikalinga plaukuotųjų ląstelių diferenciacijai [61]. *Atoh1* raiškos padidėjimas plinta į visas pagrindo ląsteles ir viršūnės kryptimi. Šiam gradientui atsirasti svarbūs transkripcijos veiksniai *Neurog1* ir *Neurod1* [62]. Procese dalyvauja ir *Shh* signalinė sistema, jo raiška mažėja aktyvuojantis *Atoh1* raiškai, jo stoka lemia trumpesnio sraigės kanalo susiformavimą [63]. *Sox1* yra ankstyviausias juntamųjų ląstelių žymuo, slopinantis *Atoh1* (inhibicija vyksta ir priešinga kryptimi). *Notch* ligando *Jag1* raiška vyksta ir juntamosiose ląstelėse. Plaukuotųjų ląstelių diferenciaciją, prasidedančią 13–14-ą embriogenezės dieną, reguliuoja daugybė veiksnių: *Atoh1* (aktyvuoja), *Hey1* ir *Hey2* (slopina diferenciaciją). Diferenciacijos metu juntamųjų ląstelių pirmtakės gamina *Notch*

ligandus *Serrate2* ir *Delta1*, o gretimos ląstelės, pradėjusios gaminti *Hey1* ir *Hey2*, virsta pagalbinėmis ląstelėmis [64].

Tonotopinis sraigės gradientas susidaro dėl skirtingo ekstraceliulinių baltymų santykio, turinčio gradientą nuo pagrindo link bazės. Sraigės pagrindo pamatinė membrana storesnė, platesnė ir paslankesnė, o viršūnėje plonesnė ir standesnė. Šiuo metu dar nėra aišku, kas lemia šio gradiento atsiradimą.

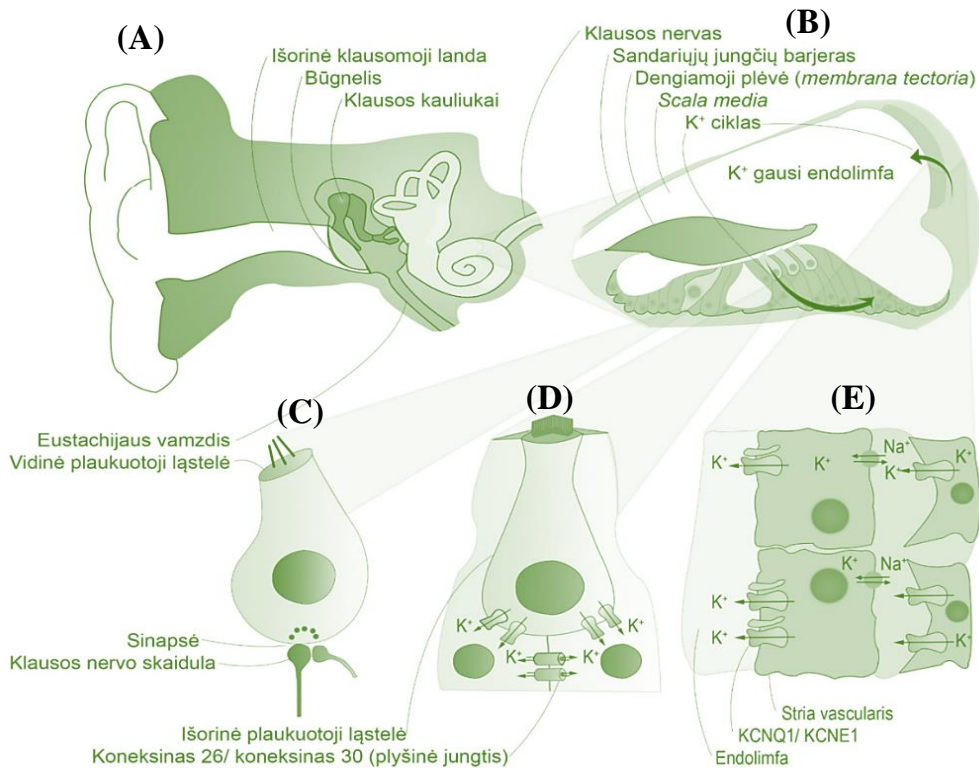
Plaukuotųjų ląstelių morfologija taip pat kinta išilgai pagrindo–viršūnės ašies (stereocilijos viršūnėje tris kartus ilgesnės). Išilgai ašies kinta ir genų raiška ląstelėse (Ca, K jonų kanalus koduojančių genų raiška taip pat turi gradientą) [65].

Ištyrus viščiukų embrionų vidinės ausies transkriptomą, daroma prielaida, kad už genų raiškos gradiento atsiradimą atsakinga retinoinė rūgštis ir BMP7.

Išorinės ir vidurinės ausies vystymasis. 22-ą dieną po fertilizacijos pelių embrione susiformuoja penki žiočių lankai. Išorinė ausis vystosi iš pirmo ir antro žiočių lankų, padengtų ektoderminės kilmės ląstelėmis. Nervinės keteros ląstelių migracijos metu 5-ą nėštumo savaitę žiotyse susidaro šeši gumburėliai – ausų kalvelės, kurioms susijungus tarpusavyje 7-ą savaitę, vystosi išorinė ausis [66]. Pirmo žiočių lanko gumburėliai suformuoja išorinės ausies kramslį, vijoklį ir kriauklės įdubą, antro žiočių lanko gumburėliai sudaro priešvijoklį, prieškramslį ir kriauklę. Išorinės klausomosios angos formavimasis prasideda nuo pirmo žiočių lanko invaginacijos 6-ą savaitę ir baigiasi kanalo atsivėrimu 26-ą savaitę. Ausies būgnelis susiformuoja tarp klausomosios angos ir vidurinės ausies. Jį sudaro trys sluoksniai – išorėje ektoderminės kilmės ląstelės, po jomis mezoderminės kilmės skaidulų sluoksnis ir viduje endoderminės kilmės ląstelės. Vidurinė ausis susidaro iš tubotimpaninės įdubos – endoderminės kilmės pirmo žiočių lanko kišenės, kurios distalinė dalis suformuoja būgninę ertmę, o proksimalinė – Eustachijaus vamzdį [66]. Trys klausos kauleliai (pradžioje kremzlinės sandaros) susiformuoja iš pirmo ir antro žiočių lankų atskirai nuo tubotimpaninės įdubos. Aštuntą gestacinį mėnesį būgninė ertmė apgaubia klausos kaulelius. Į garsą klausos kaulelių sistema visiškai pradeda reaguoti tik antrą mėnesį po gimimo.

II.6. Garso suvokimo procesas klausos jutimo organų sistemoje

Naujausių mokslinių biotechnologijų pagalba nustatyta didelė klausos sutrikimą lemiančių mechanizmų įvairovė tiek morfologiniais, tiek funkciniais aspektais.



2 pav. Klausos jutimo organo sandara

Klausos jutimo organų sistema yra sudėtinga, garsui suvokti svarbus tinkamas visų sistemos dalių vystymasis makroskopiniu, mikroskopiniu ir molekulinio lygmeniu bei tinkamai atliekama funkcija.

Plataus spektro garso bangos, keliamos įvairių aplinkos šaltinių, pasiekia mūsų ausis. Klausos organų sistema atskiria įvairaus dažnio ir intensyvumo garsus bei perduoda informaciją į galvos smegenų žievės centrus, leisdama mums suvokti garso šaltinio vietą, jo atstumą (2 pav. adaptuota pagal [67]). Klausos organų sistemą sudaro trys dalys: išorinė, vidurinė, vidinė ausis. Pagrindinė išorinės ausies funkcija – nukreipti garso bangas į ausies būgnelį, kuris, atėjus garsiniam dirgikliui,

pradedą vibruoti, perduodamas signalą vidurinės ausies kauleliams – plaktukėliui, priekalėliui ir kilpelei, kurie perduoda garso bangą į vidinę ausį (2 pav., A).

Vidinėje ausyje yra klausos ir pusiausvyros jutimo organai. Klausos jutimo organas yra sraigėje – spiraliniame organe, esančiame smilkinkaukyje, turinčiame kanalą, einantį nuo pagrindo iki viršūnės. Dvi plonos membranos išilgai kanalo dalija jį į tris dalis, prisipildžiusias skysčio. Sraiginis latakas (lot. *scala media*) – endolimfos prisipildžiusi kanalo dalis, esanti tarp prieangio laipto (lot. *scala vestibuli*) ir būgninio laipto (lot. *scala tympani*) (2 pav., B). Sraiginiame latake (lot. *scala media*) yra Kortijaus organas – juntamasis klausos organo epitelis, esantis ant pamatinės membranos, skiriančios sraiginį lataką (lot. *scala media*) ir būgninį laiptą (lot. *scala tympani*). Specializuotos sensorinės plaukuotosios ląstelės atlieka mechaninių bangų vertimo nerviniais impulsais funkciją. Plaukuotosios ląstelės išsidėsčiusios viena vidine eile ir trimis išorinėmis eilėmis (2 pav., B, C, D). Viršutiniame ląstelių paviršiuje yra ataugėlės (plaukeliai) – stereocilijos, kuriose gausu baltymo aktino. Stereocilijos sudaro gerai organizuotą laiptelių pavidalo struktūrą, kurią palaiko šoninės ir viršūnių jungtys. Plaukuotąsias ląsteles dengia membrana, kurioje gausu baltymo kolageno. Atėjus mechaninei garso bangai iš vidurinės ausies, būgninio laipto (lot. *scala tympani*) perilimfa judina pamatinę membraną, ant kurios išsidėsto Kortijaus organas. Susidariusi vibracija sukelia stereocilijų judesius, dėl kurių K^+ jonai, esantys endolimfoje, patenka į plaukuotąsias ląsteles ir sukelia jų membranų depoliarizaciją – aktyvuojamas mechanoelektrinis impulso perdavimo procesas, kurio pagrindas – stabili K^+ jonų koncentracija endolimfoje. K^+ homeostazė palaikoma, K^+ jonams iš plaukuotųjų ląstelių tarpląstelinėmis jungtimis judant į kraujagyslinį ruoželį (lot. *stria vascularis*), iš kurio K^+ jonų kanalais išskiriamas atgal į endolimfą (2 pav., E). Plaukuotųjų ląstelių depoliarizacija sukelia neurosiuntiklių sekreciją į sinapsinį plyšį, esantį tarp plaukuotosios ląstelės ir neurono galūnėlės (2 pav., C). Sklindant nerviniam impulsui, signalas perduodamas į galvos smegenis [67].

II.7. Įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo etiologija

Įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo etiopatogenezę lemia daugelis tiek paveldimų, tiek nepaveldimų veiksnių.

Nepaveldimi veiksniai – TORCH (**t**oksoplazmos, **r**audonukės, **c**itomegalo ir **h**erpes virusai) infekcijos prenataliniu laikotarpiu, neišnešiotumas, ototoksinis medikamentų poveikis (gentamicinas ir kt. aminoglikozidai), bakterinis meningitas, triukšmas sukelia iki 25 proc. įgimtų / ankstyvų klausos sutrikimų [68].

Genetiniai veiksniai lemia nuo pusės iki dviejų trečdalių visų įgimtų klausos sutrikimų priežasčių išsivysčiusiose šalyse [69]. Reikšminga pastarųjų metų genų identifikavimo technologijų pažanga sukėlė perversmą įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo genetinių priežasčių tyrimuose. Mokslinių tyrimų duomenimis, didžioji dalis įgimtų / paveldimų klausos sutrikimų yra monogeniniai, kai ligos išsivystymą lemia vieno geno patogeniniai variantai. Nustatytas ir digeninės kilmės (etiopatogenezėje dalyvauja dviejų genų patogeniniai variantai) klausos sutrikimas.

– **Nesindrominis KS** sudaro apie 70 proc. ligos atvejų [68]. Nustatyta daugiau kaip 150 lemiančių genetinių sričių (identifikuota per 100 genų) [23]. Šiam tipui būdingas izoliuotas klausos sutrikimas, nesusijęs su kitų organų sistemų struktūros ir (ar) funkcijos pakitimais. Genetinės sritys, susijusios su paveldimu nesindrominiu klausos sutrikimu, vadinamos *DFN* (angl. ***DeaFN****ess*)

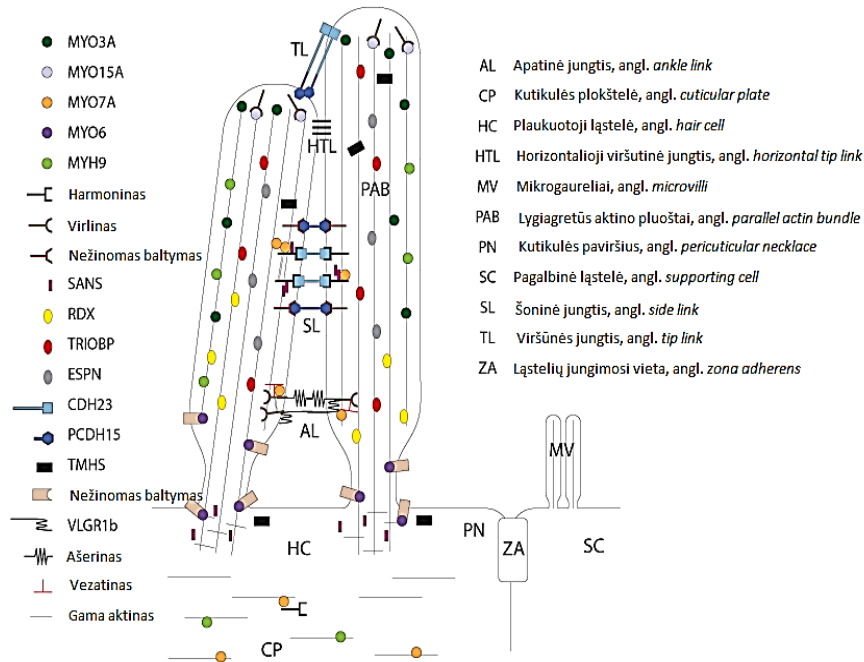
- DFNA – autosominio dominantinio paveldėjimo klausos sutrikimas;
- DFNB – autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimas;
- DFNX – su X chromosoma susijęs klausos sutrikimas.

DFNA, DFNB, DFNX sudaro atitinkamai 20–25 proc., 75–80 proc. ir 1–1,5 proc. ikikalbinio nesindrominio klausos sutrikimo atvejų [68];

– **Sindrominis KS** – susijęs su įgimtais išorinės / vidurinės / vidinės ausies ir kitų organų / sistemų struktūros / funkcijos sutrikimais, sudaro apie 30 proc. atvejų. Mokslinėje literatūroje aprašyta daugiau kaip 400 sindromų, kuriems būdingas KS [70].

II.8. Paveldimo klausos sutrikimo mechanizmai

Moksliniai tyrimai leido išsamiai apibūdinti garso suvokimo procesą, daug žinome apie klausos sutrikimo priežastis ir mechanizmus. Paveldimam klausos sutrikimui būdingas didelis genetinis heterogeniškumas. Mokslininkų nuomone, iki 1 proc. visų žmogaus genų gali būti susiję su šia patologija. Genų, kurių patogeniniai variantai lemia klausos sutrikimą, koduojami baltymai dalyvauja visuose garso perdavimo mechanizmo etapuose, jų raiška vyksta įvairiose klausos organų sistemos dalyse ir įvairiais gyvenimo tarpsniais – nuo embriogenezės iki senatvės, todėl paveldimas klausos sutrikimas pasižymi didele fenotipinės išraiškos įvairove (3 pav., 2 lentelė).



3 pav. Stereocilijų sandara (adaptuota iš [69])

2 lentelė. KS genų koduojamų baltymų vieta ląstelėje ir funkcija

Genų vieta	Baltymų vieta / funkcija	Genas	Liga	MIM	
Branduolio genai	Stereocilijų judėjimas	<i>MYO3A</i>	DFNB30	607101	
		<i>MYO6</i>	DFNA22	606346	
			DFNB37	607821	
		<i>MYO7A</i>	USH1B	276900	
			DFNB2	600060	
			DFNA11	601317	
		<i>MYO14*</i>	DFNA4	600652	
		<i>MYO15A</i>	DFNB3	600316	
		Stereocilijų citoskeletas	<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	604717
			<i>TRIOBP</i>	DFNB28	609823
	<i>DIAPH1</i>		DFNA1	124900	
	<i>ESPN</i>		DFNB36	609006	
	<i>RDX</i>		DFNB24	611022	
	<i>TPRN</i>		DFNB79	613307	
	<i>CCDC50</i>		DFNA44	607453	
	<i>TMIE</i>		DFNB6	600971	
	Stereocilijų membrana	<i>PTPRQ</i>	DFNB84A	613391	
		<i>GPR98 (VLGR1)</i>	USH2C	605472	
		<i>STRC</i>	DFNB16	603720	
		<i>ILDRI</i>	DFNB42	609646	
		<i>LOXHD1</i>	DFNB77	613079	
	Stereocilijų jungtys	<i>USH1C</i>	USH1C	276904	
			DFNB18	602092	
		<i>WHRN</i>	DFNB31	607084	
			USH2D	611383	
	Mechaninių bangų perdavimas	<i>CDH23</i>	DFNB12	601386	
			USH1D	601067	
<i>PCDH15</i>		USH1F	602083		
<i>TMC1</i>		DFNB7/11	600974		
		DFNA36	606705		
Plyšinės jungtys	<i>GJB2</i>	DFNB1A	220290		
		DFNA3A	601544		
		<i>Bart-Pumphrey s.</i>	149200		

2 lentelė (tęsinys). KS genų koduojamų baltymų lokalizacija ląstelėje ir funkcija

Genų vieta	Baltymų vieta / funkcija	Genas	Liga	MIM
Branduolio genai	Plyšinės jungtys	<i>GJB2</i>	Palmoplantarinė keratoderma	148350
			Ichtiozė su KS	602540
			<i>Vohwinkel s.</i>	124500
			<i>KID</i>	148210
		<i>GJB3</i>	Digeninis KS	220290
			<i>GJB2/GJB3</i>	
			DFNA2B	612644
			Eritrokeratoderma	133200
	<i>GJB6</i>	DFNB1B	612645	
		DFNA3B	612643	
	Sandariosios jungtys	<i>CLDN14</i>	DFNB29	614035
		<i>MARVELD2</i>	DFNB49	610153
		<i>TJP2</i>	DFNA51	613558
	Neurometabolitų pernaša į sinapsinį plyšį	<i>SLC17A8</i>	DFNA25	605583
		<i>OTOF</i>	DFNB9	601071
<i>PJKV</i>		DFNB59	610220	
<i>DIAPH3</i>		AUNA1	609129	
<i>COMT2 (LRTOMT)</i>		DFNB63	611451	
Endolimfos homeostazė	<i>KCNQ1*</i>	JLNS1	220400	
	<i>KCNQ4</i>	DFNA2A	600101	
	<i>KCNE1*</i>	JLNS2	612347	
	<i>KCNJ10*</i>	EASTS	612780	
	<i>SLC26A4</i>	DFNB4	600791	
		<i>Pendred s.</i>	274600	
Ekstraceliulinės struktūros	<i>TECTA*</i>	DFNA8/12	601543	
	<i>OTOA*</i>	DFNB22	607039	
	<i>COCH*</i>	DFNA9	601369	
	<i>COL4A3,</i>	<i>Alport s.</i>	301050	
	<i>COL4A4</i>		203780	
	<i>COL4A5*</i>		104200	
	<i>COL11A2*</i>	DFNB13	609706	
Genų raiškos reguliavimas	<i>POU4F3</i>	DFNA15	602459	
	<i>POU3F4</i>	DFNX2	304400	
	<i>EYA4</i>	DFNA10	601316	
	<i>TFCP2L3(GRHL2)</i>	DFNA28	608641	
	<i>ESRRB</i>	DFNB35	608565	
	<i>MIR96</i>	DFNA50	613074	

2 lentelė (tęsinys). KS genų koduojamų baltymų lokalizacija ląstelėje ir funkcija

Genų vieta	Genas	Liga	MIM
Mitochondrijų genai	<i>MT-RNR1</i>	Nesindrominis KS	500008
	<i>MT-TSI</i>	<i>PMEAH</i> s. Nesindrominis KS	220110 500008
	<i>MT-CO1</i>	<i>Leigh</i> s.	256000
	<i>MT-TK</i>	<i>MERFF, MIDD</i>	545000 520000
	<i>MT-TE</i>	<i>MIDD</i>	520000
	<i>MT-TL1</i>	<i>MELAS, MIDD</i>	540000 520000

*Geno raiška nebūtinai vyksta plaukuotuosiose ląstelėse, bet turi įtakos jų funkcijai

Klausos funkcijos sutrikimai dėl branduolio genomo patogeninių variantų

Tinkama visų ląstelę sudarančių viduląstelinių baltymų struktūra svarbi tiksliam, kokybiškam garso suvokimui. Didžioji dalis visų baltymų, atliekančių įvairias su klausa susijusias funkcijas, koduojama branduolio genome. Plaukuotąsias ląsteles sudaro ląstelės kūnas ir plaukeliai (stereocilijos). Šių struktūrų sandaros pokyčiai, išsivystę dėl genetinių priežasčių, lemia įvairaus laipsnio ir pobūdžio klausos sutrikimą. Klausos sutrikimai skiriami į grupes pagal genų funkcijos pokyčius.

Stereocilijų sandaros ir funkcijos sutrikimai. Stereocilijos ląstelės paviršiuje sudaro kūgelius, turinčius būdingą formą ir dydį, jų ilgis reguliuojamas dėl nuolatinės aktinų apykaitos. Aktino polimerizacijos ir depolimerizacijos procesus veikia daugelis veiksnių, įskaitant miozinius. Motoriniai baltymai (miozinai, kinezinai, dineinai) juda išilgai filamentų, naudodami ATP energiją [71].

1. Stereocilijų judėjimas priklauso nuo miozinų. Miozinai – struktūriniai baltymai, aktino aktyvuojamos Mg^{2+} ATPazės, judančios išilgai aktino siūlų, naudojančios energiją, gaunamą iš ATP hidrolizės. Pagal motorinio domeno ypatybes skiriama 18-a tipų. **Mioziną VIIa** koduojančio geno *MYO7A* patogeniniai variantai lemia tiek *Usher* sindromo 1B tipą (*USH1B*), tiek nesindrominius DFNB2

and DFNA11 klausos sutrikimus [72]. Miozinas VIIa yra vidinių ir išorinių plaukuotųjų ląstelių citoplazmoje ir stereocilijose, reguliuoja aktino judėjimą stereocilijose, jų aukštį [73]. *MYO7A* geno patogeninių variantų atveju padidėja ląstelių elektrinės srovės slenkstis, pakinta jonų kanalų atsidarymas [74]. Kai kurie *MYO7A* patogeniniai variantai, susiję su 1B tipo *Usher* s., sutrikdo aktino aktyvuojamos Mg^{2+} ATPazės funkciją [75]. **Miozinas VI** dalyvauja endocitozės, Goldžio aparato formavimo, ląstelių migracijos, vezikulių judėjimo procesuose [76]. Miozino VI lokalizacija – plaukuotųjų ląstelių citoplazma, ypač apikalinis ląstelės galas, ir stereocilijos [77]. Miozinas VI, skirtingai nuo kitų miozinių, juda priešinga kryptimi – nuo stereocilijų galo žemyn link pagrindo. Dėl *MYO6* patogeninių pokyčių mažėja ATPazės aktyvumas, baltymai lieka stereocilijų galuose, kinta aktino judėjimas ir stereocilijų struktūra [78]. **Miozinas XVa**, koduojamas *MYO15A* geno, turi motorinį domeną baltymo N gale, du prie lengvųjų grandinių besijungiančius IQ motyvus, 2 pasikartojimus, sudarytus iš MyTH4 ir FERM domenų, kuriuos jungia SH3 domenas, bei PDZ ligandą baltymo C gale [79]. Tyrimai, atlikti su pelių modeliniais organizmais, parodė, kad MYO15A sąveika su virlinu reikalinga pastarajam pernešti į stereocilijų galus. FERM domenu (4.1 baltymas, ezrinas, radiksinas ir moezinas) baltymas sąveikauja su membranos baltymais, todėl MYO15A gali būti svarbus tiek sensorinio epitelio struktūrai, tiek funkcijai. Kiti miozinai, svarbūs klausos sutrikimų etiopatogenezeje: MYO1A (DFNA48), MYH9 (DFNA17), MYH14 (DFNA4) [80-83].

2. Stereocilijų citoskeleto tinklą sudaro trijų tipų baltymų pluoštai (filamentai): tarpiniai filamentai, mikrovamzdeliai ir aktino siūlai.

ACTG1 genas koduoja **aktino** gama izoformą, patogeniniai variantai lemia DFNA20 / DFNA26 [84]. *TRIOBP* koduoja prie aktino besijungiantį baltymą [85]. *DIAPH1* yra vaisinės muselės drozofilos geno *diaphanous* žmogaus homologas, kurio koduojamas baltymas dalyvauja aktino polimerizacijos procese vidinėje ausyje [86]. **Espinai** atlieka aktino siūlų sudarymo, stereocijų augimo ir ilgio reguliavimo funkcijas. Dėl *ESPN* geno patogeninių variantų susidaro trumpesnės ir

plonesnės stereocilijos [87]. **Radiksinas** – erzino / radiksino / moezino (ERM) baltymų šeimos narys. Šis baltymas aktino siūlus pritvirtina prie membranos. *RDX* geno patogeniniai variantai lemia nesindrominį klausos sutrikimą [88]. *CCDC50* genas koduoja baltymą, dalyvaujantį epidermio augimo veiksnio signalo perdavimo kelyje, svarbų mikrovamzdelių formavimuisi [89]. *TMIE* geno koduojamas baltymas svarbus tinkamai bręsti plaukuotosioms ląstelėms, susiformuoti stereocilijoms [47].

3. Stereocilijų membrana, jungtys ir mechaninių bangų perdavimas.

Stereocilijų jungtys atlieka svarbią funkciją garso perdavimo procese. Adhezijos baltymais stereocilijos jungiasi tarpusavyje ir su dengiamąja membrana. Pelių sraigėse stereocilijų brendimo metu susidaro laikinos jungtys, palaikančios struktūros stabilumą ir (ar) indukuoja signalus, reikalingus augimui ir formai reguliuoti. Subrendusioje ląstelėje stereocilijas jungia viršūnės jungtys (angl. *tip links*), horizontaliosios viršutinės jungtys (angl. *horizontal tip link*), su dengiamąja membrana jungiasi dengiamosios membranos vainiko baltymais. Identifikuoti keletas genų, svarbių stereocilijų jungtims formuoti: *WHRN* (virlino genas), *USH1C* (harmonino genas), *TMHS* (membranos baltymas), *PTPRQ* (tirozino fosfato Q receptoriaus genas), *STRC* (stereocilino genas), *CEACAM16* (su karcinogeniniu antigenu susijusios 16-os ląstelės adhesijos molekulės genas), *OTOA* (otoankorino genas), *PCDH15* (15 protokadherino genas) ir *CDH23* (23 kadherino genas). *WHRN* genas koduoja baltymą **virliną**, dalyvaujantį aktino apykaitos ir stereocilijų ilgėjimo procesuose, patogeniniai variantai lemia DFNB31 klausos sutrikimą [90]. *USH1C* genas koduoja **harmoniną**, kartu su virlinu reguliuojantį jungčių formavimąsi [91], patogeniniai variantai lemia DFNB18. *USH2A* ir *VLGR1B* genai, siejami su *Usher* sindromu, yra stereocilijų apatinės jungties baltymai [92]. **23 kadherinas** ir **15 protokadherinas** kartu su **PTPRQ** ir **TMHS** formuoja laikinąsias šonines stereocilijų jungtis. Jie apsaugo stereocilijas nuo susijungimo ir palaiko atstumą tarp jų ląstelėms bręstant. Subrendusiose ląstelėse šie baltymai tampa pagrindiniais viršūnės jungtis formuojančiais

proteinais. Jie atlieka stabilumo palaikymo funkciją, kartu vykdo mechaninių bangų perdavimo signalo funkciją, kuri yra pati svarbiausia garsui perduoti [93]. **Stereocilinas** yra ekstraceliulinis baltymas, sudarantis tiek horizontaliąsias jungtis, tiek aukščiausios stereocilijos jungtis su dengiamosios membranos vainiku [94], kurį sudaro **CEACAM16**. Tokiu pačiu principu prie dengiamosios membranos nesensorinių ląstelių stereocilijas prijungia **otoankorinas** [95].

Tarpląstelinių jungčių pokyčiai. Ląstelės, jungdamosi tarpusavyje, sudaro tinklą, kuriuo vyksta biologiškai aktyvių medžiagų judėjimas arba palaikoma audinio struktūra. Plaukuotosios ląstelės turi dviejų tipų jungtis – plyšines ir sandariąsias.

1. Plyšinių jungčių funkcija ypač svarbi vidinės ausies formavimuisi. Sumažėjus *GJB2* geno raiškai prenataliniu laikotarpiu, sutrinka sraigės kanalo vystymasis, garso amplifikacijos procesai, todėl vystosi klausos sutrikimas [96]. Anksčiau manyta, kad klausos sutrinka dėl K^+ jonų judėjimo plyšinėmis jungtimis iš plaukuotųjų ląstelių link kraujagyslinio ruoželio (lot. *stria vascularis*), sutrikimo, endolimfoje mažėja K^+ koncentracija, sutrinka mechanoelektrinis signalo perdavimo procesas [97], tačiau dabar paaiškėjo, kad šis mechanizmas nėra pagrindinis ligos patogenezėje. *GJB2* genas koduoja baltymą koneksiną 26, kuris kartu su koneksinu 30 (koduojamu *GJB6* geno) sudaro junginį – koneksoną, formuojantį tarpląstelines jungtis. *GJB2* ir *GJB6* genai yra netoli vienas kito 13-oje chromosomoje (DFNB1 genetinė sritis), jų abiejų raiška vyksta vienu metu, sudarant bendrą transkripcijos vienetą. Didelės (iki 321 kb) *GJB6* geno iškritos sutrikdo *GJB2* ir *GJB6* genų transkripciją, todėl nevyksta koneksino 26 ir koneksino 30 transliacija. DFNB1 klausos sutrikimo atveju galimas digeninis paveldėjimo modelis – didelė *GJB6* geno iškrita vienoje chromosomoje ir *GJB2* geno patogeninis variantas kitoje, nebus sintetinamas koneksinas 26, dėl jo stokos sutriks koneksonų susidarymas [97]. Atlikus funkcinius tyrimus nustatyta, kad klausos sutrikimo fenotipas labai priklauso nuo patogeninio varianto pobūdžio ir formuojasi dėl šių mechanizmų [98]: (1) didžioji dalis pakitusių baltymų nėra pernešami į

ląstelės paviršių, todėl sutrinka koneksonų susidarymas; (2) dominantinis (dominantinis neigiamas) poveikis normalios struktūros koneksinui 26, kurio raiška vyksta nuo nepakitusio geno alelio; (3) susidariusio koneksono aktyvumo sumažėjimas; (4) koneksono pralaidumo kokybinis pokytis (praleidžia jonus, bet nepraleidžia kitų smulkių molekulių, pvz., IP₃); (5) susidaro homotipiniai kanalai tik iš koneksonų 26, bet nesudaro funkcionalių heterotipinių kanalų; (6) susiformuoja hemikanalai, atviri esant normaliai Ca²⁺ koncentracijai ląstelėje, todėl vyksta ląstelių apoptozė; (7) sutrinka plyšinių jungčių formavimasis tarp ląstelių. Plyšines jungtis formuojančius baltymus koduojančių genų patogeniniai variantai (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*) lemia tiek sindrominį (pvz.: KID s., *Vohwinkel* s.), tiek nesindrominį klausos sutrikimą [25, 99].

2. Sandariosios jungtys (koduojamos *CLDN14*, *TRIC* ir *TJP2* genų) tarp sraiginio latako (lot. *scala media*) epitelio ląstelių sudaro mechaninį barjerą, trukdantį K⁺ jonų skverbimuisi iš endolimfos į tarpląstelius tarpus. Nesant **klaudino 14** (koduojamo *CLDN14* geno), K⁺ jonai difuzijos būdu skverbiasi į tarpląstelinį audinį, esantį tarp išorinių plaukuotųjų ląstelių, sukeldami ilgą jų depoliarizaciją, kuri lemia ląstelių apoptozę. Klaudinių baltymų (kod. *CLDN* genų) grupę sudaro daugiau kaip 24-i membranos baltymai, jų tarpusavio skirtumai lemia barjero selektyvumą konkretiems jonams. *CLDN14* geno raiška vyksta ne tik plaukuotosiose ląstelėse, bet ir vestibuliniame vidinės ausies aparate, inkstų epitelyje, hepatocituose, tačiau, esant patogeniniams variantams, vystosi tik klausos sutrikimas [100]. Dėl *CLDN14* geno patogeninių variantų jungčių sandara nepakinta (kompensaciniai kitų klaudinių persitvarkymai), tačiau barjerinės funkcijos nebeatlieka. Klaudinai ne tik atlieka barjerinę bei adhezijos funkcijas, bet ir reguliuoja ląstelių poliarizacijos ir signalinių molekulių kaupimosi prie membranos procesus, todėl dalyvauja ląstelės proliferacijos, diferenciacijos ir genų raiškos procesuose [101].

TRIC genas koduoja **triceliuliną**, sudarantį sandariąsias jungtis ties trijų epitelio ląstelių susijungimo vieta. Geno patogeniniai variantai lemia vidutinį ir sunkų

klausos sutrikimą DFNB49 [102]; *DFNB49* pradžioje buvo kartografuota chromosomos srityje, kurioje yra ir *OCN* genas, koduojantis **okludina**. Tai membraninis baltymas, taip pat atliekantis adhezijos ir barjerinę bei signalinio centro funkcijas. Okludinas ir kaudinas jungiasi su TJP (angl. *tight junction proteins*) baltymais. Triceliulinas ir okludinas turi tą patį konservatyvų domeną, kuriuo jungiasi su TJP baltymais. Dėl patogeninių variantų pakitus šiam domenui (ypač jei baltymas trumpesnis dėl dalies geno iškritos), sutrinka sąveika su TJP1 baltymu, plaukuotosios ląstelės citoskeleto aktinas nesujungiamas su stereocilijomis, todėl jos netinkamai reaguoja į mechanines garso bangas, vystosi klausos sutrikimas [102]. *TJP2* geno patogeniniai variantai siejami su progresuojančiu DFNA51 klausos sutrikimu. Tandeminė invertuota genomo srities duplikacija, kurioje yra nepakitusi *TJP2* geno seka, lemia geno raiškos ir baltymo transliacijos sustiprėjimą. TJP2 baltymas sudaro sandarias jungtis tarp plaukuotųjų ląstelių ir atraminių ląstelių Kortijaus organe, taip pat sąveikaudamas su daugeliu baltymų atlieka signalo perdavimo funkciją. TJP2 baltymas yra ir branduolyje, kur sąveikauja su keletu transkripcijos veiksnių. Padidėjusi *TJP2* raiška sutrikdo normalų viduląstelinį signalo perdavimą, todėl vyksta netinkama apoptozės genų raiška, skatinanti plaukuotųjų ląstelių žūtį ir klausos sutrikimą [103].

Neurometabolitų pernašos į sinapsinį plyšį sutrikimai. Auditorinė neuropatija – klausos sutrikimas, kurį lemia klausos nervo funkcijos pažeidimas. Nustatyti 4 genai, kurių patogeniniai variantai siejami su klausos neuropatija: *SLC17A8*, *OTOF*, *PJVK* ir *DIAPH3*. Pirminis pažeidimas gali būti plaukuotojoje ląstelėje, nervo galūnėlėje, tarp jų esančioje sinapsėje ir tolesniame nervinio impulso plitimo kelyje. *SLC17A8* geno koduojamas VGLUT3 baltymas ir *OTOF* koduojamas **otoferlinas** yra pagrindiniai plaukuotosios ląstelės ir nervinės galūnėlės sinapsės komponentai. **VGLUT3** baltymas priklauso glutamatų pernašos baltymų grupei. Glutamatas – pagrindinis aktyvuojantis neurosiuntiklis plaukuotosios ląstelės ir nervinės galūnėlės sinapsėje bei CNS. Glutamato molekulių kaupimasis sinapsinėse pūslelėse priklauso nuo VGLUT baltymų

aktyvumo. *SLC17A8* geno patogeniniai variantai pakeičia labai konservatyvią aminorūgščių baltymo struktūroje. Sinapsinės pūslelės, prisipildžiusios glutamato molekulių, iš plaukuotųjų ląstelių išsina į sinapsinį plyšį ir jų turinys išsilieja ant nervo galūnėlės. VGLUT3 baltymo stoka sutrikdo glutamato molekulių reabsorbciją iš sinapsinio tarpo bei jų atpalaidavimą iš sinapsinės pūslelės [104]. **Otoferlinas**, koduojamas *OTOF* geno, dalyvauja vėlyvame sinapsinės pūslelės egzocitozės procese. Geno patogeniniai variantai siejami su klausos neuropatija (DFNB9). Otoferlinas – prie membranos besitvirtinantis citoplazmos baltymas, turintis trumpą ir ilgą izoformą, sudarytas iš transmembraninio baltymo domeno TM ir konservatyvių pasikartojančių C2 domenų [105]. Visi nustatyti DFNB9 lemiantys patogeniniai variantai pakeičia baltymo C2 domeną koduojančią geno seką. Remiantis otoferlino struktūros panašumu į kitus baltymus (disferliną, FER1 baltymą), daroma išvada, kad jo funkcija – nuo Ca^{2+} priklausomo sinapsinių pūslelių ir vidinių plaukuotųjų ląstelių membranų susiliejimo reguliavimas [106].

PJVK genas, koduojantis baltymą **pejvakina**, buvo antras genas, kurio patogeniniai variantai susieti su nesindromine klausos neuropatija (DFNB59). Geno raiška vyksta spiraliniuose nerviniuose mazguose, pusiausvyros ir Kortijaus organo ląstelėse, sraigės nerviniuose mazguose bei CNS struktūrose, kuriomis vyksta garsinio signalo perdavimas [107]. Pejvakinas turi sekos homologiją su *DFNA5* genu, kurio koduojamas baltymas dalyvauja p53 reguliuojamame atsake į DNR pažaidas, atlieka auglių slopinančio baltymo funkcijas. Dėl geno *PJVK* patogeninių variantų pakinta išorinių plaukuotųjų ląstelių bei klausos neuronų morfologija ir funkcija [108].

DIAPH3 geno, koduojančio *diaphanous* homologą 3, patogeniniai variantai lemia AUNA1 autosominio dominantinio paveldėjimo klausos sutrikimą. Patogeniniai pokyčiai nustatyti 5' reguliacinėje geno srityje, GC atkarpoje, esančioje prieš translacijos pradžios tašką iRNR. Keletas transkripcijos veiksnių jungiasi prie šios labai konservatyvios RNR atkarpos, atlikdami translacijos aktyvavimo arba slopinimo funkciją. Sergančių asmenų *DIAPH3* geno raiška

padidėja. Atliekant tyrimus su vaisinėmis muselėmis (lot. *D. melanogaster*), nustatytas neigiamas didelės homologinio geno raiškos poveikis jų klausos organui [109].

Skystosios vidinės ausies terpės (endolimfos) homeostazės sutrikimai.

Tinkamam vidinės sraigės ląstelių funkcionavimui turi būti palaikoma stabili endolimfos sudėtis. Elektrolitai iš ląstelės ir į ląstelę juda jonų kanalais, tokiu būdu užtikrinama ląstelės ir endolimfos pH, elektrolitų koncentracija (2 pav., D ir E).

Ląstelių membranų K^+ kanalai ir kalio pernašos baltymai vykdo K^+ jonų apykaitą. Juos koduojančių genų (*KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNQ4*, *KCNJ10* ir *SLC12A2*) patogeniniai variantai lemia nesindrominį arba sindrominį (pvz.: *Jerrvel–Lange – Nielsen* s.) klausos sutrikimą [110-112].

Cl^- , I^- , HCO_3^- jonų pernašą per ląstelės membraną atlieka *SLC26A4* baltymas. Dėl sutrikusios HCO_3^- pernašos mažėja endolimfos pH, auga Ca^{2+} (žemas pH blokuoja Ca kanalus), netiesiogiai sutrikdoma *KCNJ10* raiška kraujagysliniame ruoželyje (lot. *stria vascularis*) ir K^+ apykaita [113]. *SLC26A4* geno patogeniniai variantai lemia ikikalbinį kurtumą, vidinių ausies ertmių išsiplėtimą (sraigės hipotiroidizmas), vidinės ausies ertmėse formuojasi didžiuliai kalcio oksalatų akmenys, kai kurie patogeniniai variantai lemia *Pendred* sindromą (kurtumas ir skyd liaukės padidėjimas su hipofunkcija);

Ekstraceliulinių struktūrų pakitimai. Vidinės ausies funkcijos priklauso ne tik nuo ląstelių, bet ir nuo tarpląstelinio audinio baltymų, esančių dengiamojoje plėvėje ir pamatinėje membranoje. Šiame procese svarbi tinkama ekstraceliulinių baltymų raiška.

COL4A3, *COL4A4* ir *COL4A5* genai koduoja $\alpha 3$, $\alpha 4$ ir $\alpha 5$ IV tipo kolageno heterotrimerą. **Kolagenai** – svarbūs tarpląstelinės struktūros baltymai, formuojantys audinių karkasą. Dėl patogeninių variantų koduojančiuose genuose vystosi AR, AD, arba XD paveldėjimo *Alport* sindromas (klausos sutrikimas, nefrozinis sindromas, akių patologija). Genetiniai pokyčiai padidina kolageno tinklo raišką hipoksijos sąlygomis arba veikiant endotelinui-1, todėl storėja

kraujagyslinio ruoželio pamatinė membrana, sutrinka jo ląstelių funkcija, vystosi pažeidimas [114].

Keletas kitų tarpląstelinio audinio baltymų, koduojamų *TECTA* geno (**a-tekto**rinas), *COL11A2* geno (XI tipo $\alpha 2$ kolagenas), *COCH* geno (**coch**linas), yra siejami su skirtingomis nesindrominio ir sindrominio klausos sutrikimo formomis [115-119].

Genų raiškos reguliavimo sutrikimai. POU3F4 ir POU4F3 transkripcijos veiksniai, koduojami *POU3F4* ir *POU4F3* genų, turi POU domenus, didinančius specifiškumą konkrečiai DNR sekai. Dėl patogeninių pokyčių sutrikdomas plaukuotųjų ląstelių brendimas ir gyvavimas, vyksta jų apoptozė, vystosi atitinkamai DFNX2 ir DFNA15 klausos sutrikimas [120, 121].

EYA4 baltymas (koduojamas *EYA4* geno) – transkripcijos veiksnys (histonų tirozino fosfatazė), svarbus Kortijaus organo brendimui, geno patogeniniai variantai lemia vėlyvą progresuojantį klausos sutrikimą (DFNA10) [122].

TFCP2L3 (*GRHL2*) geno patogeniniai variantai lemia progresuojantį klausos sutrikimą DFNA28, koduojamas baltymas atlieka epigenetinį kitų genų raiškos reguliavimą (geno vieno nukleotido polimorfizmai siejami ir su amžiniu klausos sutrikimu) [123];

ESRRB genas priklauso estrogenų β (beta) receptorių, esančių ląstelės branduolyje, genų šeimai. Geno raiška vyksta kraujagyslinio ruoželio ląstelėse, baltymas aktyvuoja daugelio genų, koduojančių jonų kanalus formuojančius baltymus, raišką, todėl svarbus endolimfos homeostazei palaikyti. Patogeniniai variantai lemia DFNB35 [124].

Geno, koduojančio miRNR-96, patogeniniai variantai sutrikdo šios miRNR biogenezę, mažėja jos RNR taikinių kontrolė, spartėja plaukuotųjų vidinės ausies ląstelių degeneracija, stereocilijos susilieja ir tai lemia progresuojantį klausos sutrikimą (DFNA50) [125].

Klausos funkcijos sutrikimai dėl mitochondrijų genomo patogeninių variantų. Transportinių ir ribosominių RNR pakitimai sutrikdo mitochondrijų

baltymų sintezę ir oksidacinį fosforilinimą, mažėja energijos gamyba ląstelių mitochondrijose, vystosi sindrominis arba nesindrominis klausos sutrikimas.

Mitochondrijų ribosomų RNR koduojančio geno *MT-RNR1* m.1555A>G ir m.1494C>T patogeniniai variantai lemia padidėjusį asmens jautrumą aminoglikozidų vartojimui [126]. Pakitusi mitochondrijų ribosomų 12S rRNR struktūra palengvina aminoglikozidų molekulių prisijungimą, dėl to sutrinka mitochondrijų baltymų sintezė ir kvėpavimo grandinės funkcija.

Transportines RNR koduojančių genų pokyčiai lemia tRNR apykaitos sutrikimus. *MT-TS1* genas – karštasis patogeninių variantų, lemiančių nesindrominį klausos sutrikimą, taškas (m.7445A>G, m.7472insC, m.7505T>C, m.7510T>C ir m.7511T>C patogeniniai variantai) [127]. *MT-TS1* genas siejamas ir su sindromine KS forma – *PMEAH* sindromu.

MT-TK genas koduoja transportinę RNR, nešančią aminorūgštį liziną. Dėl patogeninių variantų (m.8344A>G, m.8356T>C, m.8363G>A, m.8296A>G ir kt.) sutrinka baltymų sintezė ląstelėje, dažniausiai dėl translacijos sustojimo aminorūgšties lizino vietoje. Ima trūkti daugelio kvėpavimo grandinės fermentų, sutrinka mitochondrijų funkcija [128], pasireiškia *MERRF* / *MELAS* s., kurtumo ir kardiomiopatijos s., kurtumo ir cukraligės s. [129].

MT-TE genas koduoja transportinę RNR, nešančią aminorūgštį glutaminą. Variantas m.14692A>G pakeičia konservatyvią uridino bazę tRNR, kuri RNR modifikuojama į pseudouridina. Dėl varianto neįvyksta modifikacija, tRNR neįgyja reikalingos tretinės struktūros, intensyvėja tRNR degradavimas. Sutrikusi tRNR ir Glu apykaita lemia mitochondrijų disfunkciją dėl baltymų translacijos mitochondrijose sutrikimo, sumažėjusio mitochondrijų membranos potencialo ir ATP produkcijos, padidėjusios reaktyviųjų deguonies radikalų produkcijos.

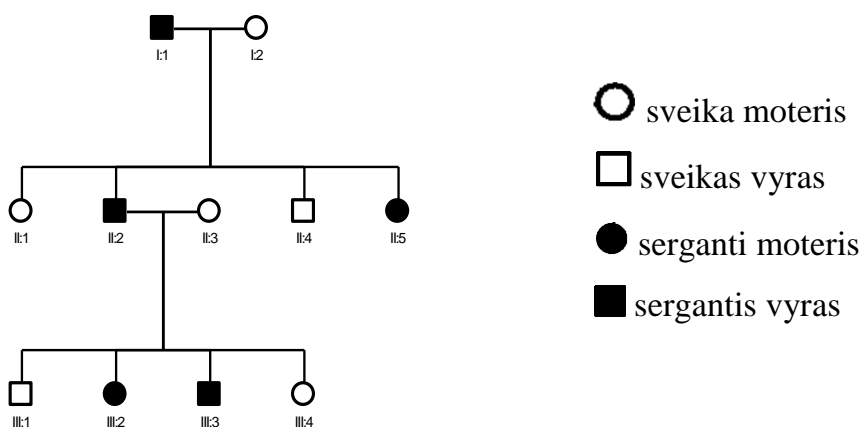
MT-COI koduoja citochromo c oksidazės 1 subvienetą, dėl patogeninių pokyčių sutrinka kvėpavimo grandinės funkcija, energijos gamyba ląstelėje, m.7444G>A patogeninis variantas, nustatytas kartu su *MT-RNR1* m.1555A>G, siejamas su klausos sutrikimu.

II.9. Klinikiniai paveldimo klausos sutrikimo aspektai

Klausos sutrikimo paveldėjimo tipai

Autosominis dominantinis (AD) paveldėjimas

- Paveldimą klausos sutrikimą lemia viena pakitusi geno kopija;
- Klausos sutrikimą turinčių asmenų yra visose kartose (žr. 4 pav.);
- Asmens, turinčio patogeninį variantą, vaikai turi 50 proc. tikimybę jį paveldėti ir sirgti.



4 pav. Autosominio dominantinio paveldėjimo genealogijos pavyzdys

Autosominio dominantinio paveldėjimo nesindrominis klausos sutrikimas

Dažniausiai vystosi pokalbinis progresuojantis klausos sutrikimas, paprastai sutrinka aukštų dažnių garsų klausa.

AD paveldimo klausos sutrikimo atveju nebuvo nustatyta vienos pagrindinės paveldimos priežasties, liga pasižymi dideliu genetiniu heterogeniškumu, dažniausiai nustatomi *DIAPH1*, *KCNQ4*, *GJB3*, *GJB2*, *GJB6*, *MYH14*, *DFNA5*, *WFS1*, *TECTA*, *COCH*, *EYA4*, *MYO7A*, *COL11A2*, *POU4F3*, *MYH9*, *ACTG1*, *MYO6*, *SIX1*, *SLC17A8*, *GRHL2*, *TMCI*, *DSPP*, *P2RX2*, *CCDC50*, *MYO1A*, *MIR96* genų patogeniniai variantai. Iš viso identifikuoti 36 genai, siejami su AD paveldėjimo nesindrominiu klausos sutrikimu. Šiuo atveju genetinių tyrimų pasirinkimui gali pagelbėti audioprofilio įvertinimas. Priklausomai nuo geno,

klausos sutrikimas gali būti aukštų, vidutinių arba žemų dažnių progresuojantis [68].

Autosominio dominantinio paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas

AD paveldėjimo sindrominis KS taip pat pasižymi didele fenotipine įvairove ir plačiu spektru kitų audinių / organų struktūros / funkcijos pakitimu.

Waardenburg sindromas – dažnas sindrominis klausos sutrikimas, kuriam būdingas įvairaus laipsnio neurosensorinis klausos sutrikimas bei pigmentinės odos, akių, plaukų anomalijos (akių rainelių heterochromija, depigmentuota plaukų sruoga) [130]. Skiriami keturi tipai:

– I tipui (MIM 193500) būdinga lateralinis vidinių akies kampų poslinkis (lot. *dystopia canthorum*), ligą lemia *PAX3* geno patogeniniai variantai. *PAX3* geno produktas – transkripcijos veiksnys – atlieka *MITF* geno raiškos reguliaciją. Pakitus *MITF* geno raiškai, sutrinka odos melanocitų ir tarpinių plaukuotųjų sraigės ląstelių diferenciacija, vystosi klausos ir odos pigmentacijos sutrikimai [131];

– II tipo a–e potipių (MIM 193510, 600193, 606662, 608890, 611584) atveju lateralinio vidinių akies kampų poslinkio (lot. *dystopia canthorum*) nėra (daliai pacientų nustatyti *MITF* geno patogeniniai variantai [131]);

– III tipui (MIM 148820) būdingos rankų anomalijos (lemia *PAX3* geno patogeniniai variantai);

– IV tipo a–c potipiams (MIM 277580, 613265, 613266) būdinga *Hirschprung* liga (lemia *EDNRB*, *EDN3* ir *SOX10* genų patogeniniai variantai). *EDN3* genas koduoja endoteliną 3, *EDNRB* genas – endotelino 3 receptorių, *SOX10* genas atlieka reguliacinę *EDNRB* geno funkciją. Suderinta genų veikla svarbi tinkamai melanoblastų ir enterinės nervų sistemos neuroblastų migracijai embriogenezės laikotarpiu [130].

Branchiotoarenaliniam (BOR) sindromui (MIM 113650, 610896) būdingas kondukcinis, neurosensorinis arba mišrus klausos sutrikimas ir branchialinės cistos arba fistulės, išorinės ausies vystymosi ydos (duobutės), inkstų vystymosi

anomalijos [132]. Sindromą lemia *EYA1*, *SIX1*, *SIX5* genų patogeniniai variantai [132]. *EYA1*, *SIX1* dalyvauja vidinės ausies, galvos smegenų sensorinių nervinių ganglijų bei inkstų formavimosi reguliacijos mechanizmuose.

Stickler sindromas (MIM 108300, 609508, 604841, 614134, 614284) pasižymi progresuojančiu neurosensoriniu klausos sutrikimu, gomurio nesuaugimu, osteoartritu. Skiriami 5 tipai, juos lemia atitinkamai *COL2A1*, *COL11A1*, *COL11A2*, *COL9A1*, *COL9A2* genų patogeniniai variantai. Pirmam ir antram tipui būdinga aukšto laipsnio trumparegystė, galinti būti tinklainės atšokos priežastimi. *COL2A1*, *COL11A1*, *COL11A2* genai koduoja 2A1, 11A1 ir 11A2 tipo kolageną, dalyvaujantį jungiamojo audinio formavimosi procesuose, vidinės ausies morfogenezeje [133].

Neurofibromatozės II tipas (MIM 101000) – klausos sutrikimas vystosi antruoju–trečiuoju gyvenimo dešimtmečiu dėl klausos nervų švanomų. Procesas dažniau vienpusis ir laipsniškas, rečiau abipusis ir staigus. Šie asmenys turi polinkį susidaryti ir kitiems navikams – meningiomai, astrocitomai, ependimomai. Ligos vystymąsi lemia *NF2* geno patogeniniai variantai. *NF2* genas koduoja baltymą, atliekantį navikų augimo slopinimo funkciją ląstelėje. Dėl patogeninių variantų vystosi klausos nervo dangalų navikai – švanomos, kurios sutrikdo impulso sklaidimą klausos nervu [134].

Treacher–Collins sindromui (MIM 154500, 248390, 613717) būdingas kondukcinis klausos sutrikimas, išorinės ausies vystymosi anomalijos, kraniofacialinis dismorfizmas – viršutinių žandikaulių displazija, mikrognatija, įstriži žemyn nusileidžiantys vokų plyšiai [135]. 90–95 proc. pacientų nustatomi *TCOF1* geno patogeniniai variantai. Dėl geno haplonepakankamumo sutrinka ribosominės RNR brendimas ir ribosominę DNR koduojančių genų raiška. *TCOF1* geno raiška aktyviausia formuojantis rykliniams lankams, todėl patogeniniai variantai sutrikdo kraniofacialinio komplekso morfogenezę.

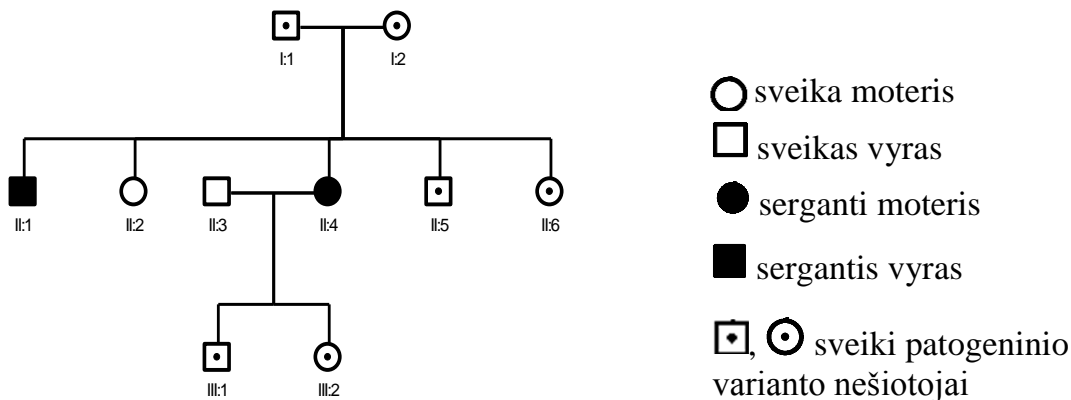
CHARGE sindromas (MIM 214800) pasižymi akių koloboma, širdies anomalijomis, choanų atrezija, raidos atsilikimu, genitalijų, ausų anomalijomis ir

(ar) klausos sutrikimu [136]. Patologiją lemia *CHD7* geno patogeniniai variantai, dėl kurių sutrinka nervinės keteros ląstelių migravimas embriogenezės laikotarpiu [137].

Autosominis recesyvus paveldėjimas

- Paveldimą kurtumą lemia abi pakitusios geno kopijos;
- Šeimos genealogijoje ligos atvejų gali nebūti (sporadiniai atvejai) arba serga keli sibsai, giminingose santuokose vaikų, turinčių klausos sutrikimą, gimsta dažniau (žr. 5 pav.);
- Asmenų, turinčių recesyvų patogeninį variantą (nešiotojų), vaikai turi 25 proc. tikimybę paveldėti abu patogeninius variantus ir sirgti.

Autosominio recesyvaus (AR) paveldėjimo nesindrominis klausos sutrikimas



5 pav. Autosominio recesyvaus paveldėjimo genealogijos pavyzdys

Šio paveldėjimo klausos sutrikimui būdinga ikikalbinė ligos pradžia, gilus arba visiškas stabilus visų garso bangų dažnių klausos pažeidimas.

Daugelyje pasaulio populiacijų *GJB2* geno patogeniniai variantai nustatomi ~50 proc. ligos atvejų, rečiau nustatomi AR paveldėjimo KS lemiantys *GJB6*, *OTOF*, *STRC*, *ESPN*, *PCDH15*, *MYO15A*, *CDH23*, *TECTA*, *TMPRSS3*, *TMC1*, *PJVK*, *TMIE*, *TRIOBP*, *SLC26A4* genų patogeniniai variantai [138]. Iš viso identifikuoti 66 genai, siejami su AR paveldėjimo nesindrominiu KS.

Autosominio recesyvaus paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas

Usher sindromui (MIM 276900, 276901, 276902, 276904, 500004, 601067, 602083, 602097, 605472, 606943, 611383, 612632, 614504, 614869, 614990) būdingas įgimtas neurosensorinis klausos sutrikimas, vėliau vystosi pigmentinis retinitas. Liga pasižymi dideliu genetiniu heterogeniškumu – nustatyta 16 genų, dalyvaujančių plaukuotųjų ląstelių strereocilijų vystymosi ir tarpusavio jungčių susidarymo procesuose, kurių patogeniniai variantai lemia sindromo pasireiškimą. Klinikiniu požiūriu skiriami trys tipai:

– I tipui būdingas didelio laipsnio klausos sutrikimas arba visiškas kurtumas, sutrikusi vestibulinė funkcija (lemia *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* ir kt. genų patogeniniai variantai) [139];

– II tipui būdingas klausos sutrikimas nuo lengvo iki sunkaus, vestibulinė funkcija nesutrikusi (sukelia *USH2A*, *GPR98* ir *DFNB31* genų patogeniniai variantai) [140];

– III tipo atveju klausos sutrikimas ir vestibulinė disfunkcija progresuojančio pobūdžio (*CLRN1* geno patogeniniai variantai).

Pendred sindromas (MIM 274600) pasižymi įgimtu neurosensoriniu didelio laipsnio arba visišku klausos sutrikimu ir eutiroidine struma, kuri vystosi iki paauglystės ar net suaugusiam asmeniui. Kurtumą lemia kaulinio labirinto formavimosi sutrikimai – *Mondini* displazija ir prieangio latako (lot. *aqueductum*) išsiplėtimas. Daugelio ligonių vestibulinė funkcija yra sutrikusi. 50 proc. probandų nustatomi *SLC26A4* geno patogeniniai variantai (žr. endolimfos homeostazės sutrikimus) [141].

Jervell ir Lange–Nielsen sindromas (MIM 220400, 612347). Ligai būdingas įgimtas klausos sutrikimas ir QTc intervalo pailgėjimas (>440 ms) elektrokardiogramoje. Pacientams nustatomi *KCNQ1* ir *KCNE2* (koduoja kalio kanalų ir kalio pernašos baltymus) patogeniniai variantai, dėl kurių sutrinka vidinės ausies endolimfos homeostazė.

Biotinidazės stoka (MIM 253260) vystosi dėl *BTD* geno, koduojančio biotinidazę – fermentą, atliekantį biocistino hidrolizę į biotiną ir liziną, patogeninių variantų. Biotinas (vandenyje tirpus vitaminas) dalyvauja ląstelės medžiagų apykaitoje. Sutrikimas pasižymi biotino (B7 vitamino) trūkumo požymiais – neurologiniais simptomais (traukuliais, hipertonija, raidos atsilikimu, regos nervo atrofija, neurosensoriniu klausos sutrikimu), odos patologija (bėrimai, alopecija, konjunktyvitas). Gydant biotinu, dauguma neurologinių ir odos simptomų išnyksta, tačiau klausos ir regos sutrikimai dažniausiai yra negrįžtami [142].

Su X chromosoma susijęs dominantinis (XD) paveldėjimas

XD paveldėjimas pasižymi tomis pačiomis ypatybėmis, kaip AD paveldėjimas. Pagrindinis skirtumas – XD paveldima liga sergančios moterys dažniausiai turi lengvesnę ligos formą nei vyrai.

XD paveldėjimo nesindrominis klausos sutrikimas

SMPX šiuo metu yra vienintelis X chromosomoje identifikuotas genas, kurio patogeniniai variantai lemia XD paveldėjimo ikikalbinį nesindrominį klausos sutrikimą [143].

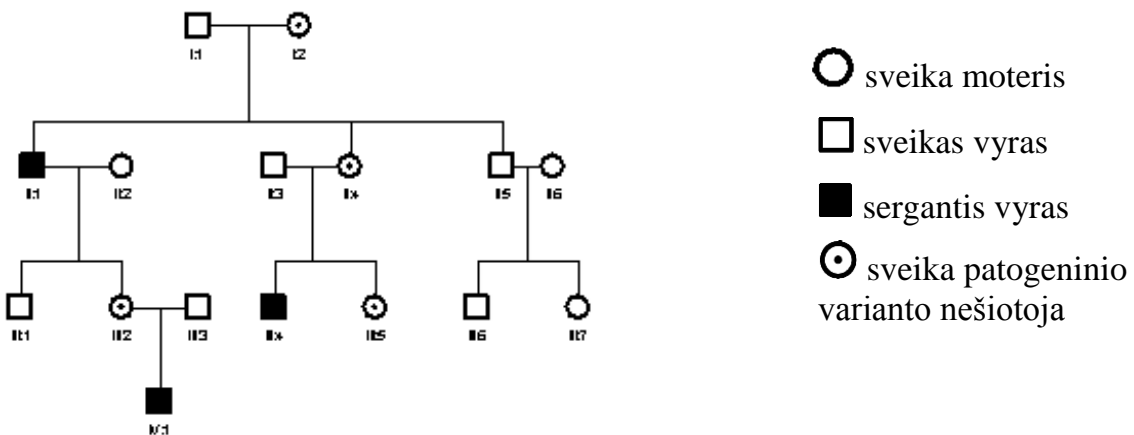
XD paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas

Alport sindromui (MIM 104200, 203780, 301050) būdingas progresuojantis neurosensorinis klausos sutrikimas ir inkstų glomerulonefritas bei akių simptomai (pvz.: kūgio formos priekinis lęšiuko paviršius (lot. *lenticonus anterior*) [144]. Sindromas gali būti X dominantinio paveldėjimo (85 proc. atvejų), kurį lemia *COL4A5* geno patogeniniai variantai, autosominio recesyvaus (15 proc. atvejų, *COL4A3* ir *COL4A4* genų patogeniniai variantai) ir autosominio dominantinio paveldėjimo (pavieniai atvejai). IV tipo kolagenas atlieka svarbią funkciją pamatinės inkstų, vidinės ausies, akies membranos formavimo procesuose. Dėl patogeninių variantų pakinta pamatinės membranos struktūra ir gebėjimas atlikti

funkciją, todėl sutrinka vidinės sraigės endolimfos homeostazės, šlapimo filtravimo glomeruluose procesai.

Su X chromosoma susijęs recesyvus (XR) paveldėjimas

- Serga vyriškosios lyties asmenys (žr. 6 pav.);
- Moters patogeninio varianto nešiotojos sūnūs turi 50 proc. tikimybę sirgti;
- Moters patogeninio varianto nešiotojos dukterys turi 50 proc. tikimybę būti nešiotojos.



6 pav. X recesyvaus paveldėjimo genealogijos pavyzdys

X recesyvaus paveldėjimo nesindrominis klausos sutrikimas

DFNX3 klausos sutrikimas (dėl *POU3F4* geno patogeninių variantų) pasižymi tiek kondukciniu (dėl kilpelės fiksacijos), tiek neurosensoriniu komponentu, šiuo atveju chirurginis gydymas neveiksmingas. Kitiems X recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimams būdingas įvairus ligos pradžios amžius, sunkumo laipsnis.

X recesyvaus paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas

Mohr–Tranebjaerg sindromui (MIM 304700) būdingas progresuojantis klausos sutrikimas, distonija, regos nervo atrofija, intelektinė negalia. Sergantiems asmenims nustatomi *TIMM8A* geno patogeniniai variantai, dėl kurių sutrinka

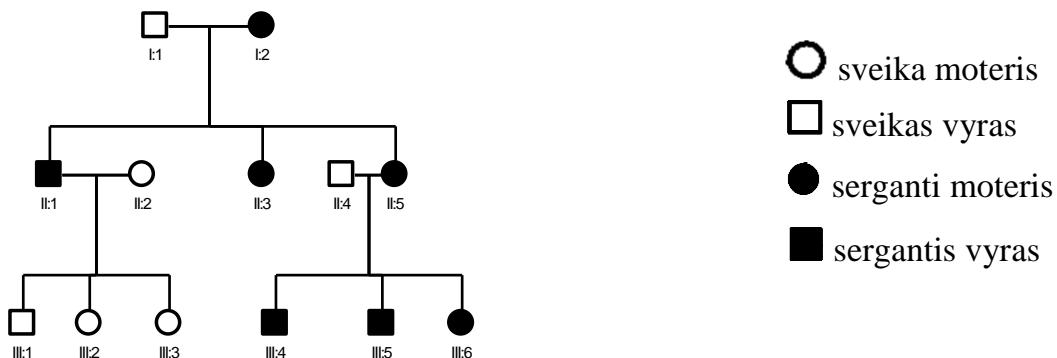
baltymų pernaša per mitochondrijų membraną bei mitochondrijų medžiagų apykaita [145].

Su Y chromosoma susijęs paveldėjimas

Mokslinėje literatūroje aprašyta viena šeima, kurioje klausos sutrikimo paveldėjimas susijęs su Y chromosoma. Atlikus išsamius tyrimus, tos šeimos vyrų Y chromosomoje nustatytas intersticinis *DFNA49* genetinės srities, kilusios iš pirmos chromosomos, intarpas. Šis kiekybinis *DFNA49* pokytis laikomas KS priežastimi tirtoje šeimoje [146].

Mitochondrinis paveldėjimas

- Lemia mitochondrijų DNR patogeniniai variantai;
- Patogeniniai variantai paveldimi tik iš motinos, paveldi visi vaikai (žr. 7 pav.);
- Platus klausos sutrikimų spektras – nuo minimalių požymių iki visiško kurtumo.



7 pav. Mitochondrinio paveldėjimo genealogijos pavyzdys

Mitochondrinio paveldėjimo nesindrominis klausos sutrikimas

Šio paveldėjimo klausos sutrikimas pasižymi didele fenotipo įvairove. Dauguma pacientų turi *MT-RNR1*, *MT-TS1* ir *MT-CO1* genų patogeninius

variantus. Aprašyta atvejų, kai sergančiam asmeniui nustatomi keli mtDNR patogeniniai variantai, siejami su sunkesne ligos forma.

Mitochondrinio paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas

MELAS sindromas (MIM 540000) – mitochondrinės kilmės encefalomiopatija, laktatinė acidozė ir į smegenų išemiją panašūs epizodai, pasireiškiantys generalizuotais toniniais-kloniniais traukuliais, laikina hemipareze ir žieviniu aklumu. Dažnai išsivysto neurosensorinis kurtumas. Liga dažniausiai prasideda vaikystėje, ankstyva psichomotorinė raida nesutrikusi, būdingas mažas ūgis, pasikartojantys galvos skausmų, vėmimo epizodai. Vėliau ryškėja smegenų pažeidimo požymiai – lėtėja raida, vystosi intelektinė negalia, aklumas. Daugiau kaip 85 proc. ligos atvejų nustatomos mtDNR leucino transportinės RNR geno (tRNR Leu) m.3243A>G ir m.3271T>C patogeniniai variantai, dėl kurių sutrinka baltymų biosintezė mitochondrijose [147].

Mokslinės genetinės duomenų bazės

Mokslinė ir klinikinė informacija, naudinga fundamentiniams ir diagnostiniams tyrimams bei pacientų, turinčių klausos sutrikimą, sveikatos priežiūrai, pateikiama daugelyje atvirosios prieigos duomenų bazių (1 priedas).

II.10. Paveldimo klausos sutrikimo genetinė diagnostika

Paveldimas klausos sutrikimas pasižymi didele klinicine įvairove. Liga gali būti tiek kondukcinio, tiek neurosensorinio pobūdžio. Pažeidimo sunkumas įvairaus laipsnio – nuo lengvo iki visiško kurtumo, būdinga progresuojanti eiga. Publikuoti moksliniai tyrimai, kuriuose atlikta genotipo ir fenotipo koreliacijos analizė įvairiose populiacijose. Nustatyta, kad ligos rodikliai (sunkumo laipsnis, ligos pradžios laikas, audioprofilis, simetrija) priklauso ne tik nuo pakitusio geno, patogeninio pokyčio ypatybių [148], bet ir galimų modifikuojančių genų, kurių gali būti ne vienas [149].

Genealogijos analizė labai naudinga sprendžiant dėl ištyrimo taktikos, tačiau ne visada leidžia nustatyti ligos paveldėjimo tipą. Esant dideliame nešiotojų dažniui populiacijoje, AR paveldėjimo atveju galimi pseudodominavimo požymiai (klausos sutrikimas nustatomas keliose kartose).

Didelis klinikinis genetinis paveldimo klausos sutrikimo heterogeniškumas sunkina ligos etiologinę diagnostiką. Analizuojant publikacijas klausos sutrikimo diagnostikos klausimu, matyti, kad ištyrimo strategijos keitėsi su naujomis žiniomis apie ligos priežastis ir technologinėmis tyrimo galimybėmis – nuo pavienių genų tyrimo iki genų grupių, arba egzomo, sekoskaitos. Klausos sutrikimo diagnostikos mastai pasaulyje iki šiol skiriasi priklausomai nuo ekonominių ir technologinių galimybių.

Publikacijose aptariamos geriausios ištyrimo strategijos, atsižvelgiant į konkrečios populiacijos medicininės, genetinės ir kt. aplinkybes. Diskutuojama apie genetinės konsultacijos ir tyrimo reikšmę bei optimalų paciento ištyrimo laiką. Anksčiau autosominio recesyvaus nesindrominio paveldėjimo atveju pirmiausia buvo atliekamas *GJB2* geno tyrimas. Pastaruoju metu matoma tendencija plėsti tiriamų genų, siejamų su klausos sutrikimu, spektrą, taikant naujausias genomo tyrimų technologijas. Pasaulyje sudaromi genų rinkiniai, kurie tiriami visiems pacientams, neatsižvelgiant į fenotipą ir genealogijos analizės rezultatus, dėl to išvengiama ilgo ir brangaus atskirų genų tyrimo ir padidinama tikimybė nustatyti ligos priežastį [150].

Atlikus plataus masto genetinius tyrimus susiduriama su sudėtinga nustatytų pokyčių interpretacija dėl nevienareikšmiškos patogeninių variantų įtakos ligos klinikinei išraiškai. Dalis genų siejami ir su autosominio dominantinio, ir su autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu (*TECTA*, *TMCI* ir kt. genai), dalis to paties geno patogeninių variantų lemia nesindrominį klausos sutrikimą, kita dalis – sindrominį sutrikimą (*SLC26A4* ir kt. genai). Sudėtingiausias patogeniškumo vertinimas, jei geno variantai siejami tiek su nesindrominiu AR

paveldėjimo, tiek su nesindrominiu AD paveldėjimo, tiek su sindrominiu AR paveldėjimo klausos sutrikimu (*GJB2*, *MYO7A*, *CDH23* ir kt. genai) [68].

Lietuvoje paveldimo klausos sutrikimo genetiniai tyrimai pradėti 2010 m. Pacientų tyrimas pradedamas nuo dažniausios įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo priežasties *GJB2* geno tyrimo. Nenustačius *GJB2* geno patogeninių variantų šeiminio arba sindrominio klausos sutrikimo atveju, genetiniai tyrimai tęsiami. 2017 m. pradėti 126 genų, siejamų su klausos sutrikimu, tyrimai, taikant pažangiausias technologijas (naujos kartos sekoskaitą). Pradedami ir viso egzomo sekoskaitos tyrimai pacientams, kuriems paveldima ligos priežastis neidentifikuota kitais tyrimais.

Iki šiol Lietuvoje neatliktas išsamus asmenų, turinčių įgimtą / paveldimą klausos sutrikimą, grupės apibūdinimas, neaprašyta ligos etiologinė struktūra, neturime parengtų gairių, optimalaus diagnostinio algoritmo.

II.11. Klausos sutrikimo gydymo perspektyvos

Dauguma klausos sutrikimų vystosi dėl plaukuotųjų ląstelių pažeidimo. Kadangi žinduolių plaukuotosios ląstelės nesugeba regeneruoti, klausos sutrikimas yra negrįžtamas [151]. Šiuo metu klausos sutrikimo atveju taikomas tik reabilitacinis gydymas klausos aparatais arba kochleariniais implantais, tačiau mokslininkai atlieka tyrimus, ieškodami plaukuotųjų ląstelių regeneracijos arba transplantacijos galimybių.

Plaukuotųjų ląstelių regeneracija. Dėl fenotipinio ir genetinio panašumo didžioji tyrimų dalis atliekama su pelių modeliniais organizmais. Viltis regeneruoti plaukuotąsias ląsteles kyla žinant, kad paukščių ir žuvų ląstelės atsinaujina po pažeidimo, sukkelto triukšmo arba ototoksinų. Iš dalies šią savybę turi net subrendusių žinduolių pusiausvyros sistemos ląstelės. Tinkamas indukuojančių veiksnių rinkinys galėtų sukelti žinduolių sraigės kamieninių ląstelių regeneraciją. Tyrimais nustatyta, kad plaukuotųjų ląstelių diferenciaciją indukuoja vienas pagrindinis transkripcijos veiksnys – ATOH1. Šį baltymą koduojančio geno

poveikio pakanka, kad prasidėtų plaukuotųjų ląstelių formavimasis. Pagalbinių vidinės ausies ląstelių virtimas plaukuotosiomis gali atkurti klausos ir pusiausvyros organus [152]. Vis dėlto šiuo metu dar nepakanka įrodymų, kad ATOH1 reikšmingai padidintų plaukuotųjų ląstelių kiekį subrendusių gyvūnų vidinėje ausyje. Priešingai, dėl užsitęsusių ATOH1 raiškos prasideda ląstelių apoptozė. Šie duomenys rodo, kad ATOH1 dalyvauja viename iš keleto signalinių kelių ir jo funkcija būtina tam tikru vystymosi laikotarpiu.

Tiriamos ir galimybės paveikti signalinius kelius, su kuriais susijusi ATOH1 aktyvacija (β katenino veikiama *WNT* signalinio kelio aktyvacija, *Notch* ir *Delta* šeimos genų aktyvacija ir ląstelių diferenciacijos stabdymas, pagalbinių ląstelių ciklo stabdymas) [153, 154]. Priešingas būdas padidinti ląstelių regeneraciją – išjungti ją slopinančius mechanizmus ląstelėje, kurių gali būti ne tik molekuliniai, bet ir fizinių (pamatinė ir dengiamoji membranos) [155].

Kamieninių ląstelių transplantacija. Daugiagalių kamieninių ląstelių yra visuose žmogaus organuose, tačiau dėl sudėtingos invazinės procedūros mažai tikėtina, kad kamieninių ląstelių paėmimas iš vidinės ausies kada nors bus taikomas kasdienėje praktikoje. Šiuo požiūriu kitokia situacija su embrioninėmis ir indukuotomis daugiagalėmis kamieninėmis ląstelėmis, kurios buvo perprogramuotos į ląsteles, panašias į plaukuotąsias ir turinčias svarbiausias jų savybes (įskaitant mechaninio signalo perdavimą). Tačiau ir šie darbai nedavė puikių rezultatų – po transplantacijos į vidinę ausį didžioji dalis perkeltų ląstelių netrukus žuvo [156]. Sėkmingiau pavyko perkelti iš indukuotų daugiagalių ląstelių perprogramuotas neuronų ląsteles, kurios ne tik pateko į spiralinį nervinį mazgą, bet ir iš dalies atliko savo funkciją [157]. Ląstelių transplantacijos būdai teikia vilties, tačiau nė vienas būdas dar nėra pasiekęs klinikinių bandymų stadijos.

Genų terapija. Tyrimai vyksta ir siekiant atkurti neveiklaus geno funkciją arba susilpninti padidėjusio aktyvumo geno veiklą.

Tyrimų metu susiduriama su problema – geno perkėlimu į vidinės ausies ląsteles. Numanydami, kad perkeliama geno raiška visame organizme gali turėti

šalutinį poveikį, mokslininkai kuria virusinius (adenovirusinius (AV), su adenovirusu susijusių virusų (AAV) ir kt.) vektorius, kuriais genas patektų tik į vidinės ausies ląsteles [158]. Analizuojamas įvairių vektoriaus patekimo į ląsteles būdų efektyvumas, tinkamiausiais laikoma injekcija į vidinę ausį per apvalųjį sraigės langelį [159] ir kochleostomija [160].

Neseniai publikuotame tyrime mokslininkai, naudodami AAV vektorių, perkėlė Cx26 (*Gjb2*) geną į pelių, kurioms prieš šias manipuliacijas Cx26 genas buvo išveiklintas, vidinę ausį. Nustatyta, kad geno raiška vidinės ausies ląstelėse vyko, plyšinių jungčių tinklas atsinaujino, plaukuotųjų ląstelių ir spiralinio mazgo neuronų degeneracija sumažėjo, bet reikšmingo klausos sukeltų smegenų kamieno potencialų atsako (ABR, angl. *auditory brainstem response*) nebuvo užfiksuota [161]. Geresni rezultatai gauti perkėlus vektorių su baltymo VGLUT3 genu *SLC17A8*, kurio patogeniniai variantai lemia DFNA25. Transgeniniam pelės modeliui, turinčiam VGLUT3 stoką, buvo nustatytas įgimtas kurtumas dėl sutrikusios glutamato molekulių pernašos į sinapsinį plyšį. Po genų terapijos gyvūnų ABR tyrimo slenksčiai buvo normalūs [162]. Sėkmingų rezultatų sulaukta ir perkeltant *TMCI* geną [159]. Taikant vektorius su priešprasmiais (angl. *antisense*) oligonukleotidais *Usher 1C* sindromo pelės modeliui, pavyko atkurti klausos ir pusiausvyros funkciją [163].

Genų terapijos technologijos gali būti naudingos ir nepaveldimo klausos sutrikimo atveju. Žiurkėms, turinčioms klausos sutrikimą dėl spiralinio mazgo neuronų degeneracijos, buvo taikyta terapija AV vektoriais, turinčiais neurotropinius veiksnius (žmogaus B nervų augimo veiksnius), skatinančius klausos nervinių skaidulų ataugimą. Terapinės grupės gyvūnams nustatyti ABR slenksčiai buvo gerokai mažesni, nei kontrolinėje grupėje.

Farmakologinės medžiagos. Atliekami intensyvūs tyrimai (cheminė patikra), siekiant identifikuoti medžiagas, (1) aktyvuojančias plaukuotųjų ląstelių regeneraciją po ototoksinų poveikio, (2) apsaugančias plaukuotąsias ląsteles nuo neigiamo aminoglikozidų, chemoterapinių vaistų poveikio (otoprotekcines) [164],

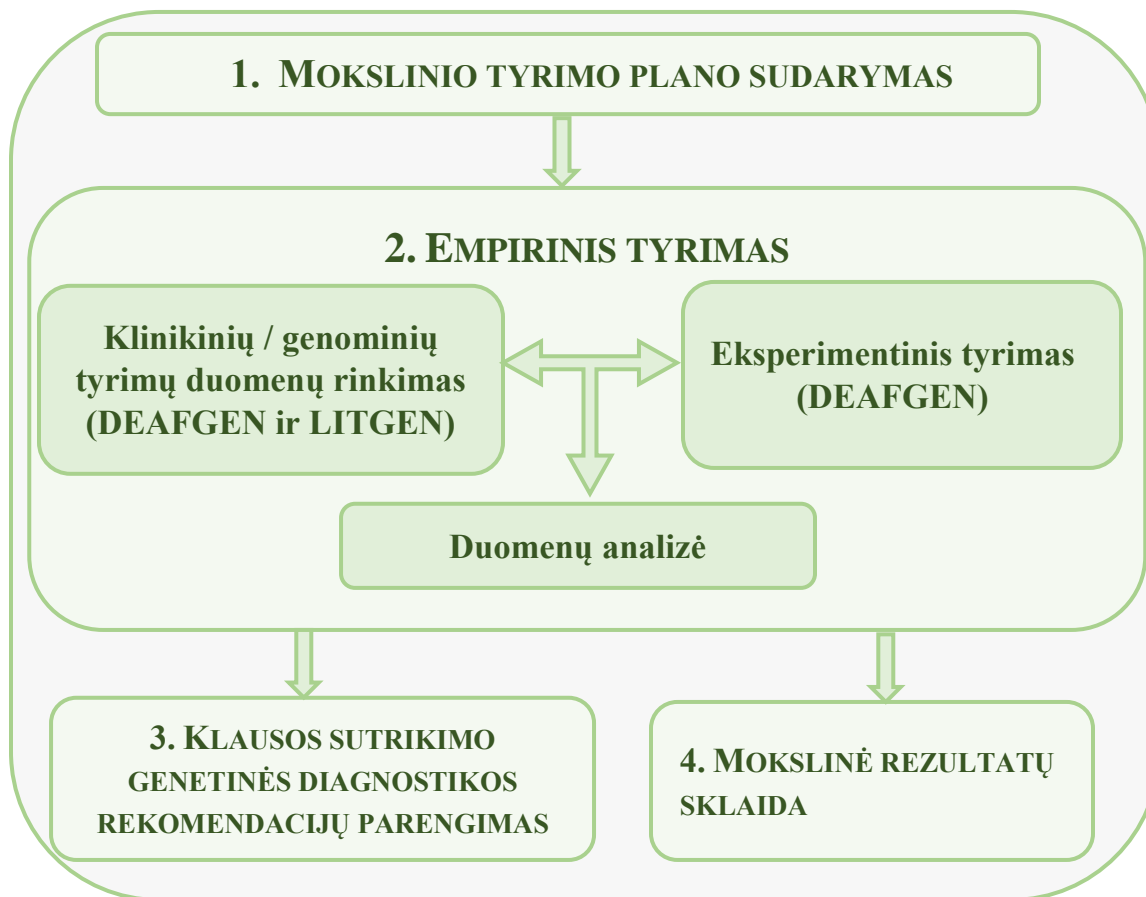
(3) turinčias ototoksinį poveikį. Zebražuvių lervų modeliai, nors ir neturi Kortijaus organo, labai tinkami šiuo tikslu, nes jų plaukuotosios ląstelės yra kūno paviršiuje (šoninėje linijoje), šiuos organizmus lengva dauginti, mažas jų dydis. Atliekant tyrimus nustatyti keli medikamentai, aktyvuojantys regeneraciją (steroidiniai hormonai deksametazonas, prednizolonas) ir ją inaktyvuojantys (fenoprofenas, flubendazolis) [165], otoprotekcinės medžiagos.

II.12. Klausos sutrikimo genomikos reikšmė

Klausos sutrikimo molekulinį mechanizmų žinojimas naudingas ne tik moksliniu, bet ir klinikiu požiūriu: leidžia (1) taikyti ligos profilaktikos priemones (pvz.: vengti aminoglikozidų asmenims, nustačius *MT-RNR1* geno patogeninius variantus), (2) identifikuoti medikamentus, mažinančius ototoksinį vaistų poveikį, skatinančius plaukuotųjų ląstelių regeneraciją, ir priešingai – turinčius ototoksinį poveikį, kurių reikėtų vengti arba vartoti kartu su otoprotektoriais, (3) kurti medikamentus klausos sutrikimui gydyti genų terapijos, ląstelių regeneracijos pagrindu. Žinant ligos priežastį, galima anksti diagnozuoti ligą šeiminiiais atvejais, stebėti ir gydyti kitų organų sistemų patologiją, prognozuoti natūralią ligos eigą ir klausos aparatų bei kochlearinės implantacijos efektyvumą [166].

III. METODAI

Siekiant įgyvendinti mokslinio darbo užduotis, tyrimai buvo atliekami etapais (žr. schemą 8 pav.). Autorės atliktų darbų indėlis pateikiamas 2 priede.



8 pav. Mokslinio darbo etapai

III.1. Mokslinio tyrimo plano sudarymas

Disertacinio darbo tyrimas buvo numatytas atlikti naudojant dviejų mokslinių tyrimų (DEAFGEN ir LITGEN) duomenis. Išsamiam paveldimo / įgimto klausos sutrikimo genetiniam ištyrimui Lietuvos populiacijoje buvo analizuoti tiek sergančių asmenų (DEAFGEN biomedicininis tyrimas) grupės, tiek sveikų populiacijos asmenų grupės (LITGEN populiacinis tyrimas) duomenys.

DEAFGEN (2014–2024 m.) biomedicininiam tyrimui atlikti 2014 m. birželio 10 d. gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto

leidimas Nr. 158200-14-739-255 (žr. 3 priedą), 2015 m. sausio 28 d. gautas Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimas atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus Nr. 2R-497(2.6-1) (žr. 4 priedą).

LITGEN (2011–2013 m.) biomedicininiam tyrimui atlikti 2011 m. gegužės 3 d. buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-05-329-79.

Tyrimą sudarė keli etapai:

III.1.1. Tiriamųjų asmenų atrankos kriterijų pasirinkimas

DEAFGEN tiriamųjų grupė. Tiriamųjų grupę buvo numatyta rinkti kviečiant VšĮ VUL Santaros klinikų Medicininės genetikos centro ir Ausų, nosies gerklės ligų centro pacientus, atitinkančius DEAFGEN atrankos kriterijus. Siekiant surinkti homogenišką (turinčią didelę paveldimo klausos sutrikimo tikimybę) tiriamųjų grupę, pasirinkti šie tiriamųjų asmenų atrankos kriterijai:

- įgimtas / ankstyvas (išsivystęs iki 5 metų) nesindrominis klausos sutrikimas;
- sindrominis klausos sutrikimas, diagnozuotas bet kuriame amžiuje;
- nesindrominis klausos sutrikimas, diagnozuotas bet kuriame amžiuje (išskyrus senatvinį prikurtimą), esant teigiamai šeimos anamnezei.

Į Lietuvos populiacijos tiriamųjų, turinčių klausos sutrikimą, grupę įtraukta 315 tiriamųjų (289 negiminingi asmenys), iš jų 180 vyriškosios lyties ir 135 moteriškosios. Izoliuotą klausos sutrikimą turinčių asmenų pogrupį sudarė 241 asmuo, į sindrominio klausos sutrikimo pogrupį įtraukti 74 tiriamieji.

LITGEN tiriamųjų grupė. Etninę sveikų lietuvių populiacijos asmenų grupę buvo surinkta LITGEN (2011–2013 m.) projektui, ją sudarė 98 negiminingi sveiki asmenys (49 moterys ir 49 vyrai). LITGEN atrankos kriterijai:

- sveiki asmenys;
- trijų kartų genealogijoje visi asmenys lietuvių tautybės;
- gyvenantys toje pačioje Lietuvos etnolingvistinėje teritorijoje (Vakarų, Šiaurės, Pietų Žemaitija ir Vakarų, Rytų, Pietų Aukštaitija).

III.1.2. Tiriamųjų asmenų duomenų rinkimas

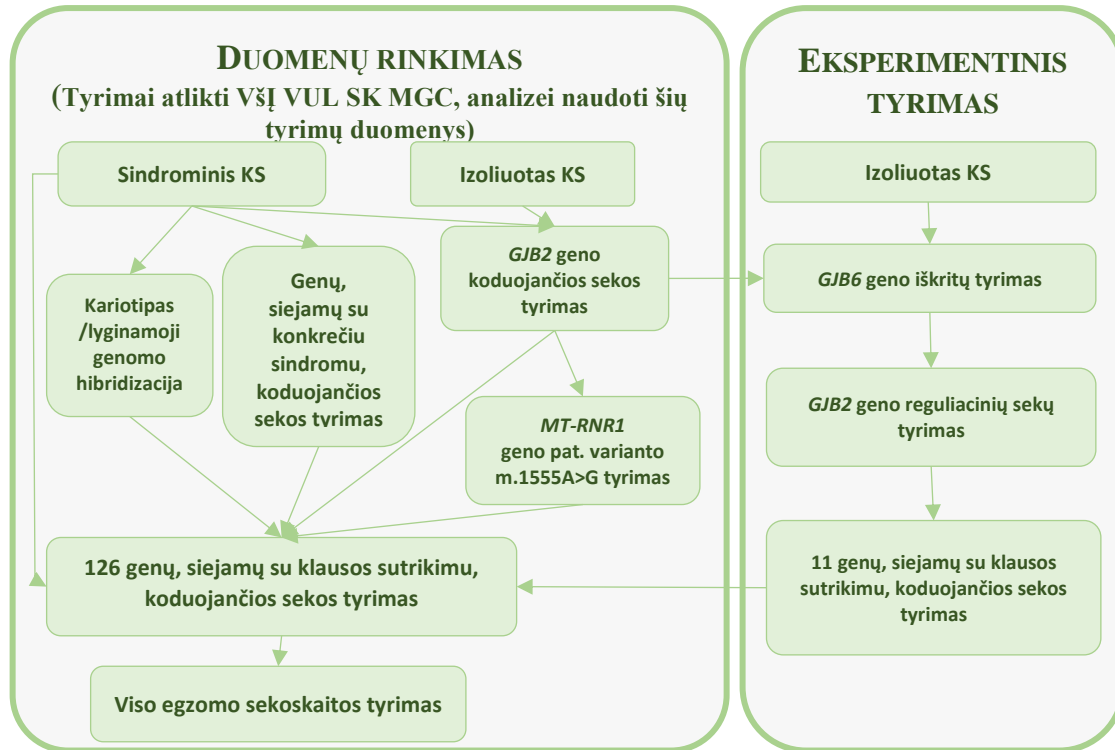
DEAFGEN tiriamųjų grupė. Mokslinei duomenų analizei atlikti buvo numatyta surinkti šiuos tiriamųjų asmenų duomenis:

- anamnezės, klausos ištyrimo (otoakustinės emisijos (OAE) tyrimas, klausos sukeltų smegenų kamieno potencialų (ABR) ir stabilios būsenos potencialų (ASSR) tyrimai, audiograma), fenotipo, genealogijos, sindromologinės analizės (POSSUM);
- instrumentinių tyrimų (smilkinkaulių KT, EKG, akių dugno tyrimas, skydliaukės funkcijos tyrimas, inkstų echoskopijos ir funkcijos tyrimas, kt.);
- genetinių tyrimų, atliktų diagnostinio proceso ir eksperimentinio tyrimo metu.

LITGEN tiriamųjų grupė. Moksliniam tyrimui buvo numatyta viso egzomo sekoskaitos duomenų analizė.

III.1.3. Tiriamųjų genetinio tyrimo plano sudarymas

DEAFGEN tiriamųjų grupė. Mokslinio tyrimo pradžioje buvo sudaryta genetinio tyrimo schema DEAFGEN biomedicininio tyrimo tiriamųjų grupei iširti. Siekiant atlikti išsamią analizę asmenų, turinčių klausos sutrikimą, numatyta eksperimentinius tyrimus derinti su diagnostiniais, atliekamais VŠĮ VUL Santaros klinikų Medicininės genetikos centre. Diagnostinio proceso metu gauti genetinių tyrimų rezultatai buvo naudoti analizei, taip pat buvo reikalingi pacientų atrankai moksliniam eksperimentiniam tyrimui. Remiantis eksperimentinio tyrimo rezultatais tiriamieji buvo atrenkami tolesniems diagnostiniams naujos kartos sekoskaitos tyrimams (9 pav.).



9 pav. Įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo genetinio tyrimo schema

Tiriamųjų, turinčių klausos sutrikimą, ištyrimas priklauso nuo klausos sutrikimo tipo. Sindrominį klausos sutrikimą (KS kartu su kitų organų struktūros ir (ar) funkcijos sutrikimu) turintiems asmenims, įtariant monogeninę ligą, tiriami genai (pavieniai arba genų rinkinyje), siejami su konkrečiu sindromu. *GJB2* geno koduojančios sekos tyrimas gali būti atliekamas ir sindrominio KS pogrupio asmenims, diferencijuojant klausos sutrikimo priežastį. Įtariant chromosominės kilmės sindromą, atliekami kariotipo arba lyginamosios genomo hibridizacijos tyrimai. Išliekant nežinomai ligos diagnozei, atliekamas viso egzomo sekoskaitos tyrimas.

GJB2 geno koduojančios sekos tyrimas atliekamas visiems izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamiesiems asmenims. Nenustačius dviejų patogeninių variantų, esant mitochondrinio paveldėjimo požymių genealogijoje (šeimoje motinos giminėje buvo sergančių asmenų), atliekamas *MT-RNR1* (NR_137294.1) geno patogeninio varianto m.1555A>G tyrimas.

Tiriamiesiems, kuriems klausos sutrikimo priežastis nebuvo identifikuota, buvo atliekami moksliniai eksperimentiniai tyrimai: (1) *GJB6* geno iškritų tyrimai, (2) *GJB2* geno reguliacinių sekų tyrimai ir (3) vienuolikos genų, siejamų su autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu (sąrašas 5 priede), koduojančių egzonų tyrimas naujos kartos sekoskaitos metodu.

Neidentifikavus molekulinį pakitimų eksperimentiniais tyrimais, atliekama 126-ių genų (sąrašas 6 priede) naujos kartos sekoskaita ir viso egzomo sekoskaita izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamiesiems, turintiems teigiamą šeimos genealogiją.

III.1.4. Duomenų analizės plano ruošimas

III.1.4.1. **DEAFGEN** tiriamųjų grupėje numatyta:

- a) išanalizuoti patogeninių variantų dažnį ir sudaryti paveldimo klausos sutrikimo etiologinę struktūrą tirtuose Lietuvos populiacijos sergančių izoliuotu ir sindrominiu KS asmenų pogrupiuose;
- b) atlikti šių klausos sutrikimo charakteristikų koreliacijos su genotipu tyrimą:
 - sunkumo laipsnis;
 - simetrija;
 - genealogijos duomenys.

III.1.4.2. **LITGEN** tiriamųjų grupėje numatyta:

- a) atlikti genų, siejamų su autosominio recesyvaus ir X recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu, variantų analizę;
- b) nustatyti patogeninių / galimai patogeninių variantų dažnį sveikų asmenų grupėje;
- c) apskaičiuoti AR ir XR paveldėjimo KS dažnį lietuvių populiacijoje.

III.1.5. Genetinės klausos sutrikimo diagnostikos rekomendacijų rengimas

Remiantis atlikto tyrimo rezultatais ir moksline literatūra, numatyta parengti genetinio ištyrimo algoritmo rekomendacijas Lietuvai.

III.1.6. Mokslinė rezultatų sklaida

Mokslinio tyrimo rezultatus numatyta skelbti šiais būdais:

- mokslinėse publikacijose periodiniuose mokslo leidiniuose, referuojamuose *Clarivate Analytics* duomenų bazėje;
- mokslinėse publikacijose periodiniuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse;
- mokslinėse publikacijose kituose recenzuojamuose leidiniuose;
- žodiniuose ir stendiniuose pranešimuose nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

III.2. Empirinis tyrimas

III.2.1. DEAFGEN biomedicininio tyrimo grupės klinikinių duomenų rinkimas

Biomedicininiame tyime buvo kviečiami asmenys, 2010–2017 m. konsultuoti VŠĮ VUL SK Medicininės genetikos centre ir (ar) VŠĮ VUL SKF VL Ausų, nosies ir gerklės ligų skyriuje ir Vaikų klausos tyrimų poskyryje, bei jų šeimos nariai, atitinkantys įtraukimo į biomedicininį tyrimą DEAFGEN kriterijus. Asmeniui, sutikusiam dalyvauti biomedicininiame tyime DEAFGEN arba jo tėvams ar globėjams (jei pacientas nepilnametis), pasirašius Informuoto asmens sutikimo formą, DNR mėginiai, demografiniai, epidemiologiniai, klinikiniai, radiologiniai ir genealogijos duomenys buvo renkami, koduojami, kaupiami duomenų bazėje.

DEAFGEN tiriamųjų asmenų grupėje klinikiniai duomenys rinkti, analizuojant medicininius pacientų dokumentus (VŠĮ VUL Santaros klinikų ligos istorijas, ambulatorinės sveikatos priežiūros korteles, elektroninę ligos istoriją (Eli), kitų gydymo įstaigų specialistų išrašus).

Klausos sutrikimo rodiklių vertinimas tiriamųjų grupėje atliktas taikant amžiui specifinius ištyrimo metodus. Toninė ribinė audiograma, esant galimybei, buvo atlikta garsą izoliuojančioje kabinoje (remiantis ISO standartais). Nustatytos slenkstinės vertės (dB) 0,5, 1,2 ir 4 kHz dažnių garsui. Jei toninė ribinė audiograma

neatlikta, klausos sutrikimo sunkumo laipsniui įvertinti buvo naudotas ABR ir (ar) ASSR tyrimo V bangos slenkstinis dydis. Klausos sutrikimo sunkumas ir tipas buvo vertinami pagal vėliausiai atlikto tyrimo rezultatus.

Klausos pažeidimo laipsnis nustatytas remiantis toninės ribinės audiogramos arba ABR / ASSR tyrimo rezultatais geriau girdinčioje ausyje: lengvas (25–40 dB), vidutinis (41–70 dB), sunkus (71–90 dB) ir gilus (>90 dB). Asimetrija nustatyta, jei skirtumas tarp abiejų ausų rezultatų lygus arba didesnis nei 15 dB.

Sindrominio (kitų organų struktūros ir (ar) funkcijos sutrikimas) ir nesindrominio (izoliuoto) klausos sutrikimo tipai nustatyti remiantis fenotipo analizės ir instrumentinių tyrimų duomenimis.

Sergančių asmenų grupės pogrūpiai pagal genealogiją skiriami atsižvelgiant į genealogijos analizės rezultatus: (1) teigiama genealogija, jei šeimoje yra daugiau sergančių asmenų; (2) neigiama, jei tiriamasis asmuo yra vienintelis, turintis klausos sutrikimą.

III.2.2. Genetiniai tyrimai DEAFGEN tiriamųjų asmenų grupėje

DEAFGEN tiriamųjų grupės genetinių tyrimų duomenys gauti iš diagnostinio ištyrimo VŠĮ VUL SK MGC metu atliktų tyrimų bei eksperimentinių tyrimų, atliktų VU Medicinos fakulteto Biomedicinos tyrimų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje.

III.2.2.1. **Diagnostinio ištyrimo metu** atlikti genetiniai tyrimai:

a) *GJB2* (NM_004004.5) geno koduojančių sekų tyrimas

Tyrimas atliktas visiems DEAFGEN tiriamosios grupės asmenims, turintiems nesindrominį klausos sutrikimą, pagal VŠĮ VUL SK MGC patvirtintą tyrimo procedūrą.

Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

Koduojančios *GJB2* geno sekos ir iRNR sukirpimui svarbios srities (apimančios patogeninį variantą c.-23+1G>A (rs80338940)) pagausinimas atliktas PGR būdu, naudojant specifinius oligonukleotidinius pradmenis, sukurtus *Primer*

Blast (NCBI) įrankiu [167]. Abiejų krypčių sekoskaita atlikta naudojant rinkinį *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, JAV). Kapiliarinė elektroforezė atlikta genetiniu analizatoriumi *ABI 3130xL Genetic Analyser* (Applied Biosystems, JAV). Fluorescencijos signalai analizuoti *Sequence Analysis v5.1* programa (Applied Biosystems, JAV). Nusekvenuotos sekos lygintos su referentine *GJB2* geno seka (NCBI NM_004004.5). Sekos variantai analizuoti duomenų bazėse *The Human Gene Mutation Database* [168] ir *Connexin Deafness Homepage* [169]. Segregacijos analizė atlikta sekvenuojant *GJB2* geną sergančių tiriamųjų tėvams.

b) Mitochondrinės DNR *MT-RNR1* (NR_137294.1) geno patogeninio varianto m.1555A>G tyrimas

Tyrimas pagal VšĮ VUL SK MGC patvirtintą tyrimo procedūrą atliktas DEAFGEN tiriamosios grupės nesindrominį klausos sutrikimą turintiems asmenims, kurių genealogijoje buvo mitochondrinio paveldėjimo požymių.

Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą. *MT-RNR1* geno koduojančios sekos, apimančios tiriamo patogeninio varianto vietą, gausinimas PGR metodu atliktas naudojant specifinius oligonukleotidinius pradmenis, sukurtus *Primer Blast* (NCBI) įrankiu [167]. PGR produkto restrikcija vykdyta naudojant *FastDigest® Alw26I restrikcijos endonukleazę* (ThermoFisher, JAV), atpažįstančią nepakitusią mtDNR seką galimo varianto vietoje. Kapiliarinė elektroforezė atlikta genetiniu analizatoriumi *ABI 3130xL Genetic Analyser* (Applied Biosystems, JAV). Fluorescencijos signalai analizuoti *GeneMapper v2.1* programa (Applied Biosystems, JAV). Rezultatai vertinti pagal nustatytus fragmentų ilgius: 1 fragmentas 324 bp ilgio – patologija (homoplazmija), 2 fragmentai 136 bp ir 188 bp – norma (homoplazmija), 3 fragmentai 136 bp, 188 bp ir 324 bp – patologija (heteroplazmija).

c) Pavienių genų, siejamų su klausos sutrikimu, koduojančių sekų tyrimas

Tyrimas atliktas pagal VŠĮ VUL SK MGC patvirtintą tyrimo procedūrą DEAFGEN tiriamosios grupės sindrominį klausos sutrikimą turintiems asmenims, kuriems buvo įtariamas konkretus monogeninės kilmės sindromas. Tirti genai *TCOF1* (NM_001135243.1), *SLC19A2* (NM_006996.2), *SCARF2* (NM_153334.6), *MPLKIP* (NM_138701.3), *GJAI* (NM_000165.4).

Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

Koduojančios geno sekos polimerazės grandininė reakcija atlikta naudojant specifinius oligonukleotidinius pradmenis, sukurtus *Primer Blast* (NCBI) įrankiu [167]. Abiejų kryptių sekoskaita atlikta naudojant rinkinį *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, JAV). Kapiliarinė elektroforezė atlikta genetiniu analizatoriumi *ABI 3130xL Genetic Analyser* (Applied Biosystems, JAV). Fluorescencijos signalai analizuoti *Sequence Analysis v5.1* programa (Applied Biosystems, JAV). Nusekvenuotos sekos lygintos su referentinėmis genų sekomis. Nustatyti variantai analizuoti duomenų bazėse *Human Gene Mutation Database* [168] ir *DVD* [170], mokslinėse publikacijose, taip pat naudojant bioinformacinius įrankius *SIFT* [171], *PolyPhen2* [172], *Mutation taster2* [173].

d) VNP lyginamosios genomo hibridizacijos tyrimas

Tyrimas atliktas DEAFGEN tiriamosios grupės asmenims, turintiems sindrominį klausos sutrikimą pagal VŠĮ VUL SK MGC patvirtintą tyrimo procedūrą. Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

VNP genotipavimas atliktas *HumanCytoSNP-12 BeadChip v2.1* VNP lustu (Illumina, Inc., JAV), VNP-LGH *Illumina Infinium® HD* metodu. Struktūrinių genomo variantų analizė atlikta *GenomeStudio™ Genotyping Module v1.9* ir *QuantiSNP v2.1* programine įranga (Illumina, Inc., JAV). Struktūrinių genomo variantų patogeniškumas vertintas naudojant *GenomeStudio™ Genotyping Module*

v1.9 modulio genomo naršyklę ir duomenų bazę *Database of Genomic Variants*, DGV [174].

e) 126 genų, siejamų su klausos sutrikimu, grupės tyrimas

Tyrimas atliktas DEAFGEN tiriamosios grupės asmenims, turintiems sindrominį klausos sutrikimą arba nesindrominį klausos sutrikimą ir teigiamą genealogiją (jei nenustatyti *GJB2* geno homozigotiniai arba sudėtiniai heterozigotiniai patogeniniai variantai) pagal VšĮ VUL SK MGC patvirtintą tyrimo procedūrą. Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

DNR bibliotekos paruoštos rinkiniu *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* (Life Technologies, JAV), naudojant pradmenų mišinį *Ion AmpliSeq™ Deafness research panel v2* (Life Technologies, JAV) (genų ir patologijų sąrašas 5 priede). DNR bibliotekų koncentracija matuota TL-PGR sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, JAV), naudojant rinkinį *Ion Library Quantification Kit* (Applied Biosystems, JAV). Emulsinė PGR ir magnetinių dalelių praturtinimas atliktas *Ion OneTouch™* sistema (Life Technologies, JAV), naudojant rinkinį *Ion PGM™ Hi-Q™ View™ OT2* (Life Technologies, JAV). Sekoskaita atlikta genetiniu analizatoriumi *Ion PGM™ Sequencer* (Life Technologies, JAV), naudojant rinkinį *Ion PGM™ Hi-Q View™ Sequencing Kit* (Life Technologies, JAV). Bioinformacinė duomenų analizė atlikta gamintojo serveryje *Ion Torrent™ Server*, naudojant programinę įrangą *Ion PGM™ Torrent Suite™ Software*. Nustatytų variantų anotacija atlikta *ANNOVAR v.2015mar22* [175] programa. Analizuoti variantai, kurių retojo alelio dažnis sveikų žmonių populiacijose ≤ 2 proc. Variantų patogeniškumas vertintas remiantis ACMG kriterijais [176], atsižvelgiant į informaciją ANNOVAR programa sukurtame dokumente, duomenų bazėse (*ExAC Browser* [177], *Exome Variant Server* [178], *1000 Genome Project* [179], *NCBI dbSNP* [180], *NCBI dbVar* [181], *HGMD* [182], *NCBI OMIM* [183], *NCBI ClinVAR* [184], *LOVD* [185], *NCBI Genome* [186], *DVD* [170]) bei mokslinėje literatūroje.

Patogeniniai / galimai patogeniniai sekos variantai buvo patikrinti analizuojant BAM dokumentus vaizdinimo įrankiu *Integrative Genomics Viewer* (IGV) [187].

f) Viso egzomo sekoskaitos tyrimas

Tyrimas atliktas pagal reagentų ir instrumentų gamintojo (*Illumina, Inc.*, JAV) protokolus. Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

DNR bibliotekos viso žmogaus egzomo sekoskaitai paruoštos naudojant rinkinį *TruSeq Rapid Exome Library Prep kit (8x3plex)* (*Illumina, Inc.*, JAV). DNR bibliotekų koncentracija matuota *Qubit* fluorimetru (*ThermoFisher Scientific*, JAV), naudojant rinkinį *Qubit dsDNA BR Assay kit* (*ThermoFisher Scientific*, JAV). Klasterių amplifikacija atlikta *cBot* instrumentu (*Illumina, Inc.*, JAV), naudojant rinkinius *TruSeq PE Cluster Kit v3-HS* (*Illumina, Inc.*, JAV) ir *TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, Paired End* (*Illumina, Inc.*, JAV). Sekoskaita atlikta genetiniu analizatoriumi *HiScanSQ* (*Illumina, Inc.*, JAV), naudojant rinkinį *TruSeq SBS Kit v3-HS* (*Illumina, Inc.*, JAV). Atliekant bioinformacinę duomenų analizę, duomenys sulygiuoti pagal žmogaus genomo referentinę seką, pateikiamą *UCSC hg19* duomenų bazėje. DNR fragmentų sulygiavimas pagal žmogaus genomo referentinę seką atliktas *BWA (Burrows-Wheeler Aligner)* [188] programa. Naujos kartos sekoskaitos analizės algoritmui – naudotas įrankis *GATK (Genome Analysis Toolkit)* [189]. Nustatytų variantų anotacija atlikta *ANNOVAR v.2015mar22* [175] programa. Analizuoti variantai, kurių retojo alelio dažnis sveikų žmonių populiacijose ≤ 2 proc. Variantų patogeniškumas vertintas, remiantis *ACMG* kriterijais [176], atsižvelgiant į informaciją *ANNOVAR* programa sukurtame dokumente, duomenų bazėse (*ExAC Browser* [177], *Exome Variant Server* [178], *1000 Genome Project* [179], *NCBI dbSNP* [180], *NCBI dbVar* [181], *HGMD* [182], *NCBI OMIM* [183], *NCBI ClinVAR* [184], *LOVD* [185], *NCBI Genome* [186], *DVD* [170]) bei mokslinėje literatūroje. Patogeniniai / galimai patogeniniai sekos variantai buvo patikrinti analizuojant BAM dokumentus vaizdinimo įrankiu *Integrative Genomics Viewer* (IGV) [187].

III.2.2.2. Eksperimentinio tyrimo metu atlikti genetiniai tyrimai:

a) *GJB6* (NM_001110219.2) geno iškritų tyrimas

Tyrimas atliktas DEAFGEN tiriamosios grupės nesindrominį klausos sutrikimą turintiems asmenims, kuriems nenustatyti *GJB2* geno homozigotiniai arba sudėtiniai heterozigotiniai patogeniniai variantai. Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinę fenolio chloroformo metodą.

Sudėtinė PGR *GJB6* geno iškritų del(GJB6-D13S1830) ir del(GJB6-D13S1854) tyrimui atlikta mokslinėje literatūroje aprašyto metodo principu [190].

b) *GJB2* (NM_004004.5) geno reguliacinių sekų sekoskaita

Tyrimas atliktas DEAFGEN tiriamosios grupės nesindrominį klausos sutrikimą turintiems asmenims, kuriems nenustatyti *GJB2* geno homozigotiniai arba sudėtiniai heterozigotiniai patogeniniai variantai. Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinę fenolio chloroformo metodą.

5' reguliacinės sekos ir 3' netransliuojamos *GJB2* (NM_004004.5) geno sekos polimerazės grandininė reakcija atlikta naudojant specifinius oligonukleotidinius pradmenis, sukurtus *Primer Blast* (NCBI) įrankiu [167] (žr. 7 priedą). Abiejų kryptų sekoskaita atlikta naudojant rinkinį *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, JAV). Kapiliarinė elektroforezė atlikta genetiniu analizatoriumi *ABI 3130xL Genetic Analyser* (Applied Biosystems, JAV). Fluorescencijos signalai analizuoti *Sequence Analysis v5.1* programa (Applied Biosystems, JAV). Nusekvenuotos sekos lygintos su referentinėmis *GJB2* (NM_004004.5) geno reguliacinėmis sekomis. 5' ir 3' reguliacinių sekų variantai analizuoti bioinformaciniais įrankiais *MatInspector* [191], *TargetScan* [192] ir *Mfold* [193].

- c) 11 genų, siejamų su autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu, sekoskaita

Tyrimas atliktas DEAFGEN nesindrominio klausos sutrikimo pogrupio asmenims, kuriems nenustatyti *GJB2* geno homozigotiniai arba sudėtiniai heterozigotiniai patogeniniai variantai. Tyrimai buvo vykdyti bendradarbiaujant su *UAB ThermoFisher Baltics* Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centro mokslininkais.

Tirta genomine DNR, išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų, taikant standartinį fenolio chloroformo metodą.

Taikininių genų (sąrašas 5 priede) DNR bibliotekos paruoštos pagal adaptuotą, mokslinėje literatūroje nepublikuotą protokolą (*UAB ThermoFisher Baltics*, Lietuva):

1. Sukurtos 126-ios poros specifinių oligonukleotidinių pradmenų sudėtinai PGR (žr. 8 priedą), naudojant *Primer Blast (NCBI)* įrankį [167]. Amplikonų fragmentų ilgiai svyravo nuo 296 bp iki 4673 bp;
2. Vykdyta sudėtinė PGR (2x63 pradmenų poros), naudojant rinkinį *Thermo Scientific Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
3. Atlikta PGR produktų elektroforezė agarozės gelyje;
4. PGR produktai išvalyti mikrokolonėlėmis *Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
5. Atlikta išvalytų PGR produktų elektroforezė *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, JAV)*, rinkiniu *High Sensitivity DNA Analysis Kit*, duomenų analizė atlikta *Expert 2100* programine įranga (*Agilent Technologies, JAV*);
6. Amplikonai fragmentuoti rinkiniu *Thermo Scientific MuSeek Library Preparation Kit, Illumina compatible (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;

7. Fragmentuotos DNR bibliotekos išvalytos rinkiniu *Thermo Scientific MagJET NGS Cleanup and Size Selection Kit (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
8. Specifiniai adaptorai prijungti naudojant rinkinius *Thermo Scientific MuSeek Library Preparation Kit, Illumina compatible (ThermoFisher Scientific, JAV)*, *Thermo Scientific MuSeek Index Set 1, Illumina compatible (ThermoFisher Scientific, JAV)* ir *Thermo Scientific™ Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
9. Atlikta DNR bibliotekų fragmentų atranka pagal dydį, vykdant horizontaliąją elektroforezę 1 proc. agarozės gelyje. Agarozės gelis su tinkamo ilgio (480–600 bp) DNR fragmentais buvo iškirptas ir DNR fragmentai išgryninti iš gelio rinkiniu *Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
10. DNR bibliotekų koncentracija įvertinta atliekant tikro laiko PGR rinkiniu *KAPA Library Quantification Kit Illumina® platforms (ThermoFisher Scientific, JAV)* pagal gamintojo protokolą;
11. DNR bibliotekos praskiestos iki 4 nM, sujungtos į vieną mėgintuvėlį, denatūruotos HT1 tirpalu, įstatytos į genetinį analizatorių *MiSeq® (Illumina, Inc., JAV)*;

Naujos kartos sekoskaita atlikta genetiniu analizatoriumi *MiSeq® (Illumina, Inc., JAV)*, naudojant rinkinį *MiSeq Reagent Kits v2 (Illumina, Inc., JAV)* pagal gamintojo protokolą.

Pradinė bioinformacinė analizė atlikta *MiSeq Reporter* programine įranga (*Illumina, Inc., JAV*). Nusekvenuotos sekos buvo sulygiuotos pagal taikininių genų referentines sekas (GRCh37 genome) programine įranga *Bowtie2 v 2.1.0*. Sekos variantai nustatyti programine įranga *freeBayes v.09.21* [194].

Nustatytų variantų anotacija atlikta *ANNOVAR v.2015mar22* [175] programa. Analizuoti variantai, kurių retojo alelio dažnis sveikų žmonių populiacijoje ≤ 2 proc. Variantų patogeniškumas vertintas remiantis *ACMG*

kriterijais [176], atsižvelgiant į informaciją ANNOVAR programa sukurtame dokumente, duomenų bazėse (*ExAC Browser* [177], *Exome Variant Server* [178], *1000 Genome Project* [179], *NCBI dbSNP* [180], *NCBI dbVar* [181], *HGMD* [182], *NCBI OMIM* [183], *NCBI ClinVAR* [184], *LOVD* [185], *NCBI Genome* [186], *DVD* [170]) bei mokslinėje literatūroje. Patogeniniai / galimai patogeniniai sekos variantai buvo patikrinti analizuojant BAM dokumentus vaizdinimo įrankiu *Integrative Genomics Viewer (IGV)* [187].

Genų egzonių, kurių naujos kartos sekoskaitos rezultatų kokybė nebuvo pakankama vertinti atitikimai referentinei sekai, buvo sekvenuoti *Sanger* metodu.

III.2.3. LITGEN tiriamųjų asmenų grupės genetinių tyrimų duomenų rinkimas

LITGEN tiriamųjų grupės asmenų (trjadių), atitinkančių įtraukimo į LITGEN projektą kriterijus, sutikusių dalyvauti tyrime, pasirašiusių Informuoto sutikimo formą, viso egzomo sekoskaita buvo atlikta VU Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros mokslininkų 2011–2013 m.

Šiame tyrime buvo analizuoti genų, siejamų su AR ir XR paveldėjimo KS, koduojančių sekų variantai.

a) Viso egzomo sekoskaitos tyrimas

Genominė DNR buvo išgryninta iš veninio kraujo, naudojant standartinį fenolio chloroformo metodą arba automatizuotą branduolio rūgščių išgryninimo sistemą, naudojant magnetines daleles (*TECAN Freedom EVO® 200*, *Tecan Schweiz AG*, Šveicarija). Viso egzomo DNR bibliotekų, paruoštų rinkiniais *TargetSeq™* (*Life Technologies*, JAV) arba *SureSelect* (*Agilent*, JAV), naujos kartos sekoskaita atlikta genetiniu analizatoriumi *5500 SOLiD™ Sequencer* (*Applied Biosystems*, JAV) pagal gamintojo protokolus. Bioinformacinė analizė atlikta *LifeScope™ Genomic Analysis Software v2.5* programa (*ThermoFisher Scientific*, JAV), *The Genome Analysis Toolkit's (GATK)* įrankiais. Nustatytų variantų anotacija atlikta *ANNOVAR v.2015mar22* [175] programa.

Analizuoti variantai, kurių alelio dažnis kitose sveikų žmonių populacijose ≤ 2 proc. Variantų patogeniškumas vertintas remiantis ACMG kriterijais [176], atsižvelgiant į informaciją ANNOVAR programa sukurtame dokumente, duomenų bazėse (*ExAC Browser* [177], *Exome Variant Server* [178], *1000 Genome Project* [179], *NCBI dbSNP* [180], *NCBI dbVar* [181], *HGMD* [182], *NCBI OMIM* [183], *NCBI ClinVAR* [184], *LOVD* [185], *NCBI Genome* [186], *DVD* [170]) bei mokslinėje literatūroje.

Genų, siejamų su AR ir XR paveldėjimo KS, patogeniniai / galimai patogeniniai sekos variantai buvo patikrinti analizuojant BAM dokumentus vaizdinimo įrankiu *Integrative Genomics Viewer* (IGV) [187].

III.3. Duomenų analizė

DEAFGEN ir LITGEN tyrimų duomenims atlikta aprašomoji ir analitinė statistinė analizė. Analizuoti kategoriniai kintamieji: lytis (vyriškoji / moteriškoji), klausos sutrikimo tipas (sindrominis / nesindrominis), klausos sutrikimo sunkumo laipsnis (lengvas / vidutinis / sunkus / gilus), simetriškumas (simetriškas / nesimetriškas), genealogijos tipai (teigiama / neigiama).

Genetinių tyrimų rezultatų kategoriniai kintamieji: klausos sutrikimo priežastis nustatyta ar nenustatyta, patogeninių variantų genotipai, patogeniniai *GJB2* geno variantai (inaktyvuojantys / neinaktyvuojantys).

Atliekant genotipo ir fenotipo koreliacijos analizę, genetinių tyrimų rezultatai buvo laikomi paaiškinamaisiais kintamaisiais. Klausos sutrikimo rodikliai (sunkumas ir simetriškumas), genealogijos kategorija buvo laikomi atsako kintamaisiais.

Binominis tikslusis kriterijus buvo taikytas apskaičiuojant pasiklivimo intervalą (PI 95 %). Homogeniškumo hipotezė tarp GEN+ ir GEN– grupių kintamųjų buvo patikrinta taikant Pirsono chi kvadrato kriterijų. Siekiant įvertinti patogeninių variantų reikšmę klausos sutrikimo charakteristikoms, apskaičiuoti šansų santykiai (OR), naudojant dvinarę logistinę regresiją. Mažesnė nei 0,05

P reikšmė buvo laikoma statistiškai reikšminga. Statistinė analizė atlikta naudojant atviro kodo programinę įrangą *R* (versija 3.2.1) [195].

Paveldimo KS dažnis populiacijoje apskaičiuotas pagal Hardžio ir Vainbergo pusiausvyros dėsnį:

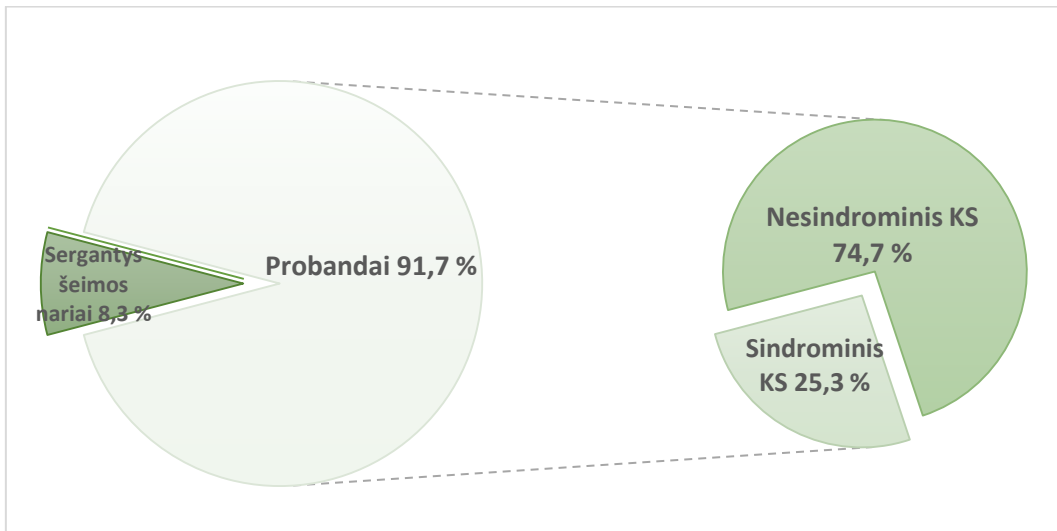
$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, (p - \text{dažnojo alelio dažnis}, q - \text{retojo alelio dažnis}).$$

Atlikto tyrimo galia *post hoc* apskaičiuota programa *G*Power* (3.1 versija) [171].

IV. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Lietuvos populiacijos tiriamųjų asmenų, turinčių klausos sutrikimą, grupė

Dalyvauti DEAFGEN tyrime buvo kviečiami VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centre ir (ar) VšĮ VUL SKF VL Ausų, nosies ir gerklės ligų skyriuje ir Vaikų klausos tyrimų poskyryje 2010–2017 m. konsultuoti pacientai, turintys klausos sutrikimą, atitinkantys įtraukimo į biomedicininį tyrimą DEAFGEN kriterijus (probandai), bei jų šeimos nariai. Į Lietuvos populiacijos tiriamųjų, turinčių klausos sutrikimą, grupę įtraukta 315 tiriamųjų (289 negiminingi asmenys), iš jų 180 vyriškosios lyties (57,1 proc.) ir 135 moteriškosios lyties (42,9 proc.). Izoliuotą (nesindrominį) klausos sutrikimą turinčių asmenų pogrupį sudarė 241 asmuo, į sindrominio klausos sutrikimo pogrupį įtraukti 74 tiriamieji (10 pav.).



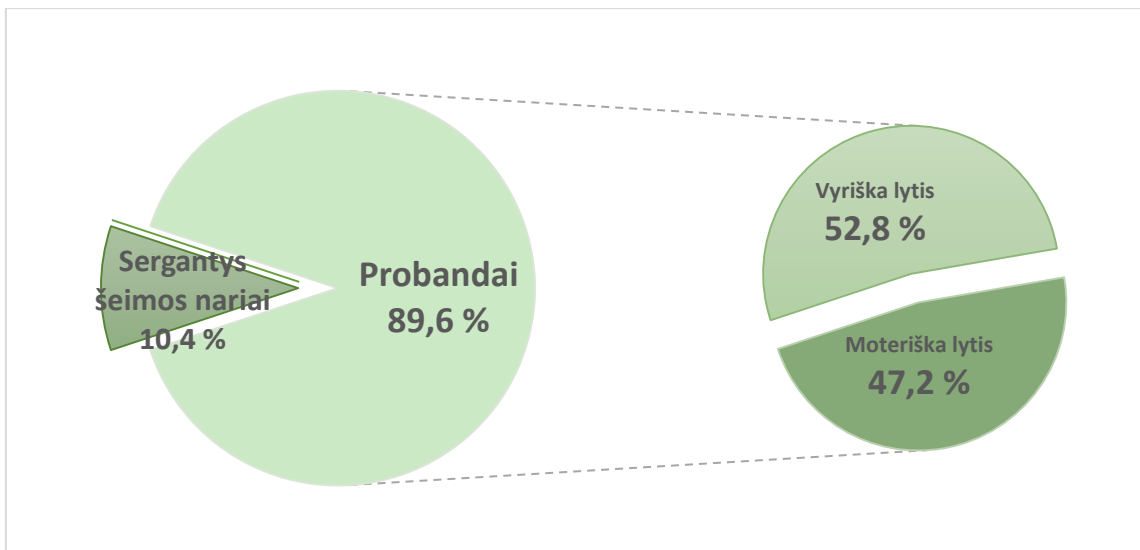
10 pav. DEAFGEN tiriamųjų asmenų grupės struktūra pagal KS tipą

Siekiant išvengti analizės ir rezultatų interpretavimo klaidų, šiame tyrime analizuoti negiminingų asmenų klinikiniai ir genetiniai tyrimų duomenys.

IV.1. Izoliuotą (nesindrominį) klausos sutrikimą turinčių tiriamųjų asmenų pogrupio duomenų analizės rezultatai

Izoliuoto (nesindrominio) KS grupę sudarė 241-as tiriamasis, iš jų 216 negiminingų asmenų. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį – 112-a moteriškosios lyties asmenų, 129-i vyriškosios lyties asmenys.

Iš negiminingų asmenų 102 – moteriškosios lyties (47,2 proc. negiminingų asmenų), 114 – vyriškosios lyties (52,8 proc. negiminingų asmenų) (žr. 11 pav.).



11 pav. Tiriamųjų asmenų pasiskirstymas pagal lytį nesindrominio KS pogrupyje tarp negiminingų asmenų

IV.1.1. Klinikinio ištyrimo rezultatai

Klinikinio ištyrimo metu lengvas, vidutinis, sunkus ir visiškas, klausos sutrikimas nustatytas atitinkamai 28 (13,0 proc.), 53 (24,5 proc.), 32 (14,8 proc.) ir 103 (47,7 proc.) negiminingų asmenų (žr. 3 lentelę).

Simetrišką klausos sutrikimą turėjo 188 (87,0 proc.), o nesimetrišką arba vienpusį – 28 (13,0 proc.) negiminingų izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio asmenų (žr. 3 lentelę).

Išanalizavus genealogijos duomenis, 88-ių (40,7 proc.) negiminingų tiriamųjų šeimose buvo asmenų, turinčių klausos sutrikimą, 128-ių (59,3 proc.) negiminingų tiriamųjų genealogija buvo neigiama (žr. 3 lentelę).

3 lentelė. Klinikiniai duomenys izoliuoto (nesindrominio) KS pogrupyje tarp negiminingų asmenų

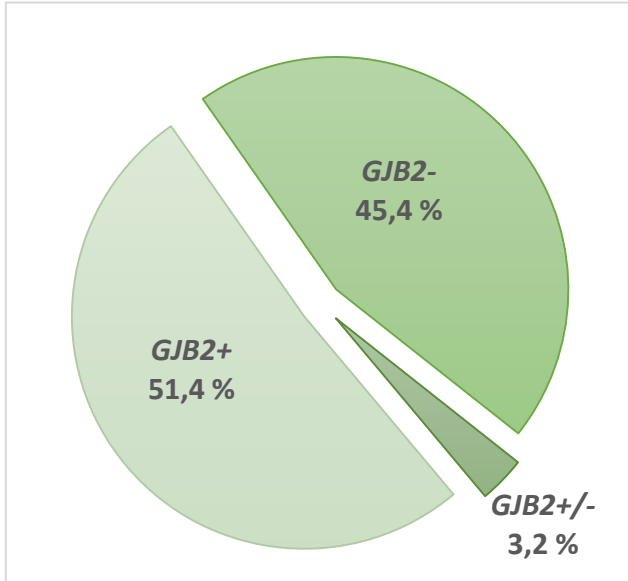
Klinikinis požymis	Tipas	Asmenų skaičius (proc.)
Sunkumo laipsnis	Lengvas	28 (13,0)
	Vidutinis	53 (24,5)
	Sunkus	32 (14,8)
	Gilus	103 (47,7)
Simetriškumas	Simetriškas	188 (87,0)
	Asimetriškas arba vienpusis	28 (13,0)
Genealogija	Teigiama	88 (40,7)
	Neigiama	128 (59,3)
Nepaveldimi veiksniai iš anamnezės	Nustatyti	7 (3,2)
	Nenustatyti	209 (96,8)

Atlikus tiriamųjų ligos anamnezę, nustatyta, kad septyni tiriamieji (3,2 proc.) turėjo kliniškai diagnozuotą ir laboratoriniais bei instrumentiniais tyrimais patvirtintą infekciją perinataliniu laikotarpiu arba kūdikystėje (CMV, meningitas, sepsis) arba kitą nepaveldimą galimą klausos sutrikimo priežastį (gimdymo trauma, neišnešiotumas, perinatalinė hipoksija, traukuliai) perinataliniu laikotarpiu arba kūdikystėje (žr. 3 lentelę).

IV.1.2. Genetinio tyrimo rezultatai

***GJB2* geno (NM_004004.5) koduojančios sekos tyrimo rezultatai**

GJB2 geno koduojančios sekos tyrimas atliktas visiems izoliuotą klausos sutrikimą turintiems tiriamiesiems asmenims (216-ai negiminingų tiriamųjų bei jų sergantiems sibsams ir (ar) tėvams). Nustačius patogeninius *GJB2* geno variantus, segregacijos analizė atlikta visiems tiriamųjų tėvams ir sveikiems sibsams.



12 pav. *GJB2* geno tyrimo rezultatai nesindrominio KS pogrupyje

Pagal *GJB2* geno tyrimo rezultatus nesindrominio (izoliuoto) klausos sutrikimo grupėje sudaryti trys pogrūpiai *GJB2(+)* – jei nustatytas homozigotinis patogeninis variantas arba du sudėtiniai heterozigotiniai patogeniniai variantai, *GJB2(+/-)* – jei nustatytas heterozigotinis patogeninis variantas, ir *GJB2(-)* – patogeninių variantų nenustatyta.

Patogeniniai homozigotiniai arba sudėtiniai heterozigotiniai *GJB2* geno variantai nustatyti 111-ai (51,4 proc.) negiminingų izoliuoto klausos sutrikimo asmenų (*GJB2+*), 7-iems asmenims (3,2 proc.) nustatytas tik vienas *GJB2* geno patogeninis heterozigotinis variantas (*GJB2+/-*), 98-iems asmenims (45,4 proc.) patogeninių variantų nerasta (*GJB2-*) (žr. 12 pav.).

4 lentelė. Patogeninių *GJB2* geno variantų alelių dažniai nesindrominio KS pogrupyje

Patogeninis <i>GJB2</i> geno variantas	Alelio skaičius	Alelio dažnis (proc.)	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformacinės analizės įrankiais HGMD ID
c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939)	152	66,4	<i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CD972240
c.313_326del14 p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253)	53	23,1	<i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CD991732
c.101T>C p.(Met34Thr) (rs35887622)	12	5,2	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,027) <i>Polyphen-2</i> nepatogeninis (įvertis 0,083) <i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CM970679
c.109G>A p.(Val37Ile) (rs72474224)	4	1,7	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,717) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 1,0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CM000016
c.269T>C p.(Leu90Pro) (rs8033894)	4	1,7	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,000) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 1,0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CM990691
c.167delT p.(Leu56Argfs*26) (rs80338942)	3	1,3	<i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CD972241
c.379C>T p.(Arg127Cys), rs727503066	1	0,4	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,0) <i>Polyphen-2</i> nepatogeninis (įvertis 0,423) <i>MutationTaster</i> patogeninis HGMD ID CM014710
Iš viso	229	100	

Izoliuoto (nesindrominio) klausos sutrikimo pogrupyje buvo identifikuoti septyni skirtingi patogeniniai *GJB2* geno variantai (žr. 4 lentelę).

Dažniausias nustatytas *GJB2* geno patogeninis variantas izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje buvo c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939), kurio alelio dažnis sudarė 66,4 proc. patogeninių alelių. Homozigotinis šio varianto genotipas buvo nustatytas 46,8 proc. *GJB2*(+) tiriamųjų, sudėtinis heterozigotinis genotipas su patogeniniu variantu c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) 31-am tiriamajam (27,9 proc. *GJB2*+ tiriamųjų tarpe), su kt. patogeniniais *GJB2* geno variantais – 13-ai tiriamųjų (11,7 proc. *GJB2*+ tiriamųjų) (žr. 5 lentelę).

5 lentelė. Patogeninių *GJB2* geno variantų genotipų ir klausos sutrikimo sunkumo laipsnio pasiskirstymas *GJB2+* tiriamųjų tarpe

<i>GJB2</i> genotipas	Visiškas KS	Sunkus KS	Vidutinis KS	Lengvas KS	Iš viso (proc.)
c. 35[delG];[delG]	39	8	5	0	52 (46,8)
c.[35delG];[313_326del14]	21	6	3	1	31 (27,9)
c.313_326[del14];[del14]	5	1	3	0	9 (8,1)
c.[35delG];[101T>C]	0	0	2	4	6 (5,4)
c.[35delG];[269T>C]	1	0	0	2	3 (2,7)
c.[35delG];[109G>A]	0	0	2	0	2 (1,8)
c.[c.101T>C];[313_326del14]	0	0	0	2	2 (1,8)
c.[35delG];[167delT]	0	0	1	0	1 (0,9)
c.[35delG];[379C>T]	1	0	0	0	1 (0,9)
c.[269T>C];[313_326del14]	0	0	0	1	1 (0,9)
c.[167delT];[313_326del14]	0	0	1	0	1 (0,9)
c.101[T>C];[T>C]	0	0	0	1	1 (0,9)
c.[101T>C];[109G>A]	0	0	0	1	1 (0,9)
Iš viso <i>GJB2</i> (+)	67	15	17	12	111 (100,0)

Antras pagal dažnumą *GJB2* geno patogeninis variantas tarp *GJB2+* tiriamųjų buvo c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253), jo alelio dažnis sudarė 23,1 proc. patogeninių *GJB2* geno alelių (žr. 4 lentelę). Devyni negiminingi izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio asmenys (8,1 proc. tarp *GJB2+* tiriamųjų) turėjo homozigotinį genotipą, 31-as tiriamasis (27,9 proc. tarp *GJB2+* tiriamųjų) turėjo sudėtinį heterozigotinį genotipą su c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939) patogeniniu variantu, keturiems tiriamiesiems (3,6 proc.) nustatytas heterozigotinis šio varianto genotipas su kitais patogeniniais *GJB2* geno variantais (žr. 5 lentelę).

Kiti patogeniniai *GJB2* geno variantai c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622), c.269T>C, p.(Leu90Pro) (rs8033894) ir c.109G>A, p.(Val37Ile) (rs72474224) buvo nustatyti gerokai rečiau – jų alelio dažnis sudarė iki 5,2 proc. patogeninių *GJB2* geno variantų. Variantas c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622) homozigotinis genotipas buvo nustatytas vienam tiriamajam (0,9 proc. tiriamųjų), sudėtinis heterozigotinis genotipas su kitu patogeniniu *GJB2* geno variantu – devyniems asmenims (8,1 proc.). Neaiškios klinikinės reikšmės variantas

c.379C>T, p.(Arg127Cys) (rs727503066) buvo priskirtas patogeniniams, remiantis mokslinėmis publikacijomis [196] ir klinicine bei genealogijos informacija.

Klausos sutrikimas yra labai heterogeninės kilmės patologija. Nors šiuo metu žinoma daugiau kaip 150 genų ir (ar) genetinių sričių, siejamų su klausos sutrikimu, patogeniniai variantai *DFNB1* genetinėje srityje (kurioje yra *GJB2* ir *GJB6* genai) sudaro didžiąją dalį autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimo priežasčių. Vadovaujantis EMQN gerosios praktikos rekomendacijomis, *GJB2* geno koduojančios sekos ir *GJB6* geno iškritų tyrimas turėtų būti rutiniškai atliekamas diagnostinio ištyrimo metu [197].

GJB2 geno koduojančios sekos tyrimo DEAFGEN izoliuoto KS pogrupyje rezultatai rodo didelę *GJB2+* asmenų dalį (51,4 proc.) tirtoje imtyje, lyginant su kitomis Europos populiacijomis, kuriose *GJB2+* asmenų dalis sudaro nuo 10 proc. iki 40 proc. tiriamųjų [198]. Tokius rezultatus gali lemti dvi priežastys: (1) gera pacientų atranka ir (ar) (2) didelis genetinis Lietuvos populiacijos homogeniškumas. Septyniems asmenims nustatytas vienas heterozigotinis *GJB2* geno patogeninis variantas (*GJB2+/-*), tai sudaro 3,2 proc. negiminingų tiriamųjų. Šis rezultatas patenka į 95 proc. pasiklovimo intervalo ribas ir tikėtinai rodo tik tirtųjų asmenų nešiotą būklę.

Nors *GJB2* ir *GJB6* genų patogeninių variantų vaidmuo neurosensorinio klausos sutrikimo patogenezėje nekelia abejonių, identifikuotų variantų etiologinė struktūra skirtingose populiacijose nėra vienoda. *GJB2* geno patogeninis variantas c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939) dažniausiai nustatomas Europos populiacijose [199] ir sudaro iki 70 proc. patogeninių *GJB2* geno alelių. Pokytis c.167delT, p.(Leu56Argfs*26) (rs80338942) yra dažnas žydų aškenazių populiacijoje [200], o c.235delC, p.(Leu79Cysfs*3) (rs80338943) yra pagrindinis *GJB2* geno patogeninis variantas Azijos populiacijose [201]. Kai kuriose populiacijose buvo nustatyti patogeniniai iRNR sukirpimo vietų variantai (pvz., c.-23+1G>A (rs80338940)) [202]. Dažniausias *GJB2* geno patogeninis variantas Lietuvos populiacijos tiriamųjų, turinčių izoliuotą (nesindrominį) klausos

sutrikimą, pogrupyje buvo c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939). Šio varianto alelio dažnis (66,4 proc.) panašus į nustatytą kitų Europos populiacijų sergančių tiriamųjų grupėse.

Patogeninis variantas c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253), anksčiau vadintas c.310del14, c.312del14 ir c.314del14, nutraukia *GJB2* geno ir baltymo seką, tokiu būdu pakenkdamas koneksonų struktūrai ir funkcijai. Šis pokytis buvo identifikuotas daugelyje Europos populiacijų, tačiau jo alelio dažnis sergančių žmonių grupėse sudarė nuo 0,5 proc. iki 7,3 proc. (didžiausias alelio dažnis 7,3 proc. nustatytas Lenkijos populiacijoje (13 pav.) [203-215].

Didelis varianto c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) (23,1 proc. patogeninių alelių) dažnis Lietuvos populiacijos tiriamųjų grupėje buvo netikėtas šio mokslinio tyrimo rezultatas. Genotipas c.313_326[del14];[del14] buvo nustatytas 8,1 proc. *GJB2+* negiminingų asmenų grupėje. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą ne tik apie didelį patogeninio varianto nešiotojų dažnį Lietuvos populiacijoje, bet ir galimą jo kilmę mūsų protėvių genome. Šis patogeninio varianto homozigotinis genotipas buvo nustatytas dviem iš 12-os *GJB2+* totorių kilmės tiriamųjų (16,7 proc.) Rusijos Volgos-Uralo srityje [216]. Žinoma, šie skaičiai per maži, kad būtų galima daryti išsamias išvadas, tačiau homozigotiškumas savaime (išskyrus giminingumą) yra didelio nešiotojų dažnio požymis toje populiacijoje. Turint omenyje artimus lietuvių ir totorių ryšius XIII–XIV a. vykstant karams, šis radinys galėtų būti tolesnių analizių arba daugiapopuliacinių mokslinių tyrimų pagrindas, analizuojant tautų migracijos ir asimiliacijos procesus Eurazijoje. Neseniai atliktos mokslinės literatūros apžvalgos ir *GJB2* geno patogeninių variantų klasterių tyrimo duomenimis, šis pokytis kilęs Rytų Europos populiacijoje [217]. Atlikus bandomąją naujagimių klausos sutrikimo genetinę patikrą Gardino srityje (Baltarusija), nustatytas c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) alelio dažnis 7,0 proc. Straipsnio autorių nuomone, šis patogeninis variantas kilęs Lenkijos protėvių genome [218]. Atlikus DEAFGEN rezultatų analizę, galima daryti prielaidą apie jo kilmę Lietuvos populiacijos protėvių genome. Santykinai mažas

c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) alelio dažnis Latvijos populiacijos sergančių asmenų grupėje rodytų, kad patogeninis variantas galbūt atsirado po baltų genčių susiformavimo. Didesnį c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) alelio dažnį kaimyninių šalių populiacijose (Lenkijoje, Gardino srityje Baltarusijoje) galėtų sąlygoti pokyčio išplitimas dėl glaudžių Lietuvos ir kaimyninių valstybių tarpusavio santykių istorijos tėkmėje (13 pav.).



13 pav. *GJB2* geno patogeninio varianto c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) alelio dažniai *GJB2*+ sergančių asmenų grupėse Europos populiacijose (adaptuota naudojant Europos politinį žemėlapi pagal licencijas (Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license ir GNU Free Documentation License))

Kartu su neabejotinai patogeniniais *GJB2* geno variantais Lietuvos populiacijos izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje nustatyti ir variantai, kurių klinikinė reikšmė mokslinėje literatūroje vertinama nevienareikšmiškai.

Varianto c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622) nešiotojų dažnis Europos populiacijose siekia iki 6,5 proc. [219] ir anksčiau buvo laikomas nepatogeniniu. Bioinformacinės *in silico* analizės rezultatai prieštaringi (4 lentelė), tačiau, atlikus

varianto funkcinę analizę, nustatyta, kad pokytis patogeninis, tačiau jo penetrantiškumas mažesnis [220, 221]. Neseniai Jungtinėje Karalystėje atliktame didelės apimties moksliniame tyrime buvo partvirtinta, kad šis variantas lemia lengvo ir (ar) vidutinio laipsnio klausos sutrikimą [222]. *GJB2* varianto c.101T>C (p.Met34Thr) (rs35887622) alelio dažnis mažesnis (5,3 proc.), nei buvo galima tikėtis pagal jo nustatytą dažnį lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje (3,1 proc.) (žr. IV.3 dalį). Tai gali būti paaiškinta mažesniu pokyčio patogeniškumu, dėl kurio klausos sutrikimui būdinga vėlesnė pradžia ir lengvesnė eiga.

Kitas skirtingai vertinamas *GJB2* geno pokytis c.109G>A, p.(Val37Ile) (rs72474224) taip pat aptiriamas mokslinėje literatūroje. Publikacijose variantas skirtingose populiacijose laikytas tiek patogeniniu, tiek nepatogeniniu [223, 224]. Nors bioinformacinių įrankių vertinimas nevienareikšmiškas, šiuo metu pokytis priskiriamas patogeniniam, siejamam su lengvu ir (ar) vidutinio sunkumo klausos sutrikimu [225]. Didelis c.109G>A, p.(Val37Ile) (rs72474224) nešiotojų dažnis (~8,5 proc.) buvo nustatytas Rytų populiacijose, pokytis lemia klausos sutrikimą, išsivystantį po gimimo [226]. DEAFGEN izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje sudėtinis heterozigotinis variantas nustatytas trims asmenims, turintiems lengvą ir vidutinio laipsnio klausos sutrikimą.

GJB2 geno variantas c.379C>T, p.(Arg127Cys) (rs727503066), remiantis *in silico* analizės (4 lentelė) rezultatais bei duomenų bazių informacija, priskiriamas neaiškios klinikinės reikšmės pokyčiui [227], tačiau jis laikytinas patogeniniu variantu. Tokį požiūrį lemia segregacijos analizės rezultatai šeimoje. Sudėtinis heterozigotinis genotipas su c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939) buvo identifikuotas probandei, turinčiai visišką klausos sutrikimą bei su c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622) patogeniniu variantu jos tėvui, turinčiam lengvą vėlyvos pradžios klausos sutrikimą. Šis variantas buvo aprašytas mokslinėje publikacijoje, kai sergančiam asmeniui buvo nustatytas sudėtinis šio pokyčio heterozigotinis genotipas su c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939) patogeniniu variantu [198, 228].

GJB2 geno koduojančios sekos tyrimų sergančių asmenų pogrupyje rezultatų analizė rodo, kad *GJB2* geno patogeniniai variantai yra dažniausia izoliuotą (nesindrominį) klausos sutrikimą lemianti priežastis. Patogeninių alelių dažnių struktūra turi panašumų su kitomis populiacijomis, tačiau didelis sekos pokyčio c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) dažnis Lietuvos populiacijos izoliuotu klausos sutrikimu sergančių tiriamųjų pogrupyje leidžia daryti prielaidą apie didelį pokyčio nešiotojų dažnį mūsų populiacijoje ir lietuvišką jo kilmę.

***GJB2* geno reguliacinių sekų tyrimo rezultatai**

GJB2 geno reguliacinių sekų tyrimas atliktas 105-iems izoliuoto (nesindrominio) klausos sutrikimo pogrupio tiriamiesiems. Nusekvenuotos ~1200 bp ilgio 5' reguliacinė ir visa 3' NTS sritys. Tiroje grupėje nustatyti 10 VNV – po penkis 5' reguliacinėje srityje (trys iš jų promotoriaus srityje – rs9550621, rs9552101, rs117685390) ir 3' NTS srityje. Nustatytų VNV charakteristika pateikiama 6 lentelėje.

6 lentelė. *GJB2* geno reguliacinėse sekose nustatytų VNV charakteristikos

dbSNP identifikacinis numeris	Pozicija pagal koduojančią seką	Vieta gene	MAF, proc.¹ (retasis alelis)	Patogeniškumas (ClinVar)
rs138841468	c.-1075C>T	5' regul.seka	1,0 (A)	ND
rs9509086	c.-1058C>A	5' regul.seka	44,8 (G)	ND
rs9550621	c.-484T>C	5' regul.seka	18,3 (A)	ND
rs117685390	c.-410T>C	5' regul.seka	21,4 (G)	ND
rs9552101	c.-369A>G	5' regul.seka	23,3 (T)	ND
rs3751385	c.*84T>C	3' NTS	31,3 (A)	Nepatogeninis
rs55704559	c.*168A>G	3' NTS	2,9 (C)	Nepatogeninis
rs9237	c.*1067G>T	3' NTS	13,0 (C)	Nepatogeninis
rs7623	c.*1152G>A	3' NTS	10,7 (C)	Nepatogeninis
rs7988691	c.*1277T>C	3' NTS	0,3 (A)	Nepatogeninis

¹ 1000 genomų projekto duomenys

Nustatytų VNV genotipų ir alelių dažniai pateikiami 7 lentelėje.

7 lentelė. *GJB2* geno reguliacinėse sekose nustatytų VNV genotipų ir retųjų alelių dažniai tirtoje grupėje, Hardžio ir Vainbergo pusiausvyros įvertinimas

Identifikacinis numeris	Genotipas	Genotipo dažnis	MAF, proc. (retasis alelis)	H-V pusiausvyra	
				χ^2	<i>p</i>
rs138841468	c.-1075[=];[=]	0,97	1,0 (A)	0,02	0,882
	c.-1075[C>T];[=]	0,03			
	c.-1075[C>T];[(C>T)]	0			
rs9509086	c.-1058[=];[=]	0,08	22,0 (G)	2,37	0,124
	c.-1058[C>A];[=]	0,30			
	c.-1058[C>A];[(C>A)]	0,62			
rs9550621	c.-484[=];[=]	0	0,0 (A)	NA	<0,0001
	c.-484[T>C];[=]	0			
	c.-484[T>C];[(T>C)]	1			
rs117685390	c.-410[=];[=]	0,70	15,0 (G)	1,12	0,291
	c.-410[T>C];[=]	0,29			
	c.-410[T>C];[(T>C)]	0,01			
rs9552101	c.-369[=];[=]	0	0,5 (T)	0	0,960
	c.-369[A>G];[=]	0,01			
	c.-369[A>G];[(A>G)]	0,99			
rs3751385	c.*84[=];[=]	0,05	16,0 (A)	2,61	0,106
	c.*84[T>C];[=]	0,23			
	c.*84[T>C];[(T>C)]	0,72			
rs55704559	c.*168[=];[=]	0,90	5,0 (C)	0,32	0,571
	c.*168[A>G];[=]	0,10			
	c.*168[A>G];[(A>G)]	0			
rs9237	c.*1067[=];[=]	0	2,0 (C)	0,04	0,842
	c.*1067[G>T];[=]	0,04			
	c.*1067[G>T];[(G>T)]	0,96			
rs7623	c.*1152[=];[=]	0	1,0 (C)	0,01	0,922
	c.*1152[G>A];[=]	0,019			
	c.*1152[G>A];[(G>A)]	0,981			
rs7988691	c.*1277[=];[=]	0	1,0 (A)	0,01	0,922
	c.*1277[T>C];[=]	0,019			
	c.*1277[T>C];[(T>C)]	0,981			

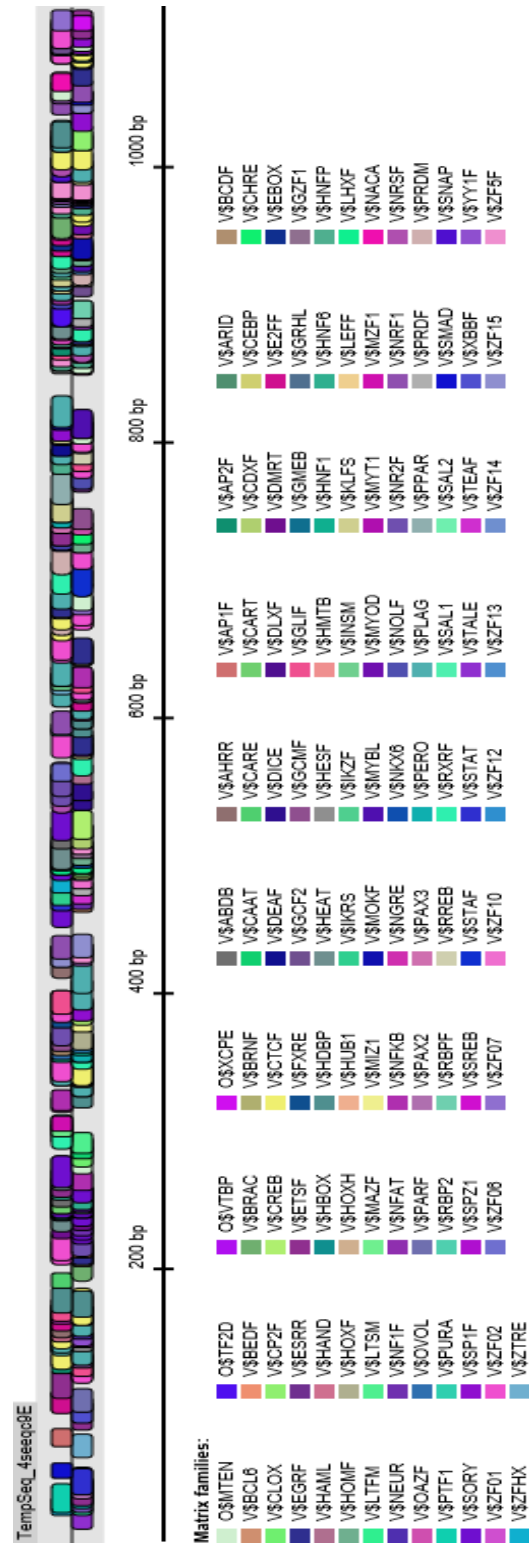
Septynių nustatytų VNV (rs9509086, rs9550621, rs9552101, rs3751385, rs9237, rs7623 ir rs7988691) alternatyvių variantų dažnis buvo didesnis už referentinio alelio dažnį ir sudarė nuo 78,0 iki 100,0 procentų. Likusių trijų VNV (rs138841468, rs117685390 ir rs55704559) alternatyvus alelis buvo retesnis už referentinį ir sudarė nuo 1,0 iki 15,0 procentų.

5' reguliacinės sekos tyrimo rezultatai

Tiriant *GJB2* geno 5' reguliacinės sekos variantų reikšmę klausos sutrikimo etiopatogenezėje asmenų, turinčių izoliuotą klausos sutrikimą, pogrupyje, atlikta bioinformacinė analizė *in silico* įrankiu *MatInspector*. Nustatyta, kad 1142 bp ilgio 5' reguliaciniame regione yra 440 potencialių transkripcijos veiksnių tvirtinimosi vietų (žr. 14 pav.). Iš jų 45-ių seka būdinga transkripcijos veiksnių ir promotoriaus jungimosi matricos modeliams.

Tirtoje izoliuoto klausos sutrikimo grupėje *GJB2* geno 5' reguliaciniame regione nustatyti penki VNV, trys iš jų geno promotoriaus srityje. Atlikta *GJB2* geno 5' reguliacinių sekų potencialių transkripcijos veiksnių jungimosi vietų analizė nustatytų VNV srityse (8 lentelė).

GJB2 raiškos reguliavimas vyksta keliais lygmenimis: transkripcijos kontrolė, iRNR brendimo (sukirpimo, poliadenilinimo, 5' metilinto guanino (angl. 5'cap) prijungimas) kontrolė, iRNR pernašos į citoplazmą kontrolė, iRNR suardymo kontrolė.



14 pav. Potencialių transkripcijos veiksnių jungimosi vietų *GJB2* geno 5' reguliaciniame regione grafinis atvaizdavimas

8 lentelė. Transkripcijos veiksnių jungimosi vietos *GJB2* geno 5' reguliaciniame regione nustatytų VNV srityse

Identi- fikaci- nis Nr.	Matricos pavadinimas	Trans- kripcijos veiksny	Raiška audiniuose [229]	Matricos panašu- mas	Seka
rs1388 41468	V\$ZTRE.02	ZNF658	iRNR visuose audiniuose, baltymas daugiausia placentoje	0,758	gaCTCCtttcgggggtga
rs9509 086	V\$FOSL1.01	FOSL1	iRNR seilių liaukose, stemplės gleivinėje, taukinės adipocituose, baltymas nugaros smegenyse, širdyje, žarnyne, prostatoje ir kiaušidėse	0,858	aaaggAGTCacct
rs9550 621	V\$KLF6.01	KLF6	iRNR visuose audiniuose	0,98	gaagcgGGGcggtgaga
	V\$EGR1.03	EGR1	iRNR visuose audiniuose, baltymas kiaušintakiuose, adipocituose, taukinėje	0,976	tgaagcgGGGcggtgag
	V\$ZNF300.01	ZNF300	iRNR visuose audiniuose, baltymas širdyje	0,993	tcagccgCCCCcgcttcacccgg
	V\$LRRFIP1.0 1	LRRFIP 1	iRNR visuose audiniuose, baltymas nosies epitelyje, limfocituose, limfmazgiuose	0,836	ccgCCCCcgcttcacccgg
	V\$ZNF219.01	ZNF219	iRNR visuose audiniuose, baltymas tulžies pūslėje	0,936	agccgCCCCcgcttcacccggc
rs1176 85390	V\$PRDM5.01	PRDM5	iRNR visuose audiniuose, baltymas stiklakūnyje, inkstuose, placentoje, limfocituose	0,717	gggagactcAGGcgctgggggc acttgg
	V\$ZNF219.01	ZNF219	iRNR visuose audiniuose, baltymas tulžies pūslėje	0,915	aagtgCCCCcagcgcctgagtc
	V\$RREB1.01	RREB1	iRNR visuose audiniuose, baltymas kraujyje, širdyje, kasoje, prostatoje ir placentoje	0,825	cCCCAagtgccecca
	V\$LACTOFE RRIN.01	LTF	iRNR kraujyje, inkstuose, seilių ir pieno liaukose, baltymas neutrofiluose ir pieno liaukose	0,984	gGCACttgg
	V\$USF.04	USF1/2	USF1: iRNR kraujyje, baltymas monocituose, limfocituose, embriono kiaušidėse. USF2: visuose organuose	0,922	gggggCACTtggggaac
	V\$DEC2.01	DEC2	iRNR kepenyse, inkstuose, skeleto raumenyse	0,964	ggggcaCTTGgggaa
	V\$HMX3.01	HMX3	iRNR galvos smegenys (hipotalamas), baltymas širdyje	0,891	agttccccAAGTgceccca
	V\$RFX1.02	RFX1	iRNR kraujyje, baltymas CD8 T limfocitai, B limfocitai, placenta	0,903	ggggcacttgGGAActca
	V\$CEBPE.02	CEBPE	iRNR kraujyje, baltymas kraujyje, kepenyse, placentoje	0,975	gcacttgGGAActc
	V\$CHREBP_ MLX.01	CHREB P/MLX	iRNR kepenyse, baltymas plazmoje, šlapime	0,843	CATGagttccccaagt
	V\$MZF1.02	MZF1	iRNR visuose audiniuose, baltymas mieloidinėse ląstelėse, osteoblastuose	0,995	ttGGGgaactc
	V\$SPI1.02	SPI1	iRNR daugiausia kraujyje, baltymas monocituose, B limfocituose, kasoje	0,975	gcacttgGGAActcatggg
	rs9552 101	V\$PPARG.01	PPARG	iRNR žarnyno adipocituose, poodžio adipocituose, taukinėje, pieno liaukose, baltymas daugiausia placentoje	0,704
V\$ESRRA.05		ESRRA	iRNR skeleto ir širdies raumenyse, baltymas plaučiuose ir limfocituose	0,701	caagccccttcGAGGtcccgat
V\$OLF1.01		OR5I1	iRNR visuose audiniuose	0,824	ccaagTCCCcttcgaggtcccg

Mokslinėje literatūroje publikuoti *GJB2* geno 5' reguliacinių sekų variantai, galintys turėti įtakos šio geno raiškai: 10-ies nukleotidų iškrita c.-684-675del prieš pamatinį promotorių, esanti nepusiausviroje sankiboje su c.101C>T, p.(Met34Thr) (rs35887622) [230]; patogeninis variantas pamatinio promotoriaus srityje (c.-259C>T *trans* padėtyje su c. 250G>A, p.(Val84Met) (rs104894409) [231]; patogeniniai iRNR sukirpimo variantai c.-23G>T ir c.-23+1G>A [202].

Mokslinių tyrimų metu analizuotas transkripcijos veiksnių poveikis *GJB2* geno raiškai. Nustatyta, kad prie koneksino 26 geno 5' reguliacinėje sekoje esančio P1 promotoriaus GC sekos (angl. *GC box*) jungiasi Sp1/3 transkripcijos veiksniai, raiškai svarbios ir TA sekos (angl. *TATA box*) TTA AAA. Universalus transkripcijos veiksnys Sp1, turintis DNR prijungiantį domeną, kurį sudaro trys „cinko pirštelių“ motyvai, atpažįsta GC sekas ir vykdo pamatinės *GJB2* geno (taip pat ir kitų koneksinų genų) raiškos aktyvaciją [232]. *GJB2* geno reguliacinėse sekose yra kelios Sp1 baltymo atpažinimo sekos. Suardžius bent dvi TV atpažinimo vietas reguliacinėje sekoje, sutrinka geno promotoriaus aktyvumas.

Tirtame DEAFGEN izoliuoto KS pogrupyje *GJB2* geno 5' reguliacinio regiono VNV srityse nustatytos 22-ių transkripcijos veiksnių prisijungimo vietos, jų matricos panašumas svyruoja nuo 0,701 iki 0,995. Visų jų raiška didžiausia įvairiuose organuose ir audiniuose, tačiau vidinė ausis nėra pagrindinė jų raiškos vieta.

Genetinių žymenų rs9509086 ir rs117685390 (promotoriaus srityje) retojo alelio dažnis tirtoje grupėje atitinkamai 22,0 proc. ir 15,0 proc., 1000 genomų projekte – 44,8 proc. ir 21,4 proc., toks alelio dažnis leidžia pagrįstai atmesti tiesioginę jų įtaką klausos sutrikimo išsivystymui. Žymens rs9552101 (esančio promotoriaus srityje) nustatytos trijų TV tvirtinimosi vietos (PPARG, ESRRA ir OR5I1), tačiau šio VNV retojo alelio dažnis 1000 genomų grupėje sudaro 23,8 proc. (nors tirtoje grupėje tik 0,5 proc.), todėl jo tiesioginėms sąsajoms su klausos sutikimo patogenezė duomenų nepakanka.

VNV rs9550621 srityje nustatytos penkių TV (KLF6, EGR1, ZNF300, LRRFIP1 ir ZNF219) potencialios tvirtinimosi vietos. Jų matricos panašumas didelis, tačiau tirtoje grupėje visi asmenys turėjo alternatyvų VNV alelį (alelio dažnis 100 proc.), 1000 genomų projekte šio alternatyvaus alelio dažnis 81,7 proc., todėl tikėtina, kad šis variantas tiesioginės įtakos *GJB2* geno raiškai neturi.

Genetinio žymens rs9509086 srityje jungiasi transkripcijos veiksnys FOSL1, matricos panašumas pakankamai didelis (0,86), tačiau šio žymens retojo alelio dažnis tiek tirtoje Lietuvos populiacijos sergančių asmenų grupėje (22,0 proc.), tiek 1000 genomų projekto tiriamųjų grupėje (44,8 proc.) yra akivaizdžiai per didelis, kad būtų galima pagrįstai teigti šio žymens alelių tiesioginę įtaką klausos sutrikimo vystymuisi.

Genetinio žymens rs117685390 srityje tikėtinai jungiasi net 14-a transkripcijos veiksnių (PRDM5, ZNF219, RREB1, LTF, USF1, USF2, DEC2, HMX3, RFX1, CEBPE, CHREBP, MLX, MZF1, SPI1), jų matricos panašumas svyruoja nuo 0,717 iki 0,995. Šio žymens alternatyvus alelis DEAFGEN grupėje buvo 100 proc., 1000 genomų projekte retojo (alternatyvaus) alelio dažnis 21,4 proc., todėl tiesioginio patogeniškumo patvirtinti negalima.

Vienintelis genetinis žymuo *GJB2* geno 5' reguliacinėje srityje, kurio dažnis tiek tirtoje grupėje, tiek 1000 genomų projekte yra gana mažas, kad būtų galima jį vertinti patogeniškumo atžvilgiu, yra rs138841468. Šio VNV srityje nustatyta potenciali ZNF568 transkripcijos veiksnio jungimosi vieta, tačiau matricos panašumo įvertis 0,758 (neviršija 0,8 ribos, būtinos daryti prielaidą, kad DNR seka atitinka konkretaus TV tvirtinimosi vietą) nepakankamas teigti, kad šis transkripcijos veiksnys iš tiesų turi įtakos *GJB2* geno raiškai.

Remiantis nustatytų žymenų retojo alelio dažniu ir transkripcijos veiksnių charakteristikomis, nė vienas iš *GJB2* geno 5' reguliacinio regiono VNV, nustatytų tirtoje grupėje, nesietinas su tiesiogine įtaka klausos sutrikimo etiopatogenezei.

GJB2 geno 3' NTS srities tyrimo rezultatai

GJB2 geno 3' NTS srityje nustatyti penki VNV. Šis regionas analizuotas TargetScan bioinformaciniu įrankiu, siekiant įvertinti galimas geno raiškai svarbių miRNR jungimosi vietas. Konservatyvių 3' NTS sekų, susijungiančių su miRNR, galinčių sutrikdyti GJB2 geno raišką, nerasta. Nustatytos 475-ios mažai konservatyvios miRNR jungimosi sekos. Trys mažai konservatyvios miRNR jungimosi vietos nustatytos ties žymeniu rs3751385 (žr. 15 pav.).

hsa-miR-6857-3p	3'	GACACCCCUUCGAGUCAGU	7mer-A1
Position 79-85 of GJB2 3' UTR	5'	...AGCUGUCAAGGCUCAGUCGUAG...	
hsa-miR-4670-5p	3'	ACUUCA AUGUAGUACCAGCGAA	7mer-A1
Position 82-88 of GJB2 3' UTR	5'	...UGUCAAGGCUCAGUCGUAGCAU...	
hsa-miR-621	3'	UCCAUUCGCGACAACGAUCGG	7mer-A1
Position 83-89 of GJB2 3' UTR	5'	...GUCAAGGCUCAGUCGUAGCAUU...	
hsa-miR-3146	3'	GGUAAGAAGAUAGGAUCGUAC	7mer-m8
Position 87-93 of GJB2 3' UTR	5'	...AGGCUCAGUCGUAGCAUUUCC...	

15 pav. Mažai konservatyvios miRNR jungimosi vietos VNV rs3751385 srityje (analizė TargetScan)

Žymens rs9237 srityje rastos dvi tokios miRNR jungimosi vietos, žymens rs55704559 vietoje – šešios miRNR jungimosi vietos (žr. 16 ir 17 pav.). Žymenų rs7623 ir rs7988691 srityse miRNR tvirtinimosi vietų nenustatyta.

hsa-miR-4698	3'	ACCCAGAGAGGAGAUUUAAAACU	7mer-A1
Position 554-560 of GJB2 3' UTR	5'	...UAUGAUAGGUUUUUUGAUGUAA...	
hsa-miR-499a-3p	3'	UCGUGUCUGAACGACACUACAA	7mer-A1
Position 554-560 of GJB2 3' UTR	5'	...UAUGAUAGGUUUUUUGAUGUAA...	
hsa-miR-499b-3p	3'	ACAAUUCUGAACGUCACUACAA	7mer-A1
Position 565-571 of GJB2 3' UTR	5'	...AUUUUGAUGUAAAGAUGUUCUGG...	

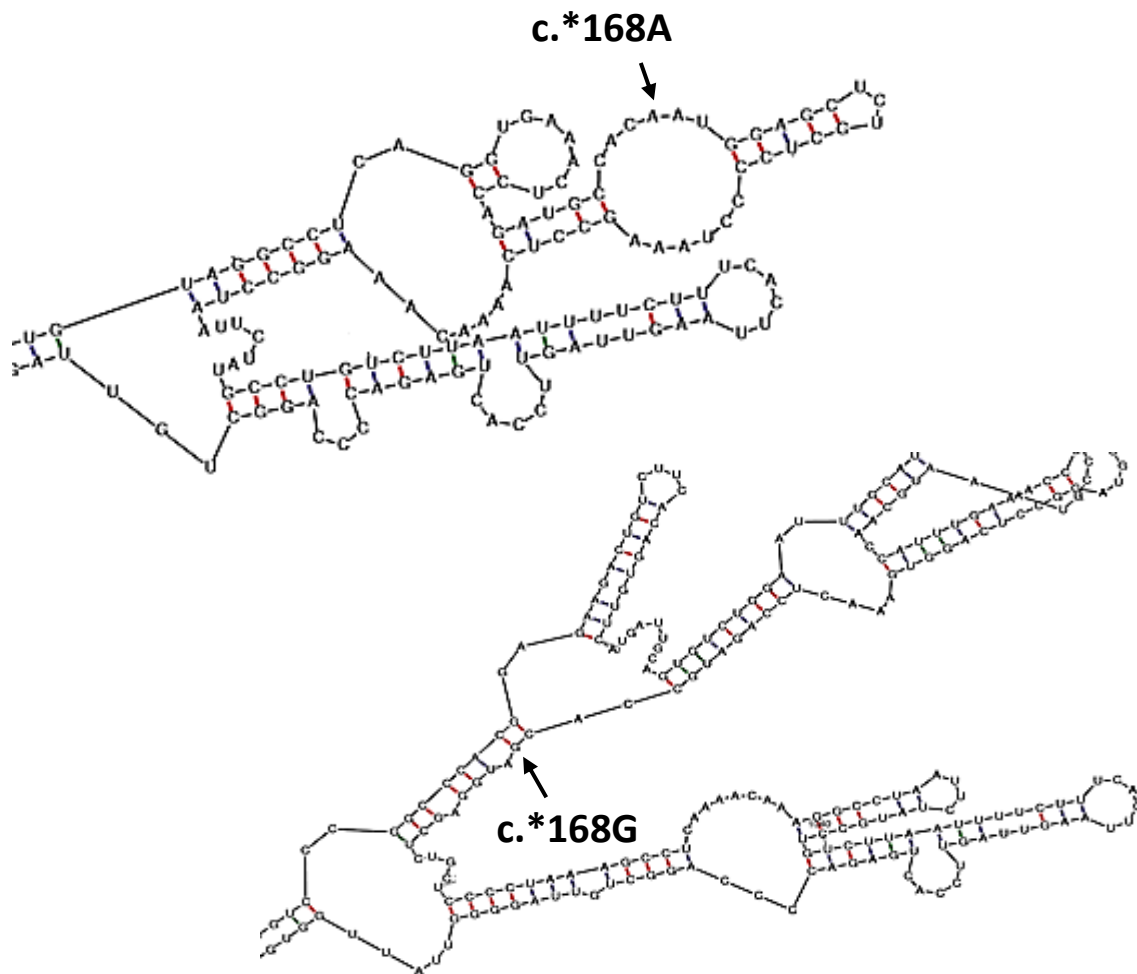
16 pav. Mažai konservatyvios miRNR jungimosi vietos VNV rs9237 srityje (analizė TargetScan)

hsa-miR-4642	3'	UCGGUGGUCCCCUGCUACGGUA	
Position 162-168 of GJB2 3' UTR	5'	...AGGUGAAACUCCAGAUGCCACAA... 	7mer-A1
hsa-miR-3688-5p	3'	UAUACCUUUCUGAA--ACGGUGA	
Position 162-168 of GJB2 3' UTR	5'	...AGGUGAAACUCCAGAUGCCACAA... 	7mer-A1
hsa-miR-891a-3p	3'	GAGUGUUUUGUACACGGUGA	
Position 163-169 of GJB2 3' UTR	5'	...GGUGAAACUCCAGAUGCCACAAU... 	7mer-A1
hsa-miR-4474-3p	3'	AAUCGGAGUACUGGUCGGUGUU	
Position 163-169 of GJB2 3' UTR	5'	...GGUGAAACUCCAGAUGCCACAAU... 	7mer-A1
hsa-miR-7108-5p	3'	GGUGGGCGGACGGCCGGUGUG	
Position 165-171 of GJB2 3' UTR	5'	...UGAAACUCCAGAUGCCACAAUGG... 	7mer-m8
hsa-miR-4289	3'	ACUAUCGGGACGUGUUACG	
Position 168-174 of GJB2 3' UTR	5'	...AACUCCAGAUGCCACAAUGGAGC... 	7mer-m8
hsa-miR-136-5p	3'	AGGUAGUAGUUUUUUUACCUCA	
Position 176-182 of GJB2 3' UTR	5'	...AUGCCACAAUGGAGCUCUGCUC... 	

17 pav. Mažai konservatyvios miRNR jungimosi vietos VNV rs55704559 srityje (analizė *TargetScan*)

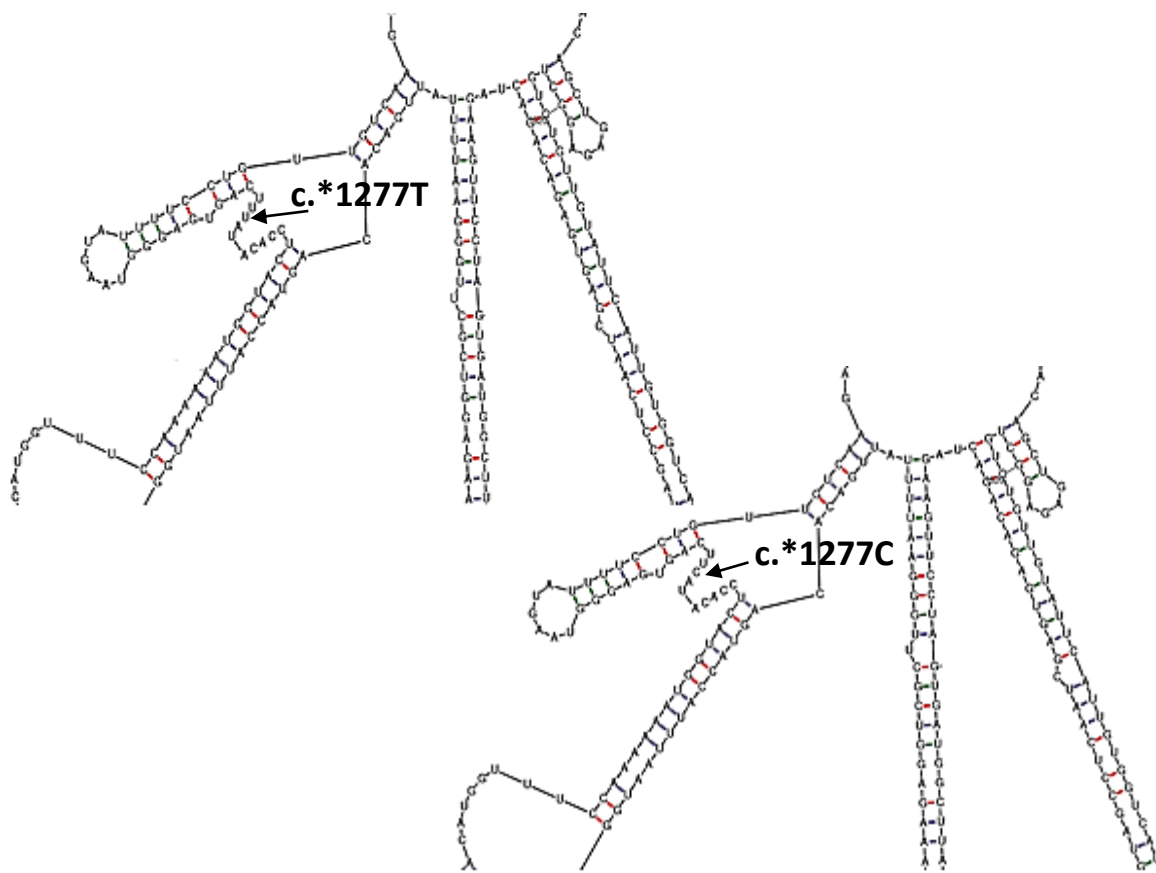
3' NTS variantai gali turėti neigiamos įtakos iRNR antrinei struktūrai ir su ja susijusiai pernašai iš branduolio į citoplazmą bei translacijai.

Trijų 3' NTS srityje identifikuotų žymenų (rs3751385, rs9237 ir rs7623) retojo alelio dažniai tirtoje grupėje ir (ar) 1000 genomų projekte yra >5 proc., todėl jų tiesioginis patogeniškumas mažai tikėtinas. Šių žymenų reikšmė *GJB2* geno iRNR antrinei struktūrai *in silico* bioinformaciniais įrankiais šiame darbe netirta. *Mfold* bioinformaciniu įrankiu [193] išanalizavus likusių dviejų žymenų poveikį iRNR konfigūracijai, nustatyta, kad VNV rs55704559 retasis alelis keičia iRNR antrinę struktūrą, o rs7988691 įtakos neturi (žr. 18 ir 19 pav.).



18 pav. *GJB2* geno iRNR antrinės struktūros fragmentas VNV rs55704559 c.*168A>G srityje

GJB2 geno 3' NTS srities reikšmė geno raiškai įvertinta nepakankamai. Mokslinėje literatūroje publikuota straipsnių, kuriuose analizuotas nustatytų variantų patogeniškumas. 3' geno srities variantai gali turėti įtakos antrinei iRNR struktūrai. Pakitus antrinei konfigūracijai, gali sutrikti iRNR pernaša į citoplazmą. Publikacijose nagrinėta genetinio žymens rs55704559 reikšmė klausos sutrikimo etiopatogenezėje, iškelta hipotezė, kad šis žymuo gali būti siejamas su patologija, tačiau funkciniai tyrimai neatlikti, todėl klinikinė reikšmė lieka neaiški [233].



19 pav. *GJB2* geno iRNR antrinės struktūros fragmentas VNV rs7988691 c.*1277T>C srityje

Moksliniuose tyrimuose analizuotas ir epigenetinis *GJB2* geno raiškos reguliavimas. Nustatyta, kad promotoriaus hipermetilinimas slopina geno raišką žarnyno naviko ląstelėse [234]. Mikro-RNR taip pat dalyvauja koneksinų raiškos reguliacijoje, nustatyta nemažai miRNR (pvz.: mir-1, mir-208a), dalyvaujančių įvairių ligų etiopatogenezės mechanizmuose [232].

Tirtoje sergančių asmenų grupėje aprašytų mokslinėje literatūroje patogeninių variantų, lemiančių klausos sutrikimą, nenustatyta. Įvertinus tirtoje grupėje nustatytų *GJB2* geno reguliacinių sekų variantų charakteristikas, jų reikšmės geno raiškai atmesti negalima, tačiau poveikis turėtų būti netiesioginis. Nustatytas variantas, galintis turėti įtakos antrinei iRNR struktūrai (rs55704559), ir variantai srityse, kuriose (nors ir nelabai specifiskai) gali tvirtintis miRNR. Akivaizdu, kad, kaip ir daugelio biologinių procesų atveju, geno raiška kontroliuojama daugelio veiksnių (transkripcijos veiksnių, histonų modifikacijos,

miRNR) tarpusavio sąveikos. Ją įvertinti geriausiai padėtų sistemų biologijos metodai, iRNR tyrimus vykdant kartu su transkripcijos veiksnių aktyvumo, histonų modifikacijos tyrimu, integruojant miRNR analizę [235].

***MT-RNR1* geno (NR_137294.1) patogeninio varianto m.1555A>G tyrimo rezultatai**

MT-RNR1 geno patogeninio varianto m.1555A>G tyrimas atliktas 14-ai negiminingų izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamųjų, turinčių motininės kilmės klausos sutrikimo paveldėjimo ypatybių genealogijoje. Homoplazminis patogeninis variantas nustatytas keturiems vienos šeimos asmenims – 7,14 proc. negiminingų tirtųjų asmenų (0,46 proc. negiminingų izoliuoto klausos sutrikimo tiriamųjų pogrupyje). Vidutinį ir (ar) sunkų klausos sutrikimą aukštų dažnių diapazone turi šios šeimos probandė, jos dukrai buvo laikinas lengvas klausos sutrikimas, o probandės mama ir sūnus kol kas yra besimptomiai patogeninio varianto nešiotojai.

MT-RNR1 yra mitochondrijų genomo genas, koduojantis mitochondrijų ribosomų 12S RNR. *MT-RNR1* geno patogeniniai variantai pakeičia mitochondrijų ribosomų struktūrą ir funkciją, sutrinka baltymų sintezę, todėl vystosi ląstelės energijos apykaitos sutrikimas. Šis variantas siejamas su dideliu asmens klausos jautrumu aminoglikozidams. Variantas m.1555A>G sukuria naują bazių porą priešpaskutiniame ribosomos RNR linkyje, dėl kurios galbūt sustiprėja mtDNR ir aminoglikozidų jungimasis.

Įvairiose populiacijose *MT-RNR1* varianto m.1555A>G dažnis skiriasi ir svyruoja nuo 0,6 proc. JAV baltaodžių populiacijoje iki 15 proc. Ispanijos KS sergančių grupėje [236, 237]. Nustatyta, kad varianto penetrantiškumas priklauso nuo asmens amžiaus, aminoglikozidų vartojimo, modifikuojančių genų poveikio. Dažnis skiriasi priklausomai nuo genealogijos informacijos – sporadiniais atvejais mažesnis, turinčių teigiamą genealogiją – didesnis. Skirtingose tiriamųjų grupėse

penetrantiškumas svyruoja nuo 8 proc. Kinijos tiriamųjų, turinčių m.1555A>G variantą, grupėje iki 63 proc. Ispanijos patogeninių varianto nešiotųjų grupėje.

Lietuvos populiacijos sergančių tiriamųjų grupėje nustatytas *MT-RNR1* varianto m.1555A>G dažnis (0,46 proc. negiminingų izoliuotą KS turinčių asmenų) kiek mažesnis už kitose populiacijose nustatytą dažnį. Mažas bendras varianto dažnis galėtų būti paaiškintas tuo, kad nebuvo ištirti tiriamieji, turintys sporadinį klausos sutrikimą, galimai mažas nešiotųjų dažnis populiacijoje, retas aminoglikozidų vartojimas ir dėl to vėlesnė / lengvesnė ligos eiga ar besimptomis nešiojimas.

***GJB6* (NM_001110219.2) geno iškritų tyrimo rezultatai**

GJB6 geno 232 kb ir 309 kb iškritų tyrimas atliktas visiems izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamiesiems, kuriems *GJB2* geno koduojančioje sekoje nenustatyti patogeniniai variantai (*GJB2*– ir *GJB2*+/- grupės). Tiroje grupėje nė vienam asmeniui pokytis nenustatytas.

Vadovaujantis EMQN tinklo gerosios praktikos rekomendacijomis, *GJB6* geno iškritų tyrimas turėtų būti atliekamas visiems izoliuotą klausos sutrikimą turintiems asmenims įprastai atliekant genetinę diagnostiką [197]. Šių *GJB6* geno patogeninių variantų dažnis įvairiose populiacijose skiriasi – nuo 0,2 proc. (heterozigotinė 309 kb iškrita 1-am iš 648-ių sergančių asmenų) iki 22-ų iš 33-ų sergančių asmenų, turinčių vieną *GJB2* geno patogeninį variantą [238, 239]. Dideli skirtumai įvairiose populiacijose galimi dėl populiacijos stratifikacijos, įkūrėjo efekto, asortatyvių santuokų.

Genų, siejamų su klausos sutrikimu, grupių tyrimo ir viso egzomo sekoskaitos tyrimo rezultatai

Remiantis mokslinės literatūros duomenimis, eksperimentiniam tyrimui buvo pasirinkta 11-a genų, siejamų su autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimu, kurių patogeniniai variantai buvo dažniausiai nustatyti kitose populiacijose [240] (žr. 9 lentelę ir 5 priedą).

9 lentelė. Su AR paveldėjimo KS siejamų 11-os genų, pasirinktų sekoskaitai, sąrašas

	Genas	Genetinė sritis	Transkripto referentinės sekos numeris	PGR amplikonų skaičius	PGR amplikonų ilgis, bp
1	<i>CDH23</i>	10q22.1	NM_022124.5	31	296–3834
2	<i>DFNB59</i>	2q31.2	NM_001042702.3	2	3000–3037
3	<i>GJB6</i>	13q12.11	NM_001110219.2	1	1005
4	<i>MYO15A</i>	17p11.2	NM_016239.3	15	345–4603
5	<i>OTOF</i>	2p23.3	NM_194248.2	14	300–4673
6	<i>SLC26A4</i>	7q22.3	NM_000441.1	8	449–4473
7	<i>TECTA</i>	11q23.3	NM_005422.2	15	488–3854
8	<i>TMCI</i>	9q21.13	NM_138691.2	17	300–1190
9	<i>TMIE</i>	3p21.31	NM_147196.2	3	288–744
10	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	NM_024022.2	6	300–3964
11	<i>TRIOBP</i>	22q13.1	NM_001039141.2	14	300–3554
			IŠ VISO	126	

11-os genų, siejamų su klausos sutrikimu, tyrimas atliktas 103-ims negiminingiems asmenims, turintiems izoliuotą (nesindrominį) klausos sutrikimą, kuriems nenustatyti *GJB2* patogeniniai variantai arba *MT-RNR1* geno m.1555A>G patogeninis variantas.

126-ių genų, siejamų su klausos sutrikimu, izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje tyrimas buvo atliktas 7-iems negiminingiems asmenims, turintiems teigiamą genealogiją, kuriems anksčiau atliktais tyrimais ligos priežastis nebuvo identifikuota.

Remiantis *ACMG* rekomendacijomis, duomenų bazėmis ir mokslinėmis publikacijomis, izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje nustatyti devyni anksčiau aprašyti *MYO7A*, *MYO15A*, *SLC26A4*, *TMPRSS3* genų variantai, priskiriami patogeniniams / galimai patogeniniams (10 lentelė).

10 lentelė. Patogeniniai / galimai patogeniniai variantai, anksčiau publikuoti mokslinėje literatūroje

Nr.	Variantas (identifikacinis Nr. dbSNP)	Genotipas (asmenų sk.)	Alelio dažnis sveikų žmonių populiacijoje	Varianto tipas/patologija (pagal DVD [170])	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais, duomenų bazių identifikacinis numeris
1	<i>MYO7A</i> (NM_000260.3) c.1556G>A; p.(Gly519Asp) (rs111033206)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_all: ND ExAC_all: 0,01665	Patogeninis / <i>Usher</i> sindromas 1b	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 1,0) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,02) HGMD ID CM004271
2	<i>MYO7A</i> (NM_000260.3) c.3476G>T; p.(Gly1159Val) (rs199897298)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_all: ND ExAC_all: 0,0002	Patogeninis / <i>Usher</i> sindromas 1	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 1,0) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,02) HGMD ID CM114224
3	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3) c.8090T>C; p.(Val2697Ala) (rs200451098)	Heterozigotinis (5)	1000genomes_all: ND ExAC_all: 0,0004	Patogeninis / paveldimas klausos sutrikimas	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,999) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus regionas (įvertis 1,952) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,19)
4	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) c.85G>C; p.(Glu29Gln) (rs111033205)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_all: ND ExAC_all: 0,00005263	Patogeninis / išsiplėtusio prieangio latako sindromas	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,47) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,662) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0,000115) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus (įvertis 2,349) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 4,21) HGMD ID CM011487
5	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) c.304+2T>C (rs746238617)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_all: ND ExAC_all: 0,000008237	Patogeninis / klausos sutrikimas	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> nekonservatyvus (įvertis 2,648) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 3,62) <i>Human Splicing Finder</i> patogeninis HGMD ID CS093410

10 lentelė (tęsinys). Patogeniniai / galimai patogeniniai variantai, anksčiau publikuoti mokslinėje literatūroje

Nr.	Variantas (identifikacinis Nr. dbSNP)	Genotipas (asmenų sk.)	Alelio dažnis sveikų žmonių populiacijoje	Varianto tipas (pagal DVD [170])	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais, duomenų bazių identifikacinis numeris
6	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) c.1246A>C:p.(Thr416Pro) (rs28939086)	Hetero- zigotinis (2)	1000genomes_all : ND ExAC_all: 0,0002	Patogeninis / <i>Pendred</i> sindromas; paveldimas klausos sutrikimas	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 1) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus regionas (įvertis 2,137) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,1) HGMD ID CM981505
7	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) c.1963A>G p.(Ile655Val) (rs397516424)	Hetero- zigotinis (1)	1000genomes_all : ND ExAC_all: 0,00003299	Galimai patogeninis /paveldimas klausos sutrikimas; <i>Pendred</i> sindromas	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,56) <i>Polyphen-2</i> nepatogeninis (įvertis 0,034) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus regionas (įvertis 2,183) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,74) HGMD ID CM109556
8	<i>TMPRSS3</i> (NM_024022.2) c.208delC; p.(His70 Thrfs*19) (rs727503493)	Hetero- zigotinis (1)	1000genomes_all : ND ExAC_all: 0,0004	Patogeninis / paveldimas klausos sutrikimas	<i>MutationTaster2</i> patogeninis HGMD ID CD020353
9	<i>TRIOBP</i> (NM_001039141.2) c.5014G>T; p.(Gly1672Ter) (rs200045032)	Hetero- zigotinis (1)	1000genomes_all : 0,0002 ExAC_all: 0,001	Neaiškios klinikinės reikšmės	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus regionas (įvertis 1,048) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 1,87) PUBMED ID 28089734

11 lentelė. Nauji galimai patogeniniai / nežinomos klinikinės reikšmės variantai, anksčiau nepublikuoti mokslinėje literatūroje

Nr.	Variantas (identifikacinis Nr. dbSNP)	Genotipas (asmenų sk.)	Alelio dažnis sveikų žmonių populiacijoje	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais	Varianto tipas
1	<i>CDH23</i> (NM_022124.5): c.6983A>C; p.(Asn2328Thr) (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,002) <i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 1) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,53)	Neaiškios klinikinės reikšmės
2	<i>CDH23</i> (NM_022124.5): c.9319+1G>A, (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 3,82) <i>Human Splicing Finder</i> patogeninis	Galimai patogeninis
3	<i>MYO6</i> (NM_004999.3) : c.188G>T; p.(Cys63Phe) (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 1,000) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,51)	Galimai patogeninis
4	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.6767_6768delinsT; p.(Gly2256Valfs*13) (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis
5	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8005dupA; p.(Leu2668fs) (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis
6	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.1894_2541del648; p.(Gln632Leufs*132) (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis
7	<i>OTOF</i> (NM_194248.2): c.766-1G>A (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,83) <i>Human Splicing Finder</i> patogeninis	Galimai patogeninis
8	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1766A>C; p.(Gln589Pro) (rs397516422)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,101) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,937) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 4,57)	Neaiškios klinikinės reikšmės
9	<i>TMPRSS3</i> (NM_024022.2): c.206-2A>C (ND)	Heterozigotinis (1)	1000genomes_a II: ND ExAC_all: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>Human Splicing Finder</i> patogeninis	Galimai patogeninis

Be šių pokyčių, identifikuoti dar 9-i galimai patogeniniai/neaiškios klinikinės reikšmės variantai *CDH23*, *MYO6*, *MYO15A*, *OTOF*, *SLC26A4*, *TMPRSS3* genuose, galimai lemiantys klausos sutrikimo išsivystymą (žr. 11 lentelę).

Tirtoje grupėje 8-iems negiminingiems asmenims (3,7 proc. izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje) nustatyti *CDH23*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYO15A*, *SLC26A4* ir *TMPRSS3* genų patogeniniai / galimai patogeniniai variantai (AR paveldimo KS atveju – sudėtinis heterozigotinis genotipas, AD paveldėjimo KS – heterozigotinis genotipas) (žr. 12, 14 lenteles).

12 lentelė. AR KS lemiančių genų sudėtinių heterozigotinių pokyčių dažnis izoliuoto KS pogrupyje

Tyrimas	Genas	Asmenų skaičius	Dažnis izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje, proc.
11-os genų koduojančių sekų tyrimas	<i>CDH23</i>	1	0,46
	<i>MYO15A</i>	2	0,93
	<i>SLC26A4</i>	2	0,93
126-ių genų koduojančių sekų tyrimas	<i>MYO6</i>	1	0,46
	<i>MYO7A</i>	1	0,46
	<i>TMPRSS3</i>	1	0,46
	Iš viso	8	3,7

Septyniems izoliuoto KS pogrupio tiriamiesiems asmenims (3,24 proc.) nustatytas tik vienas patogeninis autosominio recesyvaus paveldėjimo KS lemiantis variantas, kurio nepakanka ligos patogenezėi paaiškinti (žr. 13, 14 lenteles).

13 lentelė. AR KS lemiančių genų heterozigotinių pokyčių dažnis izoliuoto KS pogrupyje

Genas	Asmenų skaičius	Dažnis izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje, proc.
<i>MYO15A</i>	4	1,85
<i>SLC26A4</i>	2	0,93
<i>TRIOBP</i>	1	0,46
Iš viso	7	3,24

Viso egzomo sekoskaitos tyrimas atliktas dviem izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio asmenims, kuriems anksčiau atliktais tyrimais ligos priežastis nebuvo identifikuota. Analizei pasirinktas 10 333 genų, siejamų su paveldimomis patologijomis, sąrašas [229], patogeninių variantų nebuvo identifikuota. Nustatyti variantai genuose, siejamuose su klausos sutrikimu, pateikiami 15 lentelėje.

Paveldimas klausos sutrikimas pasižymi genetiniu heterogeniškumu – tai daugelio monogeninių ligų savybė. Organizmo vystymasis makroskopiniu, mikroskopiniu ir molekulinio lygmeniu ir jo funkcijos priklauso nuo koordinuotos genų ir jų produktų – RNR ir baltymų – veiklos. Ta pati fenotipinė išraiška gali būti esant patogeniniams variantams viename iš šimtų ar tūkstančių genų, dalyvaujančių konkretaus organo veikloje. Vieno geno patogeniniai variantai gali sudaryti tik menką dalį ligos etiologinėje struktūroje, tačiau jų suminis dydis gali daryti didelę įtaką. Tiriant heterogenines ligas susiduriama su sprendimu dėl tyrimo apimties. Pavienių genų sekoskaita paprastai yra neoptimali tokių heterogeninių ligų atveju. Naujos kartos sekoskaita yra tinkama didelės apimties ir didelio skaičiaus asmenų tyrimui, tačiau sprendimas dėl tiriamų genų rinkinio pasirinkimo nėra paprastas. Viso genomo tyrimas yra didžiausios apimties tyrimas, tačiau didelė jo kaina ir sudėtinga duomenų analizė neleidžia šiam tyrimui tapti rutininiais fundamentiniuose tyrimuose ir genetinėje diagnostikoje. Viso egzomo sekoskaita yra kiek mažiau išsami, bet dėl mažesnės kainos ir lengvesnės duomenų analizės yra dažniau taikoma tiek moksle, tiek klinikinėje praktikoje. Taikinių genų rinkinių sekoskaita tiriant paveldimas ligas, pasižyminčias heterogeniškumu, naudinga dėl paprastesnės duomenų analizės ir mažesnės trukmės, tačiau jos apimtis, taigi ir efektyvumas, mažiausias iš visų naujos kartos sekoskaitos būdų.

Klausos sutrikimo genetiniam tyrimui sukurtos kelios strategijos. Europos molekulinės genetikos kokybės tinklo gerosios praktikos rekomendacijose izoliuoto klausos sutrikimo atveju siūloma tyrimą pradėti nuo *GJB2* geno koduojančios sekos sekoskaitos, taip pat atlikti *GJB6* geno iškritų tyrimą [197].

14 lentelė. Izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje nustatyti patogeninių / galimai patogeninių / neaiškios klinikinės reikšmės variantų deriniai

Nr.	1-as ligą galimai lemiantis variantas	2-as ligą galimai lemiantis variantas	Patologija, siejama su genu (MIM)	Tiriamąjį asmens fenotipas
1	<i>CDH23</i> (NM_022124.5): c.6983A>C; p.(Asn2328Thr)	<i>CDH23</i> (NM_022124.5): c.9319+1G>A	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (601386) AR paveldėjimo <i>Usher</i> s. 1D (601067) 	Izoliuotas simetriškas, sunkus klausos sutrikimas, genealogija neigiama
	<i>OTOF</i> (NM_194248.2): c.766-1G>A	?	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas / klausos neuropatija (601071) 	
2	<i>MYO6</i> (NM_004999.3): c.188G>T; p.(Cys63Phe)	-	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (606346) Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas su HKMP (606346) Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (607821) 	Izoliuotas simetriškas, vidutinis klausos sutrikimas, genealogija teigiama
3	<i>MYO7A</i> (NM_000260.3): c.1556G>A; p.(Gly519Asp)	<i>MYO7A</i> (NM_000260.3): c.3476G>T; p.(Gly1159Val)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600060) Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (601317) AR paveldėjimo <i>Usher</i> s. (276900) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija teigiama
4	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8090T>C; p.(Val2697Ala)	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8005dupA; p.(Leu2668fs)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija teigiama
5	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8090T>C; p.(Val2697Ala)	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.6767_6768delinsT; p.(G2256Vfs*13)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija teigiama
6	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1246A>C;p.(Thr416Pro)	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1766A>C; p.(Gln589Pro)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas su išsiplėtusiu vandentiekiu (600791) AR paveldėjimo <i>Pendred</i> s. (274600) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija neigiama
7	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.85G>C; p.(Glu29Gln)	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1963A>G p.(Ile655Val)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas su išsiplėtusiu vandentiekiu (600791) AR paveldėjimo <i>Pendred</i> s. (274600) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija neigiama
8	<i>TMPRSS3</i> (NM_024022.2): c.206-2A>C	<i>TMPRSS3</i> (NM_024022.2): c.208delC; p.(His70 Thrfs*19)	<ul style="list-style-type: none"> Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (601072) 	Izoliuotas simetriškas, visiškas klausos sutrikimas, genealogija teigiama

14 lentelė (tęsinys). Izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje nustatyti patogeninių / galimai patogeninių / neaiškios klinikinės reikšmės variantų deriniai

Nr.	1-as ligą galimai lemiantis variantas	2-as ligą galimai lemiantis variantas	Patologija, siejama su genu (MIM)	Tiriamąjo asmens fenotipas
9	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8090T>C; p.(Val2697Ala)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316)	Izoliuotas vienpusis, visišką klausos sutrikimą, genealogija neigiama
10	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8090T>C; p.(Val2697Ala)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316)	Izoliuotas simetriškas, vidutinis klausos sutrikimas, genealogija teigiama
11	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.8090T>C; p.(Val2697Ala)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316)	Izoliuotas simetriškas, lengvas klausos sutrikimas, genealogija neigiama
12	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c. 1894_2541del648; p.(Gln632Leufs*132)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316)	Izoliuotas simetriškas, visišką klausos sutrikimą, genealogija teigiama
13	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.304+2T>C	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas su išsiplėtusiu vandentiekiu (600791) · AR paveldėjimo <i>Pendred</i> s. (274600)	Izoliuotas simetriškas, visišką klausos sutrikimą, genealogija teigiama
14	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.A1246C:p.(Thr416Pro)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas su išsiplėtusiu vandentiekiu (600791) · AR paveldėjimo <i>Pendred</i> s. (274600)	Izoliuotas vienpusis, vidutinis klausos sutrikimas, genealogija neigiama
15	<i>TRIOBP</i> (NM_001039141.2): c.5014G>T; p.(Gly1672Ter)	?	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (609823)	Izoliuotas simetriškas, vidutinis klausos sutrikimas, genealogija neigiama

15 lentelė. Viso egzomo sekoskaitos tyrimu nustatyti reti (alelio dažnis ≤ 2 proc.) variantai genuose, siejamiuose su izoliuotu klausos sutrikimu

N r.	Variantas (identifikacinis Nr. dbSNP)	Genotipas	Alelio dažnis sveikų žmonių populiacijoje	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais	Patologija, siejama su genu	Varianto tipas
1	<i>MYO6</i> (NM_004999.3): c.1025C>T; p.(Ala342Val) (rs145564837)	Heterozigotinis	1000genomes _all: 0,0004 esp6500siv2_all: 0,002	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,0) <i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 1,0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,37)	· Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (606346) · Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas su HKMP (606346) · Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (607821)	Neaiškios klinikinės reikšmės
	<i>PTPRQ</i> (NM_001145026.1): c.3959A>G, p.(Tyr1320Cys) (ND)	Heterozigotinis	1000genomes _all: 0,005 esp6500siv2_all: 0,001	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,15) <i>Polyphen-2</i> patogeninis (įvertis 0,975) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 2,82)	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (613391)	Neaiškios klinikinės reikšmės
2	<i>CDH23</i> (NM_022124.5): c.5146C>A, p.(Gln1716Lys) (rs369740230)	Heterozigotinis	1000genomes _all: ND esp6500siv2_all: $7.9e^{-05}$	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 1,0) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,67) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 4,49)	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (601386) · AR paveldėjimo <i>Usher</i> s. 1D (601067)	Neaiškios klinikinės reikšmės
	<i>COL11A2</i> (NM_080681.2): c.4907C>T, p.(Pro1636Leu)	Heterozigotinis	1000genomes _all: 0.0007 esp6500siv2_all: 0.002	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0.017) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,861) <i>MutationTaster2</i> nepatogeninis <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 4,06)	· Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (601868) · Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (609706) · Fibrochondrogenezė 2 (614524) · <i>Stickler</i> s., III tipas (184840) · <i>Weissenbacher-Zweymuller</i> s. (277610)	Nepatogeninis

Universalaus sprendimo dėl tolesnio genetinio pacientų ištyrimo šiuo metu nėra. Kai kurie specialistai pagal ligos fenotipą kryptingai tiria konkretų geną, kiti pradeda nuo dešimčių ar šimtų su klausos sutrikimu siejamų genų rinkinių tyrimo. Genų rinkinio pasirinkimas priklauso nuo jo patogeninių variantų dažnio etiologinėje ligos struktūroje. Keli genų rinkiniai gamintojų siūlomi tyrimui, juose tiriamų genų, siejamų tiek su sindrominiu, tiek su nesindrominiu klausos sutrikimu, skaičius siekia 140 [241].

Patogeniniai AR paveldėjimo klausos sutrikimo genų *SLC26A4* (NM_000441.1), *MYO15A* (NM_016239.3), *OTOF* (NM_194248.2), *CDH23* (NM_022124.5), *TMC1* (NM_138691.2), *TECTA* (NM_005422.2), *TMPRSS3* (NM_024022.2.2), *TRIOBP* (NM_001039141.2), *DFNB59* (NM_001042702.3), *TMIE* (NM_147196.2), *GJB6* (NM_001110219.2) variantai dažniausiai aprašyti įvairių populiacijų asmenims, turintiems KS [138, 242]. Šių genų sekoskaitai buvo adaptuotas DNR bibliotekos paruošimo protokolas, kurio pagrindą sudaro genų koduojančių sekų sudėtinė amplifikacija (iki 5 kb ilgio fragmentai) ir amplikonų fermentinė fragmentacija, tokiu būdu sumažinant fragmentų dydį iki tinkamo naujos kartos sekoskaitai. Šis protokolas nėra aprašytas mokslinėje literatūroje, jis pirmą kartą buvo panaudotas heterogeninės kilmės paveldimos patologijos genetiniams tyrimams, jį galima adaptuoti įvairiems poreikiams, norint atlikti tyrėjus dominančių genų naujos kartos sekoskaitą.

Tirtame izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje daugiausiai nustatyta *SLC26A4* geno taškinių patogeninių variantų, anksčiau aprašytų mokslinėje literatūroje, priskiriamų patogeniniams / galimai patogeniniams. Identifikuoti keturi tokie *SLC26A4* (NM_000441.1) geno variantai: c.85G>C, p.(Glu29Gln) (rs111033205); c.304+2T>C (rs746238617); c.1963A>G, p.(Ile655Val) (rs397516424); c.1246A>C, p.(Thr416Pro) (rs28939086) (žr. 10 lentelę). Be šių, dar vienas naujas nepublikuotas *SLC26A4* geno variantas c.1766A>C; p.(Gln589Pro) (rs397516422), priskiriamas neaiškios klinikinės reikšmės pokyčiams. Jo sudėtinis heterozigotinis genotipas nustatytas su patogeniniu

SLC26A4 geno variantu, todėl galėtų būti priskiriamas patogeniniam. *SLC26A4* iRNR sukirpimo variantas c.304+2T>C buvo nustatytas vienam izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio asmeniui ir vienam sindrominio KS pogrupio tiriamajam, priešingai nei kitose populiacijose, kur jis nustatytas ypač retai. Aminorūgštį keičianti *SLC26A4* c.1246A>C, p.(Thr416Pro) (rs28939086) pakaita, nustatyta ir dviem izoliuoto KS pogrupio asmenims, yra vienas dažniausių *SLC26A4* geno patogeninių variantų baltaodžių populiacijose [217].

SLC26A4 geno patogeniniai variantai lemia izoliuotą klausos sutrikimą arba *Pendred* s. (klausos sutrikimas dėl vidinės ausies sraigės displazijos – *Mondini* displazijos, ir skydliaukės hipofunkcija). Išanalizavus genotipus, dviem izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamiesiems (0,93 proc.) nustatyta po du patogeninius / galimai patogeninius variantus. Abu tiriamieji turi simetrišką, visišką klausos sutrikimą, jų šeimoje daugiau klausos sutrikimą turinčių asmenų nėra. Dar dviem asmenims (0,93 proc.) nustatytas patogeninis *SLC26A4* variantas heterozigotinėje būklėje. *Pendred* s. būdingų požymių šiems asmenims nerasta. Lyginant su kitomis populiacijomis, izoliuoto klausos sutrikimo dažnis dėl *SLC26A4* geno patogeninių variantų Lietuvos populiacijos grupėje kiek mažesnis nei kitose baltaodžių populiacijų nesindrominio KS grupėse, kur jis siekia nuo 2,0 proc. iki 3,5 proc. [243, 244].

MYO15A geno variantas c.8090T>C, p.(Val2697Ala) (rs200451098), *DVD* duomenų bazėje priskirtas patogeniniam, buvo nustatytas penkiuose iš aštuonių *MYO15A* geno patogeninių alelių (62,5 proc.). Šio varianto heterozigotinį genotipą tirtoje grupėje du asmenys turi kartu su kitu patogeniniu aleliu, jo homozigotinis genotipas mokslinėje literatūroje aprašytas sergančiam asmeniui [245], tačiau *ClinVar* duomenų bazėje priskirtas neaiškios klinikinės reikšmės variantų kategorijai. Tirtoje grupėje identifikuoti dar trys nauji nepublikuoti *MYO15A* galimai patogeniniai variantai c.8005dupA, p.(Leu2668fs); c.6767_6768delinsT; p.(Gly2256Valfs*13); c.1894_2541del648; p.(Gln632Leufs*132), lemiantys rėmelio poslinkį ir priešlaikinės baigmės kodono susidarymą. Tirtoje grupėje dviem

asmenims (0,93 proc.) nustatyti du patogeniniai *MYO15A* geno variantai. Didžiausias izoliuoto KS dažnis dėl *MYO15A* patogeninių variantų nustatytas Artimųjų Rytų populiacijose, kur jis siekia 9,5 proc. [246].

Vienam izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamajam, turinčiam simetrišką sunkų klausos sutrikimą ir neigiamą genealogiją, nustatyti du nepublikuoti heterozigotiniai *CDH23* geno (koduojančio baltymą kadheriną 23) variantai, jų patogeniškumas įvertintas pagal ACMG kriterijus. Vienas variantas, keičiantis aminorūgštį *CDH23* (NM_022124.5): c.6983A>C, p.(Asn2328Thr), yra ekstraceliulinėje baltymo dalyje, kitas iRNR sukirpimo variantas *CDH23* (NM022124) c.9319+1G>A galbūt lemia galinės baltymo sekos praradimą ir kadherino 23 funkcijos sutrikimą. Patogeniniai geno variantai lemia izoliuotą klausos sutrikimą arba *Usher* sindromą. Aminorūgšties pokyčių lemiantys geno variantai siejami su lengvesnės eigos ligos forma be tinklainės patologijos ir pusiausvyros sutrikimo [247].

Naujas *MYO6* (NM_001300899.1) geno heterozigotinis variantas c.188G>T; p.(Cys63Phe) nustatytas vienam asmeniui, turinčiam izoliuotą, simetrišką, vidutinį AD paveldėjimo pokalbinį klausos sutrikimą, prasidėjusį pirmame gyvenimo dešimtmetyje. Remiantis *in silico* analizės rezultatais, variantas patogeninis, sveikų asmenų populiacijoje nebuvo identifikuotas. Šeimoje yra daugiau asmenų, turinčių klausos sutrikimą, nustatytasis variantas segreguoja su patologija šeimoje, todėl vertinamas kaip galimai patogeninis. Mokslinėse publikacijose aprašytas asmenų, kuriems nustatyti *MYO6* geno patogeniniai variantai lemia AR arba AD paveldėjimo ligos patogenezę, dažnis Azijos populiacijose siekia 7,5 proc. Aprašomas progresuojantis ligos pobūdis, platus klausos sutrikimo spektras – nuo lengvo iki visiško, ligos pradžia nuo pirmo iki penkto gyvenimo dešimtmečio [248].

MYO7A (NM_000260.3) geno patogeniniai variantai c.1556G>A; p.(Gly519Asp) ir c.3476G>T; p.(Gly1159Val) nustatyti dviem sibsams (0,46 proc.), sergantiems izoliuotu, simetrišku, visišku klausos sutrikimu,

progresavusiu nuo sunkaus iki visiško per pirmąjį gyvenimo dešimtmetį. *MYO7A* geno patogeniniai variantai siejami su izoliuotu AR ir AD paveldėjimo klausos sutrikimu bei AR paveldėjimo *Usher* s. I tipu (klausos sutrikimas ir pigmentinis retinitas). Nustatyti variantai mokslinėje literatūroje aprašyti asmenims, sergantiems *Usher* s., tačiau tiriamieji, kuriems buvo identifikuoti *MYO7A* geno variantai, akių dugne pigmentinio retinito požymių kol kas neturi, todėl priskirti izoliuoto klausos sutrikimo pogrupiui. Mokslinėse publikacijose izoliuoto klausos sutrikimo grupėse *MYO7A* geno patogeniniai variantai nustatomi iki 3,1 proc. [249].

TMPRSS3 geno (NM_024022.2) patogeniniai / galimai patogeniniai variantai c.206-2A>C ir c.208delC; p.(His70Thrfs*19) taip pat nustatyti dviem sibsams, turintiems įgimtą, simetrišką, visišką klausos sutrikimą. Variantas c.208delC; p.(His70fs) lemia rėmelio poslinkį, jis *DVD* duomenų bazėje priskiriamas patogeniniam. iRNR sukirpimo variantas c.206-2A>C nėra aprašytas mokslinėje literatūroje, tačiau jo charakteristikos (antras sukirpimo akceptorius nukleotidas), *in silico* analizės rezultatai, *trans* padėtis su patogeniniu variantu leidžia jį priskirti galimai patogeniniam. Mokslinių tyrimų duomenimis, *TMPRSS3* geno patogeniniai variantai lemia iki 1,0 proc. izoliuoto klausos sutrikimo atvejų baltaodžių populiacijose [250].

TRIOBP (NM_001039141.2) c.5014G>T; p.(Gly1672Ter) (rs200045032) heterozigotinis variantas nustatytas vienam DEAFGEN tiriamajam, jo nepakanka, kad būtų galima paaiškinti KS patogenezę. Iki šiol pasaulyje publikuota keliasdešimt KS atvejų dėl *TRIOBP* pokyčių (žinomas tik 21-as patogeninis variantas). Galima daryti prielaidą, kad Lietuvos populiacijoje KS dėl *TRIOBP* pokyčių turėtų būti retas.

Viso egzomo sekoskaitos tyrimas buvo atliktas triadai, kurioje abu tėvai ir sūnus turi ikikalbinį klausos sutrikimą, o sūnus papildomai turi sindrominių požymių – raidos atsilikimą, fenotipo ypatybių. Tėvai priskirti izoliuoto KS pogrupiui, o sūnus – sindrominio KS pogrupiui. Tėvams prieš egzomo tyrimą buvo

atliktas *GJB2* ir 11-os genų, siejamų su klausos sutrikimu, grupės tyrimas, tačiau patogeninių variantų nenustatyta.

Atlikus viso egzomo sekoskaitą, tėvui ir sūnui identifikuotas heterozigotinis *MYO6* (NM_001300899.1) c.1025C>T; p.(Ala342Val) (rs145564837) variantas, kurio patogeniškumas vertinamas nevienareikšmiškai. Kadangi jis nustatytas sveikų asmenų imtyje (dažnis *1000genomes_all*: 0,0004), maža tikimybė, kad galėtų lemti AD paveldėjimo klausos sutrikimą, nebent varianto penetrantiškumas būtų nevisiškas arba jo funkciją veiktų modifikuojantys genai. *DVD* duomenų bazėje variantas priskiriamas galimai nepatogeniniam, *ClinVar* duomenų bazėje vertinimai skiriasi – dauguma jį priskiria neaiškios klinikinės reikšmės variantui. Kitas variantas, nustatytas tam pačiam asmeniui – *PTPRQ* geno (NM_001145026.1) heterozigotinis pokytis c.3959A>G, p.(Tyr1320Cis). Genas siejamas su AR paveldėjimo klausos sutrikimu, varianto *in silico* įvertinimai skirtingi, todėl pokytis, tikėtina, nesusijęs su tiriamojo ligos patogenezė.

Motinai nustatytas heterozigotinis *CDH23* (NM_022124.5): c.5146C>A, p.(Gln1716Lys) (rs369740230), duomenų bazėse ir *in silico* priskiriamas neaiškios klinikinės reikšmės variantui, ir *COL11A2* (NM_080679.2): c.4844C>T, p.(Pro1615Leu), priskiriamas nepatogeniniam (žr. 15 lentelę).

Mokslinės literatūros duomenimis, viso egzomo sekoskaitos efektyvumas identifikuojant klausos sutrikimo genetinę priežastį skiriasi, priklausomai nuo tiriamųjų grupės sudarymo principo, ligos paveldėjimo būdo šeimoje ir prieš viso egzomo sekoskaitą atliktų tyrimų. Giminingų santuokų ir AR paveldėjimo KS atveju tikimybė nustatyti patogeninį variantą yra didžiausia ir siekia 56,0 proc. [251], o sporadiniais atvejais, jei prieš VES tyrimą atliktas genų grupių tyrimas, tikimybė mažėja ir netgi daliai pacientų nustatomas netipiškos fenotipinės išraiškos sindrominis klausos sutrikimas [252].

IV.1.3. Klausos sutrikimo etiologinė struktūra

Išanalizavus genetinių tyrimų rezultatus Lietuvos populiacijos izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje, paveldima ligos priežastis nustatyta 120-iai tiriamųjų (55,6 proc.), dar 14-ai asmenų (6,5 proc.) identifikuotas vienas AR paveldėjimo KS lemiantis variantas, kurio nepakanka molekulinei diagnozei patvirtinti. Kliniškai nustatyti ir laboratoriniais bei instrumentiniais tyrimais patvirtinti nepaveldimi veiksniai sudaro 3,2 proc. nesindrominio KS pogrupio tiriamųjų (žr. 16 lentelę ir 20 pav.).

16 lentelė. Izoliuoto klausos sutrikimo etiologinė struktūra Lietuvos populiacijos grupėje

KS priežastys	Tiriamųjų skaičius	Dažnis, proc. (95 % PI)
Nustatytas monogeninis KS	120	55,6 (48,7 – 62,3)
<i>GJB2</i> +	111	51,4 (44,5 – 58,2)
Kt. monogeniniai KS	9	4,2 (1,9 – 7,8)
Nustatytas vienas AR paveldėjimo KS lemiantis variantas	14	6,5 (3,6 – 10,6)
Nepaveldimi veiksniai anamnezės duomenimis	7	3,2 (1,3 – 6,6)
KS priežastis nenustatyta	75	34,7 (28,4 – 41,5)
Iš viso	216	100,0

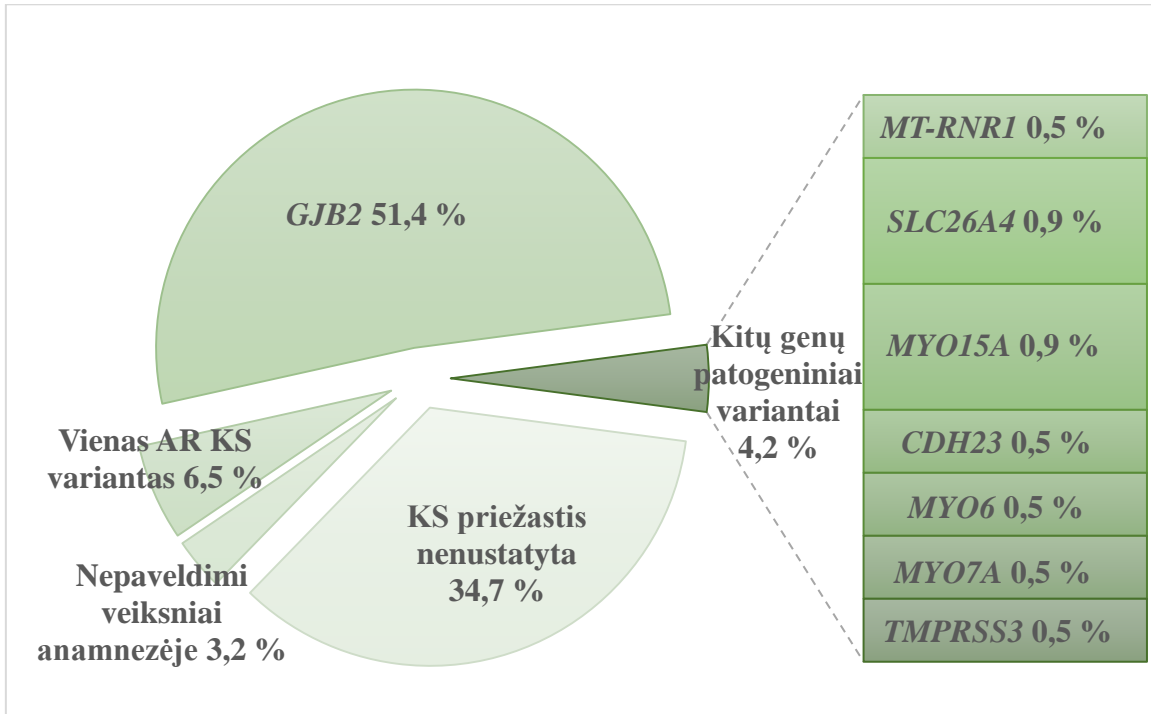
Pagrindinės monogeninio KS priežastys tirtoje grupėje yra *GJB2* (NM_004004.5) geno patogeniniai variantai. Kitų genų – *MT-RNR1* (NR_137294.1), *SLC26A4* (NM_000441.1), *MYO15A* (NM_016239.3), *CDH23* (NM_022124.5), *MYO6* (NM_004999.3), *MYO7A* (NM_000260.3), *TMPRSS3* (NM_024022.2) patogeniniai / galimai patogeniniai variantai ligos etiopatogenezėje dalyvavo rečiau (žr. 17 lentelę ir 20 pav.).

17 lentelė. Paveldimą izoliuotą KS sutrikimą lemiančių variantų etiologinė struktūra tirtoje Lietuvos populiacijos izoliuoto KS pogrupyje

Genas	Tiriamųjų skaičius	Dažnis, proc. (95 % PI)
<i>GJB2</i> (NM_004004.5) du patogeniniai variantai	111	51,4 (44,5–58,2)
<i>MYO15A</i> (NM_016239.3) du patogeniniai variantai	2	0,93 (0,1–3,3)
<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) du patogeniniai variantai	2	0,93 (0,1–3,3)
<i>CDH23</i> (NM_022124.5) du patogeniniai variantai	1	0,46 (0,0–2,6)
<i>MYO6</i> (NM_004999.3) vienas galimai patogeninis variantas	1	0,46 (0,0–2,6)
<i>MYO7A</i> (NM_000260.3) du patogeniniai variantai	1	0,46 (0,0–2,6)
<i>MT-RNR1</i> (NR_137294.1) m.1555A>G patogeninis variantas	1	0,46 (0,0–2,6)
<i>TMPRSS3</i> (NM_024022.2) du patogeniniai variantai	1	0,46 (0,0–2,6)
<i>GJB2</i> (NM_004004.5) vienas patogeninis variantas	7	3,2 (1,3–6,6)
<i>MYO15A</i> (NM_016239.3) vienas patogeninis variantas	4	2,78 (0,5–4,7)
<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1) vienas patogeninis variantas	2	0,93 (0,1–3,3)
<i>TRIOBP</i> (NM_001039141.2) vienas patogeninis variantas	1	0,46 (0,0–2,6)
Iš viso	134	62,0 (55,2–68,5)

Tirtame Lietuvos populiacijos izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje didžiausią ligos etiopatogenetinių veiksnių dalį (51,4 proc. (95 % PI 44,5–58,2)) sudaro patogeniniai *GJB2* geno variantai. Lyginant su kitomis baltaodžių (angl. *Caucasian*) populiacijomis, Lietuvoje ši klausos priežastis dažnesnė. Kitose

Europos populacijose *GJB2* geno patogeniniai variantai siekia iki 40 proc. KS priežasčių. Nustatytas ypač didelis *GJB2* geno patogeninio varianto c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) dažnis sergančių asmenų grupėje ypač pabrėžia Lietuvos populiacijos skirtumą nuo kaimyninių ir kitų Europos šalių bei leidžia daryti prielaidą apie varianto kilmę mūsų protėvių genome.



20 pav. Etiologinė struktūra tirtame Lietuvos populiacijos sergančių izoliuotu KS asmenų pogrupyje

Lietuvos populiacijoje kitų genų patogeniniai variantai nustatyti 4,2 proc. pacientų. Kitose populacijose *MT-RNR1*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *CDH23*, *MYO6*, *MYO7A*, *TMPRSS3* genų patogeninių variantų nulemtas klausos sutrikimo dažnis skiriasi. *MT-RNR1* geno pokytis m.1555A>G – dažna klausos sutrikimo priežastis Ispanijos populiacijoje, kur ji sudaro iki 15 proc. ligos atvejų. *SLC26A4* geno variantai dažni Azijos Rytų populacijose, kuriose jie siekia 12,6 proc. [253] izoliuoto klausos sutrikimo priežasčių. *MYO15A*, *MYO6*, *MYO7A* genų patogeniniai variantai minimi daugelyje publikacijų paskelbtų dažniausiai nustatomų klausos sutrikimo

paveldimų priežasčių sąrašuose, jų dažniai taip pat skiriasi priklausomai nuo tirtų populiacijų [254].

CDH23 geno patogeniniai variantai, siejami su izoliuoto KS išsivystymu, dažnesni Azijos Rytų populiacijose, kuriose jie siekia 12,5 proc. pokalbinio KS priežasčių [255]. *TMPRSS3* geno patogeniniai pokyčiai baltaodžių (angl. *Caucasian*) populiacijose nustatomi rečiau (iki 0,38 proc.) [256], tačiau populiacijose, kuriose dažnos giminingos santuokos, *TMPRSS3* pokyčiai identifikuojami dažniau. 6,5 proc. tiriamųjų nustatytas vienas patogeninis AR paveldėjimą lemiantis variantas, kurio nepakanka ligos išsivystymui paaiškinti. Mokslinėse publikacijose vyksta diskusijos, ar patogeninio varianto nešiotojai AR ligos atveju taip pat gali turėti fenotipinių ligos požymių (gali būti modifikuojančių genų poveikis, digeninis paveldėjimas, haplonepakankamumas, kt. priežastys), tačiau kol kas trūksta įrodymų keliamoms hipotezėms pagrįsti. Priešingai, neretai vėlesniais tyrimais nustatoma visiškai kita paveldima ligos priežastis. Remiantis šia informacija, labiausiai tikėtina, kad tiriamieji, turintys vieną AR paveldėjimo KS variantą, yra tik nešiotojai. Kita vertus, neatlikus išsamesnių (kiekybinių, promotoriaus, kt. reguliacinių sekų, epigenetinių) tyrimų, visiškai atmesti jų reikšmės ligos patogenezėi negalima.

Nepaveldimų aplinkos veiksnių sąlygotas izoliuotas klausos sutrikimas nustatytas 3,2 proc. tiriamųjų. Akivaizdu, kad ši dalis neatspindi tikrojo nepaveldimų priežasčių lemiamo KS masto, nes buvo identifikuotos tik pačios sunkiausios būklės, gresiančios tiriamųjų gyvybei (meningitas, sepsis, neišnešiotumas, hipoksija, sunki CMV infekcija). Remiantis moksline literatūra, vien įgimta CMV infekcija gali sudaryti 15–20 proc. klausos sutrikimo priežasčių [257]. Lietuvoje, nesant CMV klinikinių požymių, vien klausos sutrikimas nepakankamas, kad būtų galima skirti CMV infekcijos tyrimą, todėl daugelis ligos atvejų lieka nedidžiuoti. Taip pat reikia įvertinti, kad įgimtą CMV infekciją geriausiu atveju galima nustatyti tik per keletą savaičių po gimimo, vėliau tyrimas tampa neinformatyvus ir vienintelis būdas nustatyti įgimtą CMV infekciją lieka

CMV DNR tyrimas sauso kraujo ėminiuose, paimtuose visuotinei naujagimių patikrai dėl įgimtų / paveldimų medžiagų apykaitos ligų. Tačiau šis tyrimas Lietuvoje kol kas taip pat rutiniškai neatliekamas. Nepaisant to, net ir nustačius aplinkos veiksnius iš anamnezės, sergančiam asmeniui turėtų būti atliekami ir genetiniai tyrimai, kadangi negalima atmesti, kad ligos etiopatogenezeje dalyvavo ir paveldimi veiksniai.

Tirtame izoliuoto KS pogrupyje 34,7 proc. pacientų nenustatyta jokia ligos priežastis. Kitose populiacijose genetinių KS tyrimų diagnostinis efektyvumas vidutiniškai sudaro ~ 40 proc. [258]. Lietuvoje ši dalis galėtų būti dar mažesnė, jei visiems asmenims, turintiems KS, būtų tiriama aplinkos veiksnių (CMV ir kt. infekcijų) įtaka, taip pat jei visiems pacientams būtų atliktas 126-ių genų grupės tyrimas, viso egzomo sekoskaita, kiekybiniai tyrimai. Tikėtina, kad, atlikus išsamesnius tyrimus, nenustatytų ligos priežasčių sumažėtų. Vis dėlto, išanalizavus nustatytų priežasčių struktūrą, galima teigti, kad Lietuvos populiacijos izoliuoto klausos sutrikimo etiologinė struktūra, nors ir turi panašumo su kitomis baltaodžių (angl. *Caucasian*) populiacijomis, tačiau pasižymi ir savitumu, kuris ypač atsiskleidžia analizuojant nustatytų patogeninių / galimai patogeninių variantų struktūrą.

Įvairių populiacijų KS priežasčių struktūros turi savitų bruožų. Etiologinei struktūrai susiformuoti svarbu daugelis veiksnių – geografiniai (mažesnė asimiliacija dėl sunkiau pasiekiamų gyvenamų teritorijų, pvz., salų gyventojai), etniniai (santuokų asortatyvumas pagal priklausymą etninei populiacijai), socialiniai (populiacijos izoliacija dėl santvarkos, šalies ideologijos; žmonių migracija), medicininiai (skirtingas nepaveldimų klausos sutrikimo priežasčių prevencijos ir gydymo efektyvumas) ir genetiniai (įkūrėjo efektas).

Žinoti šią informaciją svarbu ne tik moksliniu, bet ir praktiniu požiūriu – tai leidžia apibūdinti esamą padėtį ir numatyti pacientų ištyrimo bei sveikatos priežiūros strategijas ir kryptis.

IV.1.4. Nustatytų genetinių pokyčių koreliacijos su tiriamųjų fenotipu tyrimo rezultatai

Atliekant nustatytų genetinių variantų koreliacijos su fenotipu analizę, izoliuoto klausos sutrikimo pogrupio tiriamieji pagal genetinių tyrimų rezultatus buvo suskirstyti į tris grupes:

- (1) paveldima klausos sutrikimo priežastis **nustatyta (GEN+)**;
- (2) nustatytas vienas patogeninis autosominį recesyvų klausos sutrikimą lemiantis variantas (**GEN+/-**);
- (3) paveldima klausos sutrikimo priežastis **nenustatyta (GEN-)**.

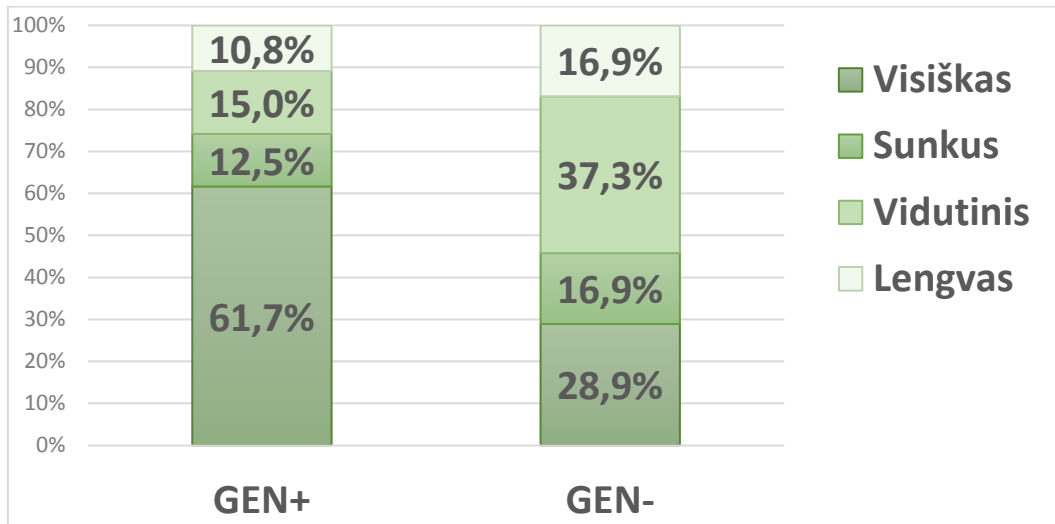
GEN+ ir GEN- grupės buvo palygintos pagal klausos sutrikimo charakteristikas (sunkumą, simetriškumą) ir genealogijos duomenis. GEN+/- grupės duomenys nebuvo naudoti genotipo ir fenotipo koreliacijos analizei, kad būtų išvengta klaidingo priskyrimo kuriai nors iš grupių.

Tyrimo galios *post hoc* analizė buvo atlikta visiems rezultatams įvertinti. *G*Power* programa apskaičiuotas empirinis efekto dydis svyravo nuo vidutinio iki didelio priklausomai nuo analizuojamų duomenų. Empirinė visų tyrimų galia viršijo 0,8. Empirinio efekto dydžio ir galios vertės pateiktos atitinkamose lentelėse.

Homogeniškumo testo analizės rezultatai rodo, kad klausos sutrikimo sunkumo laipsnis GEN+ ir GEN- grupėse skiriasi statistiškai reikšmingai, $p=5,9 \times 10^{-5}$ (18 lentelė, 21 pav.). GEN+ grupėje dominuoja visiškas klausos sutrikimas, o vidutinis ir lengvas dažniau nustatytas GEN- asmenims.

18 lentelė. KS sunkumo laipsnio pasiskirstymas GEN+ ir GEN- grupėse

	Visiškas KS	Sunkus KS	Vidutinis KS	Lengvas KS	Iš viso
GEN+	74	15	18	13	120
GEN-	24	14	30	14	82
Iš viso	98	29	48	27	202
Chi kvadrato kriterijus = 22,2; laisvės laipsniai = 3			$p=5,9 \times 10^{-5}$		
Empirinis efekto dydis $w=0,7$			Empirinė galia=1,0		



21 pav. KS sunkumo laipsnio pasiskirstymas GEN+ ir GEN– grupėse

Didžiausią GEN+ grupės dalį sudaro *GJB2*+ asmenys. Norint įvertinti baltymą inaktyvuojančių (rėmelio poslinkio) ir neinaktyvuojančių patogeninių variantų poveikį ligos fenotipui, *GJB2*+ asmenys buvo suskirstyti į I ir N klases pagal genotipą. I – identifikuoti du geno variantai, inaktyvuojantys baltymą, N – identifikuotas bent vienas geno patogeninis variantas, neinaktyvuojantis baltymo.

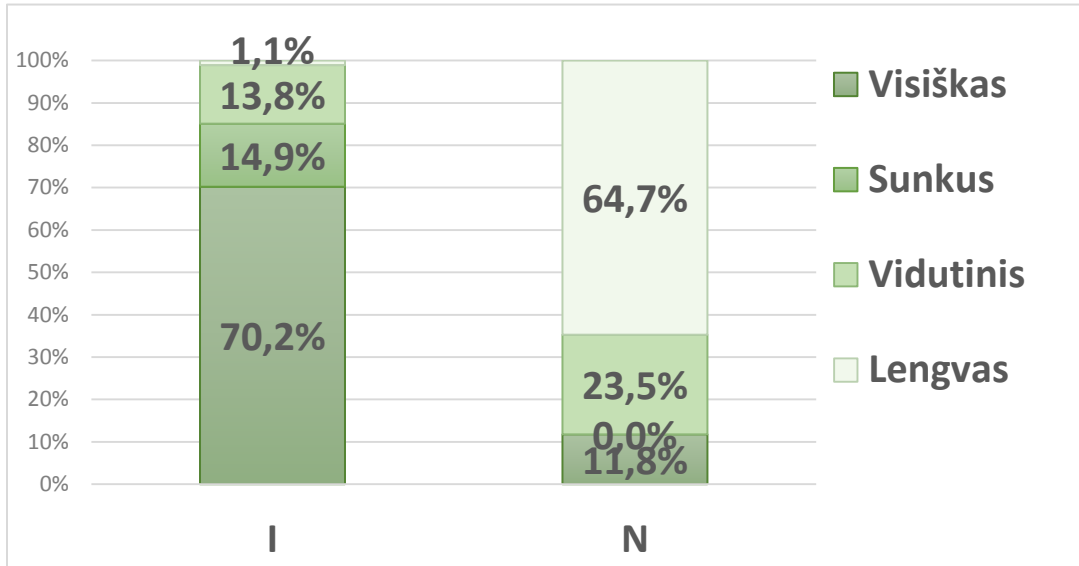
Nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas I ir N *GJB2*+ asmenų klasėse, $p=4,2 \times 10^{-14}$ (19 lentelė, 22 pav.). I klasės didžioji dalis (70,2 proc.) tiriamųjų turi visišką klausos sutrikimą, o N klasės – lengvą (64,7 proc.).

19 lentelė. Klausos sutrikimo sunkumo laipsnio pasiskirstymas I ir N *GJB2*+ grupės klasėse

<i>GJB2</i> + klasė	Visiškas KS	Sunkus KS	Vidutinis KS	Lengvas KS	Iš viso
I	66	14	13	1	94
N	2	0	4	11	17
Iš viso	68	14	17	12	111

Chi kvadrato kriterijus = 65,4; $p=4,2 \times 10^{-14}$
laisvės laipsniai = 3

Empirinis efekto dydis $w=2,3$ Empirinė galia = 1,0

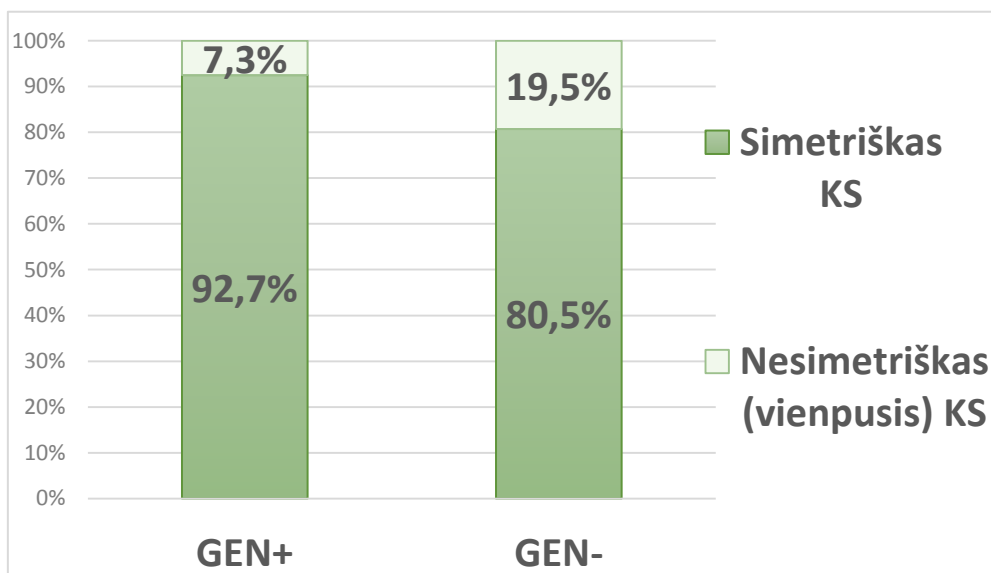


22 pav. Klausos sutrikimo sunkumo laipsnio pasiskirstymas pagal I ir N *GJB2*+ grupės klases

Ištirus genetinių pokyčių reikšmę izoliuoto klausos sutrikimo simetriškumui, taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p=1,1 \times 10^{-2}$) lyginant GEN+ ir GEN- grupes. Simetriškas klausos sutrikimas dažniau nustatytas GEN+ grupėje (20 lentelė, 23 pav.).

20 lentelė. KS simetriškumo pasiskirstymas GEN+ ir GEN- grupėse

	Simetriškas KS	Nesimetriškas (vienpusis) KS	Iš viso
GEN+	111	9	120
GEN-	66	16	82
Iš viso	177	25	202
Chi kvadrato kriterijus = 6,5; laisvės laipsnis = 1	$p=1,1 \times 10^{-2}$		
Empirinis efekto dydis $w=0,3$	Empirinė galia =0,99		

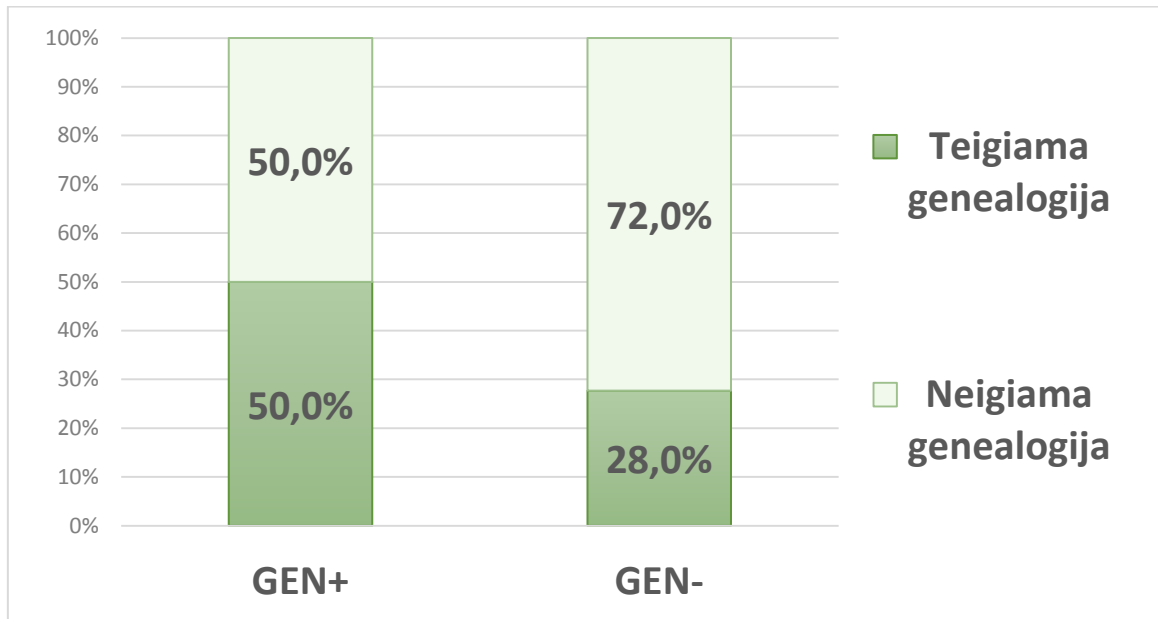


23 pav. KS simetriškumo pasiskirstymas GEN+ ir GEN– grupėse

Siekiant įvertinti izoliuoto klausos sutrikimo paveldimumo skirtumus tiriamųjų šeimose, analizuotos trijų kartų genealogijos. Jei šeimoje buvo daugiau sergančių asmenų, genealogija laikoma teigiama, jei tiriamasis vienintelis šeimoje turintis KS – genealogija neigiama. Palyginus GEN+ ir GEN– grupes, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas, $p=1,9 \times 10^{-3}$, rodantis, kad GEN+ grupėje teigiama genealogija dažnesnė, nei GEN– grupėje (21 lentelė, 24 pav.).

21 lentelė. Genealogijos tipų pasiskirstymas GEN+ ir GEN– pogrūpiuose

	Teigiama genealogija	Neigiama genealogija	Iš viso
GEN+	60	60	120
GEN–	23	59	82
Iš viso	83	119	202
Chi kvadrato kriterijus = 9,7 laisvės laipsnis = 1	$p=1,9 \times 10^{-3}$		
Empirinis efekto dydis $w=0,5$	Empirinė galia=0,99		



24 pav. Genealogijos tipų pasiskirstymas GEN+ ir GEN– pogrupiuose

Siekiant įvertinti tikimybę nustatyti paveldimą izoliuoto klausos sutrikimo priežastį, remiantis asmens klausos sutrikimo charakteristikomis buvo atlikta logistinės regresijos analizė.

Nustatytas tikimybių santykis OR (angl. *odds ratio*) 3,3 (95 % PI 1,8–6,0; $p=7,9 \times 10^{-5}$), rodantis, kad tiriamajam turint visišką arba sunkų klausos sutrikimą, tikimybė nustatyti paveldimą ligos priežastį yra 3,3 karto didesnė, nei turint vidutinį arba lengvą klausos sutrikimą (22 lentelė).

Apskaičiuota ir tikimybė nustatyti paveldimą ligos priežastį, remiantis asmens KS simetriškumu. Rezultatai rodo, kad 3,0 kartus (95 % PI 1,3–7,1; $p=1,4 \times 10^{-2}$) didesnė tikimybė nustatyti ligos priežastį, jei asmens KS simetriškas, palyginti su nesimetrišku (22 lentelė).

Esant teigiamai genealogijai (šeimoje yra daugiau nei vienas sergantis asmuo), tikimybė nustatyti genetinę KS priežastį 2,6 karto didesnė (95 % PI 1,4–4,7); $p=2,1 \times 10^{-3}$) (22 lentelė).

22 lentelė. Logistinės regresijos analizės rezultatai izoliuoto KS pogrupyje

Klausos sutrikimo požymis	OR (95 % PI)	p	Empirinė galia
Visiškas / sunkus KS			
<i>vs</i>	3,3 (1,8–6,0)	$7,9 \times 10^{-5}$	1,0
Vidutinis / lengvas KS			
Simetriškas KS			
<i>vs</i>	3,0 (1,3–7,1)	$1,4 \times 10^{-2}$	0,99
Nesimetriškas KS			
Teigiama šeimos genealogija			
<i>vs</i>	2,6 (1,4–4,7)	$2,1 \times 10^{-3}$	0,99
Neigiama šeimos genealogija			

Atlikus neigiamą genealogiją turinčių asmenų analizę, nustatyta, kad, diagnozavus visišką/sunkų klausos sutrikimą, 3,2 karto didesnė tikimybė (95 % PI 1,5–7,0; $p=4,0 \times 10^{-3}$) nustatyti paveldimą ligos priežastį nei vidutinio/lengvo klausos sutrikimo atveju. Simetriškumo atžvilgiu rezultatai tarp asmenų, kuriems nustatyta ir kuriems nenustatyta paveldima ligos priežastis, statistiškai reikšmingai nesiskyrė (23 lentelė).

23 lentelė. Logistinės regresijos analizės rezultatai izoliuoto KS pogrupyje (asmenys, turintys neigiamą genealogiją)

Klausos sutrikimo požymis	OR (95 % PI)	p	Empirinė galia
Visiškas / sunkus KS			
<i>vs</i>	3,2 (1,5–7,0)	$4,0 \times 10^{-3}$	0,99
Vidutinis / lengvas KS			
Simetriškas KS			
<i>vs</i>	1,9 (0,7–5,3)	$2,0 \times 10^{-1}$	0,82
Nesimetriškas KS			

Šio mokslinio tyrimo tikslas – įvertinti genetinių veiksnių reikšmę įgimto / ankstyvo klausos sutrikimo etiopatogenezėje tiriant Lietuvos populiacijos

pacientus. Tyrimo imtį sudarė 241-as asmuo, turintis įgimtą / ankstyvą klausos sutrikimą, tai sudaro apie 2,6 proc. Lietuvos populiacijos asmenų, turinčių šią patologiją (remiantis Lietuvos statistikos departamento duomenimis [259], šiuo metu mūsų šalyje gyvena 2,82 mln. gyventojų; SVEIDROS duomenimis, iki pilnametystės klausos sutrikimas išsivysto 3,26 iš 1000 asmenų, todėl Lietuvoje turėtų būti apie 9,2 tūkst. asmenų, turinčių įgimtą / ankstyvą klausos sutrikimą).

Genotipo ir fenotipo koreliacijos analizės rezultatai atskleidžia reikšmingą genetinių veiksnių (ypač *GJB2* geno patogeninių variantų) įtaką izoliuoto klausos sutrikimo etiopatogenezeje. Remiantis rezultatais, baltymą inaktyvuojantys *GJB2* geno variantai lemia sunkesnės formos patologiją, tai galima paaiškinti patogeninio pokyčio prigimtimi. Analogiškus rezultatus paskelbė ir kitų populiacijų mokslininkai [260]. Lietuvos populiacijos KS sergančių pacientų grupėje genetiniai pokyčiai dažniau lemia simetrišką klausos sutrikimą (OR 3,0; $p=0,0138$), sunkesnę ligos formą (OR 3,3; $p=7,9 \times 10^{-5}$), KS sergančių pacientų šeimose dažniau yra kitų asmenų, turinčių klausos sutrikimą, lyginant su tiriamaisiais, kuriems genetinė priežastis nenustatyta (OR 2,6; $p=0,00209$). Mokslinėse publikacijose pateikiami *GJB2+* ir *GJB2-* grupių palyginimai. Kai kuriose jų nustatyti statistiškai patikimi skirtumai tiriamųjų genealogijos [261], bet ne kitų ligos rodiklių atžvilgiu [262]. Gauti rezultatai bus naudingi prognozuojant genetinio tyrimo rezultatus diagnostinio Lietuvos populiacijos pacientų ištyrimo metu.

IV.2. Sindrominio klausos sutrikimo pogrupio charakterizavimas

Sindrominio klausos sutrikimo pogrupį sudarė 73 negiminingi tiriamieji asmenys, iš jų 23 (31,5 proc.) moteriškosios lyties ir 50 (68,5 proc.) vyriškosios lyties asmenų.

IV.2.1. Klinikinio ištyrimo rezultatai

Klinikinio ištyrimo metu lengvas, vidutinis, sunkus ir visiškas klausos sutrikimas nustatytas atitinkamai 11 (15,1 proc.), 30 (41,1 proc.), 13 (17,8 proc.) ir 19 (26,0 proc.) negiminingų asmenų (žr. 24 lentelę).

Simetrišką klausos sutrikimą turėjo 63 (86,3 proc.), o nesimetrišką arba vienpusį – 10 (13,7 proc.) negiminingų sindrominio klausos sutrikimo pogrupio asmenų (žr. 24 lentelę).

Išorinės / vidurinės / vidinės ausies displazija / hipoplazija / aplazija su arba be kitų organų vystymosi ydų nustatyta 23-ims (31,5 proc.) tiriamiesiems, turintiems sindrominį klausos sutrikimą, 50-iai (68,5 proc.) tiriamųjų nustatytas klausos sutrikimas be ausies vystymosi ydų su kitų organų vystymosi patologija / funkcijos sutrikimu (žr. 24 lentelę).

Atlikus negiminingų tiriamųjų, turinčių sindrominį klausos sutrikimą, genealogijos duomenų analizę, 20-yje (27,4 proc.) šeimų buvo asmenų, turinčių tokius pačius ar labai panašius ligos požymius, 53-ijų (72,6 proc.) negiminingų tiriamųjų genealogija buvo neigiama (žr. 4 lentelę ir 33 pav.).

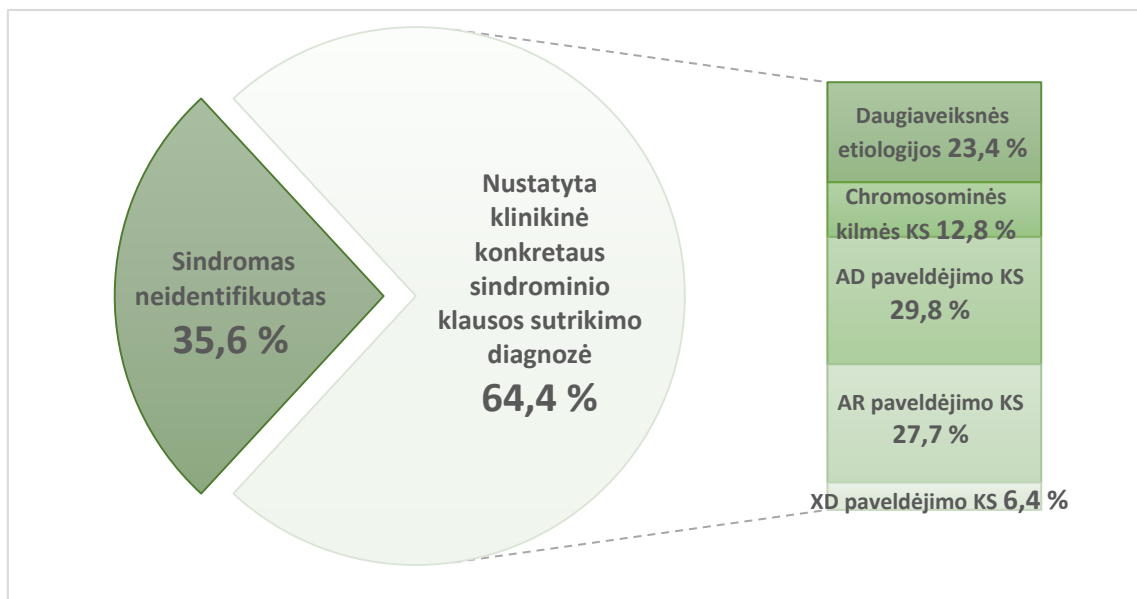
24 lentelė. Klinikiniai sindrominio KS pogrupio tiriamųjų duomenys

Klinikinis požymis	Tipas	Asmenų skaičius (proc.)
Sunkumo laipsnis	Lengvas	11 (15,1)
	Vidutinis	30 (41,1)
	Sunkus	13 (17,8)
	Visiškas	19 (26,0)
Simetriškumas	Simetriškas	63 (86,3)
	Nesimetriškas arba vienpusis	10 (13,7)
Ausies raidos anomalijos	Yra	23 (31,5)
	Nėra	50 (68,5)
Genealogija	Teigiama	20 (27,4)
	Neigiama	53 (72,6)

IV.2.2. Klausos sutrikimo etiologinė struktūra

Konkrečių sindromų / chromosominių persitvarkymų, kuriems būdingas KS, klinikinės diagnozės nustatytos 47-iems asmenims (64,4 proc.), 26-iems asmenims (35,6 proc.) sindrominį KS lemianti patologija nebuvo identifikuota.

Identifikuotų sindromų grupėje monogeninio KS klinikinė diagnozė nustatyta 30-iai (63,8 proc.) tiriamųjų, iš jų 14-ai asmenų (29,8 proc.) nustatytas AD paveldėjimo monogeninis sindrominis KS, 13-ai asmenų (27,7 proc.) – AR paveldėjimo sindrominis KS, 3-ims asmenims (6,5 proc.) – XD paveldėjimo sindrominis KS. Chromosominės kilmės KS identifikuotas 6-iems (12,8 proc.) tiriamiesiems, daugiaveiksnių / nepaveldimos etiologijos KS – 11-ai tiriamųjų (23,4 proc.) (25 pav. ir 25 lentelė).



25 pav. Lietuvos populiacijos sindrominio KS etiologinė struktūra (remiantis klinikinėmis diagnozėmis)

Genotipo ir fenotipo koreliacijų tyrimas, analizuojant viso sindrominio KS pogrupio asmenų duomenis, neturėtų biologinio pagrindo dėl plataus spektro patologijų, nulemtų didelio ligos heterogeniškumo. Atskirų patologijų grupių asmenų, kuriems genetiniais tyrimais patvirtintas sindrominis KS, skaičius per mažas statistiškai patikimiems rezultatams gauti, todėl ligos rodiklių priklausomybės nuo genetinių pokyčių statistinė analizė nebuvo atlikta.

25 lentelė. Klinikinės diagnozės sindrominio KS pogrupyje

KS tipas	Viso asmenų	Klinikinė diagnozė	TLK-10-AM kodas	Asmenų skaičius	Patogeniniai pokyčių genotipai	
Monogeninis	AD	14	<i>Treacher–Collins s.</i>	Q87.04	5	<i>TCOF1</i> (NM_001135243.1): c.[1A>G];[=] p.[(Met1?)];[(Met1=)] <i>TCOF1</i> (NM_001135243.1): c.[2103_2106delTGAG(;);4329_4331delGAA] <i>TCOF1</i> (NM_001135243.1): c.[4486_4488delAAG];[=], p.[(Lys1496del)];[(Lys1496=)] <i>TCOF1</i> (NM_001135243.1): c.[3527C>G];[=], p.[(Pro1176Arg)];[(Pro1176=)]
			<i>CHARGE s.</i>	Q87.86	4	<i>CHD7</i> (NM_017780.3):c.[5372A>G];[=], p.[(Asp1791Gly)];[(Asp1791=)]
			<i>Noonan s.</i>	Q87.1	2	-
			<i>Townes–Brocks s.</i>	Q87.89	1	-
			<i>Waardenburg s.</i>	E70.3	1	-
			Įgimti formavimosi ydų sindromai, susiję su pagreitėjusiu augimu	Q87.3	1	-
			AR	13	<i>Usher s.</i>	H35.5
<i>Pendred s.</i>	E07.1	3			<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.85G>C(;);1246A>C; p.[(Glu29Gln(;);Thr416Pro)]. <i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.304+2T>C(;);1149+1G>A <i>GJB2</i> (NM_004004.5) c. 313_326[del14];[=], p.	
Ichtiozės ir neišnešiotumo sindromas	-	1			<i>SLC27A4</i> (NM_005094.3): c.1528[C>T];[(C>T)], p.[(Arg510Cys(;);Arg510Cys)]	
<i>Rogers s.</i>	D64.3	1			<i>SLC19A2</i> (NM_006996.2): c. 205[C>T];[C>T], p.[(Val69Phe)];[(Val69Phe)] <i>GJB2</i> (NM_004004.5): c.[313_326del14];[=]	
<i>Jervell ir Lange–Nielsen s.</i>	I45.8	1			<i>KCNQ1</i> (NM_000218.2): c.[1111G>C];[?], p.[(Ala371Pro)];[?]	
Su X chr. susijęs	3	Alport s.	Q87.81	3	-	

25 lentelė (tęsinys). Klinikinės diagnozės sindrominio klausos sutrikimo pogrupyje

KS tipas	Viso asmenų	Klinikinė diagnozė	TLK-10-AM kodas	Asmenų skaičius	Patogeniniai pokyčiai
Chromosominis	6	<i>Jacobsen s.</i>	Q93.5	1	46,XY del (11)(q23.3)
		<i>Wolff-Hirschorn s.</i>	Q93.3	1	arr[GRCh37] 4p16.3(48283_3123776)x1
		Duplikacijos ir kiti sudėtingi persitvarkymai (duplikacijos su nesubalansuotomis translokacijomis)	Q92.5	4	arr[hg19] 15q11.2q13.1 (22,765,628-28,940,098)x3
					arr[hg19] 1q43q44(240,724,339-249,202,755)x3; 21q22.2q22.3(41,274,744-48,098,824)x1
					arr[GRCh37] 15q13.3 (32018731_32515681)x3
					arr[GRCh37] 3q26.1-qter (166,659,726-197,803,820)x3; 5p13.33-pter (1-33,683,173)x1
Daugiaveiksnės etiologijos / nepaveldimas	11	<i>Goldenhar s.</i>	Q87.08	9	-
		<i>VACTERL</i> asociacija	Q87.27	1	-
		Paviršinė siderozė	I69.0	1	-
Sindromas neidentifikuotas	26	Įgimtos dauginės formavimosi ydos, neklasifikuojamos kitur	Q89.7	26	-

Sindrominio klausos sutrikimo atveju genetinė konsultacija ir ištyrimas yra svarbūs ne tik nustatyti klinikinę ir (ar) molekulinę diagnozę, bet ir numatyti tolesnę ligos eigą bei prognozę. Šiuo metu žinoma apie 400 sindromų, kuriems būdingas klausos sutrikimas, tai sudaro apie 6 proc. visų šiuo metu žinomų retųjų ligų [3]. Akivaizdu, kad klausa yra paveldimų sindromų ir retųjų ligų „karštasis taškas“, galbūt dėl specifinės funkcijos, anatominės sandaros ir topografinės padėties, plaukuotųjų ląstelių kiekio ir gyvavimo trukmės. Klausa turi būti įvertinama kiekvienos daugiasistemės ligos atveju.

Sindromo atpažinimas priklauso nuo daugelio veiksnių, ypač svarbus daugiadisciplinis požiūris. Konsultuojančio gydytojo genetiko patirtis ir intuicija padeda nustatyti ar įtarti rečiausias patologijas, kitų gydytojų specialistų konsultacijos ir tyrimų rezultatai papildo arba paneigia pirminę diagnozę.

Genetiniai tyrimai (molekuliniai, citogenetiniai, biocheminiai) ne tik leidžia identifikuoti biologinę ligos priežastį, bet kartais ligos diagnozė (ypač labai retos patologijos atveju) pirmiausia nustatoma būtent genetiniais tyrimais. VŠĮ VUL SK MGC plataus spektro didelio pajėgumo genetiniai tyrimai (genų grupių tyrimai naujos kartos metodais, viso egzomo sekoskaita, vLGH, VNP-LGH) pradėti tik 2015–2016 m., todėl daugelio pacientų genetinis ištyrimas nėra užbaigtas ir molekuliniais tyrimais patvirtintos klinikinės diagnozės sudaro 24,7 proc. sindrominio KS pogrupio tiriamųjų.

Skirtingose pasaulio populiacijose AD paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas nustatomas 15–30 proc. diagnozuotų sindromų atveju, dominuoja *Treacher–Collins* s., *CHARGE* s., branchiootorenalinio s., *Waardenburg* s. diagnozės. AR paveldėjimo sindrominis klausos sutrikimas nustatomas 30–60 proc. identifikuotų sindromų, vyrauja *Usher* s., *Pendred* s., *Jervell* ir *Lange–Nielsen* s. Su X chromosoma susijusio paveldėjimo sindrominis KS diagnozuojamas 5–10 proc. atveju, dažniausiai *Alport* s. Daugiaveiksnės etiologijos (dažniausiai *Goldenhar* s.) nustatomas 5–15 proc. pacientų, kitos etiologijos (genomo įspaudų sutrikimai,

mitochondriopatijos) sindrominis klausos sutrikimas – 3–8 proc. sergančių asmenų [3].

Lyginant su mokslinių publikacijų duomenimis, Lietuvos populiacijos sindrominio klausos sutrikimo pogrupio diagnozuotų sindrominio KS atvejų grupės etiologinė struktūra panaši į kitų pasaulio populiacijų, panašus ir dažniausių patologijų spektras – AD paveldėjimo KS tiriamųjų grupėje vyrauja *Treacher–Collins*, *CHARGE* sindromai. AR paveldėjimo KS grupėje dažniausi *Usher* ir *Pendred* sindromai. Daugiaveiksnės etiologijos sindrominio KS grupėje daugiausia *Goldenhar* s. atvejų.

Nors lyginant pagrindinėmis kategorijomis etiologinė struktūra panaši į kitų populiacijų, mūsų tiriamųjų grupėje nustatyta labai retų (unikalių) sindrominio klausos sutrikimo priežasčių – *Rogers* s., ichtiozės ir neišnešiotumo s., chromosominės kilmės sindrominis KS dėl nesubalansuotos translokacijos tarp 1-os ir 21-os chromosomų ilgųjų pečių (žr. 25 lentelę).

IV.2.3. Retas (pirmas Lietuvoje) sindrominio klausos sutrikimo atvejis

Rogers (nuo tiamino priklausomos megaloblastinės anemijos (angl. *thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome* – TRMA s.) sindromas

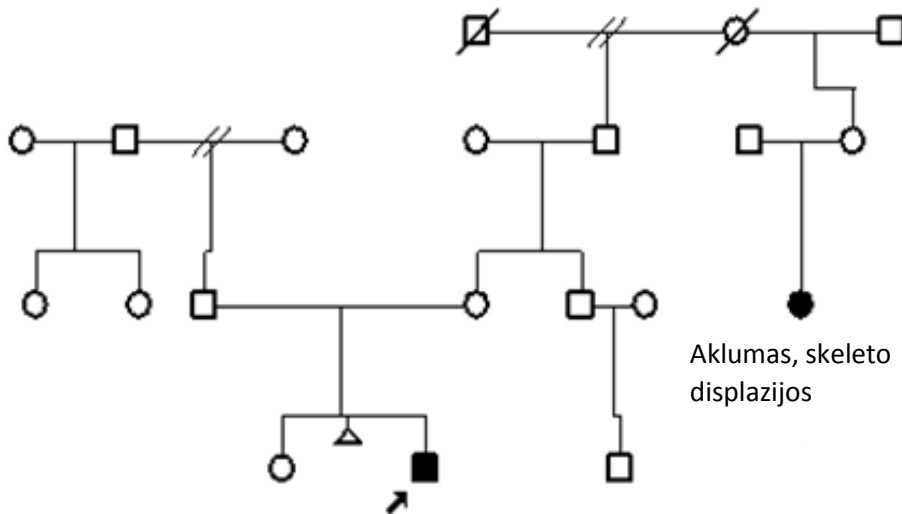
Nuo tiamino (B1 vitamino) priklausomos megaloblastinės anemijos sindromas (TRMA s.) [MIM 249270], vadinamas *Rogers* sindromu, pasaulyje aprašytas ~80-iai pacientų, dauguma sergančių asmenų gimę giminingose santuokose [263]. Ši patologija Europos šalių pacientams nustatyta tik keletą kartų [264, 265]. Ligai būdingi trys pagrindiniai požymiai – megaloblastinė anemija, ankstyvas kurtumas ir nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas [266, 267]. Kiti simptomai – pigmentinė retinopatija, žemas ūgis, trombocitopenija, įgimta širdies yda, traukuliai, ataksija, raidos atsilikimas ir kriptorchizmas – taip pat buvo aprašyti, tačiau ne visiems sergantiems asmenims, todėl giminingų santuokų atvejais sudėtinga atskirti juos nuo kitų paveldėtų ligų fenotipinės išraiškos [267].

Nors klinikinis ligos charakterizavimas buvo atliktas dar septintajame XX amžiaus dešimtmetyje [268], genas buvo lokalizuotas 1q23.2–23.3 srityje tik po trijų dešimtmečių [269]. *SLC19A2* genas, koduojantis didelio afiniškumo lėto pralaidumo tiamino nešiklį (THTR1) buvo identifikuotas ir apibūdintas funkciniu požiūriu [270, 271]. THTR1 dominuoja vidinės ausies ląstelėse, kasos salelių ląstelėse ir kaulų čiulpų hematopoetinėse ląstelėse. Dėl tokio nešiklio išsidėstymo pagrindiniai ligos požymiai vystosi esant tiamino stokai jautriausiuose organuose. Ląstelėse, kurios stokoja tiamino, vystosi medžiagų apykaitos sutrikimai, energijos stoka, DNR/RNR biosintezės sutrikimai, vyksta apoptozė [219, 272, 273].

Lietuvoje TRMA s. diagnozė pirmą kartą buvo nustatyta sindrominio KS pogrupio vyriškosios lyties asmeniui, kuriam šiuo metu 6,5 metų.

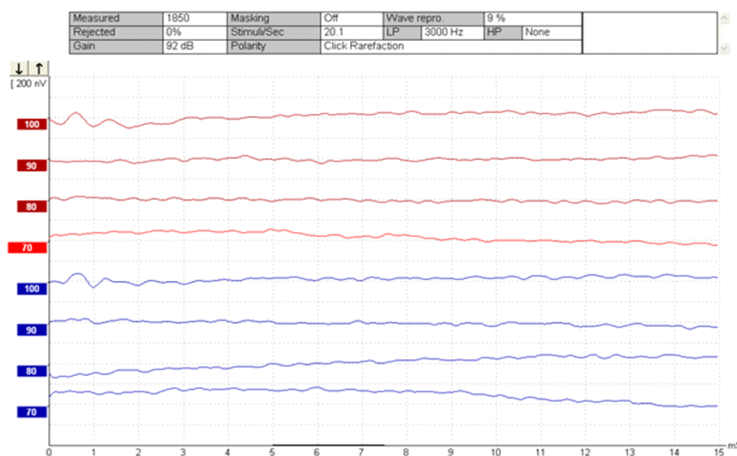
20-ies mėnesių amžiaus probandas, gimęs negiminingoje santuokoje, buvo nusiųstas konsultuoti specialistui genetikui dėl abipusio kurtumo. Nėštumo metu mamai nustatyta ketonurija. Nuo pirmųjų gyvenimo dienų vaikas buvo labai dirglus, 11-os mėnesių amžiaus diagnozuotas nuo insulino priklausomas cukrinis

diabetas, prasidėjo afektorespiraciniai spazmai. Abipusis klausos sutrikimas prasidėjo 7-ių mėn. amžiaus, patvirtintas 18-os mėn. Dvejų metų amžiaus nustatyta mažakraujystė, pradėjo blogėti regėjimas, atsirado fotofobija. Apžiūrint fenotipinių dismorfijos požymių nepastebėta. Motorinės raidos atsilikimo nebuvo, pastebėtas kalbinės raidos atsilikimas, dirglumas, stipraus pykčio epizodai. Genealogijos analizė neinformatyvi (26 pav.).



26 pav. Genealogija

Audiologinių tyrimų rezultatai. Remiantis tėvų žodžiais, vaikas reagavo į aplinkos garsus iki 7 mėn.



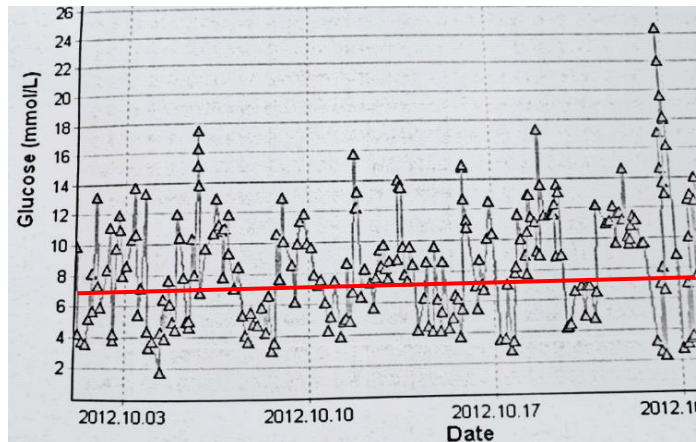
27 pav. ABR atsako nebuvo į 100 dB garsą

aplinkos garsus iki 7 mėn. Klausos sutrikimas buvo įtartas 18-os mėn. amžiaus, diagnozuotas abipusis kurtumas (27 pav.).

Taikyti klausos aparatai, tačiau poveikio nebuvo, todėl 21-ą mėn. atlikta dešinės ausies kochlearinės implantacijos

(KI) operacija. Per pirmuosius metus klausos slenksčiai abipus sumažėjo iki 30 dB, kalbos supratimas iš lėto gerėjo. 39-ą mėn. atlikta kairės ausies kochlearinė implantacija.

Nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas. 11-os mėnesių amžiaus įvyko sinkopė. Nustatyta hiperglikemija 13–18 mmol/l, sumažėjusi C peptido koncentracija – 0,27 nmol/l (norma 0,3–0,97 nmol/l). Insulino, antiGAD65, anti-IA2, transglutaminazės antikūnų nerasta, skydliaukės funkcijos sutrikimų

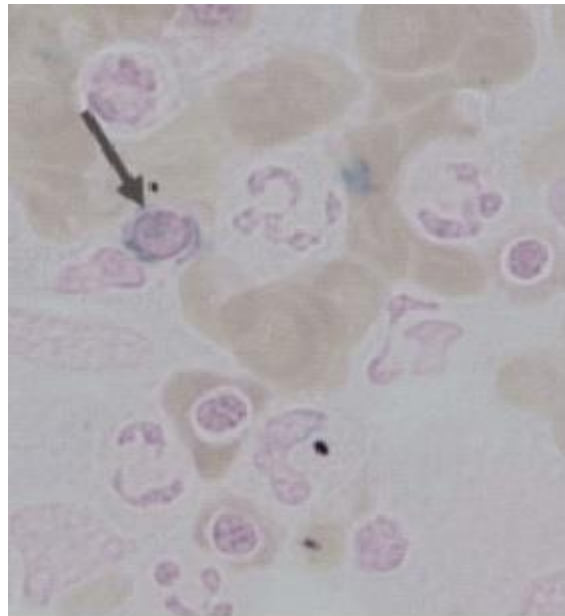


28 pav. Nepakankama glikemijos kontrolė. Raudona linija pažymėta viršutinė normalios gliukozės koncentracijos riba

neidentifikuota. Pradėtas gydymas insulinu 0,8–1 U/kg/d. Nepaisant gydymo insulino pompa, glikemijos kontrolė nebuvo pakankama – svyravo iki 14 mmol/l (28 pav.).

Hematologiniai požymiai.

Gydymui atspari lengvos eigos anemija diagnozuota dvejų metų amžiaus. Pacientas buvo stebimas, hospitalizuotas kaulų čiulpų aspiracijai. Nustatyta lengva normochrominė normocitinė anemija (RBC $3,48 \times 10^{12}/l$, Hb 98 g/l; MCV 85,6 fl, MCH 28,2 pg), nežymi neutropenija (WBC $5,74 \times 10^9/l$), trombocitų kiekis normalus (PLT $245 \times 10^9/l$). Biocheminiai kraujo tyrimai: normali folio r. koncentracija



29 pav. Kaulų čiulpų aspiratas. Rodykle pažymėtas žiedinis sideroblastas

26,14 pmol/l (norma 7–39), šiek tiek padidėjusi B12 vitamino koncentracija – 522 pmol/l (norma 127–517), padidėjusi feritino koncentracija – 190 µg/ml (norma 15–150). Kaulų čiulpų aspirate – normali granulopoezė, megakariocitų kiekis ir morfologija nepakitę. Eritropoezė labai aktyvi, megaloblastinė: eritroblastai sudarė 42 proc. (normalus eritroblastų:megakariocitų santykis 1: 2-4), rasta žiedinių sideroblastų (29 pav.). Nustatyta mielodisplastinio sindromo diagnozė.

Oftalmologiniai požymiai. 2,5 m. amžiaus pastebėta pablogėjusi vaiko rega ir fotofobija. Ištyrus akių dugną, nustatyta abipusė makulopatija.

Staigus būklės pablogėjimas, susijęs su virusine infekcija. 2 m. 10 mėn. amžiaus probandas susirgo ūmine virusine kvėpavimo takų infekcija. Atsirado hemoraginis odos bėrimas. Ambulatoriškai atlikus bendrą kraujo tyrimą, nustatyta mažakraujystė ir sunki trombocitopenija (Hb – 84 g/l, PLT – $25 \times 10^9/l$). Vaikas buvo hospitalizuotas, nustatyta sunki normochrominė anemija (RBC $2,52 \times 10^{12}/l$; Hb 74 g/l; MCV 86 fl, MCH 29pg) su ribine neutropenija (WBC $4,72 \times 10^9/l$) ir sunki trombocitopenija (PTL $3 \times 10^9/l$). Taip pat nustatyta hiperglikemija (18–20 mmol/l). Tuo metu buvo įtartas TRMA s. ir pradėtas gydymas tiaminu 100 mg/d.

Sėkmingas gydymas farmakologinėmis tiamino dozėmis. Praėjus keturioms dienoms nuo gydymo pradžios, labai pagerėjo hematopoezė (Hb – 94 g/l, PLT – $63 \times 10^9/l$). Po 1,5 mėnesių nustatytas normalus eritrocitų kiekis kraujyje, išsivystė trombocitozė (RBC – $4,02 \times 10^{12}/l$, Hb – 123 g/l, WBC – $8,1 \times 10^9/l$, PLT – $419 \times 10^9/l$).

Glikemijos kontrolė taip pat pagerėjo – jos svyravimo ribos 4–9 mmol/l, 87 proc. laiko registruojama normoglikemija, HbA1c 5,1 proc. (norma <7,5 proc.), insulino poreikis sumažėjo iki 0,4 VV/kg/d.

Audiologinio įvertinimo rezultatai praėjus 3 mėn. (15 mėn. po KI): CAP (angl. *Categories of Auditory Performance*) įvertis – 5. Berniukas suprato dažniausias frazes be skaitymo iš lūpų, lengviau vyko darbas su surdopedagogu.

Gydymo pakeitimas sulbutiaminu. Nors gydant tiaminu buvo pasiekta gera glikemijos ir hematopoezės kontrolė, po kelių mėnesių pacientui išsivystė alerginė

reakcija, pasireiškusi niežinčiais odos bėrimais, pleiskanų luobu galvos odoje. Be to, gydant tiaminu, kalbinė raida buvo nepakankama, nustatytas psichinės raidos sutrikimas.

Atlikus išsamią medicininės literatūros analizę, gydymas tiaminu buvo pakeistas į gydymą sintetiniu tiamino analogu – sulbutiaminu. Hemoglobino koncentracija laikinai sumažėjo iki 110 g/l, bet per pirmą mėnesį grįžo į normą. Kraujo gliukozės koncentracija išliko stabili, kiek didėjo fiziologinio streso metu. Alerginė reakcija išnyko, todėl šis gydymas pacientui yra tinkamesnis. Nepaisant sėkmingo gydymo pakeitimo, numatyto efekto paciento raidai ir psichologinei būklei nėra – išlieka emociniai iškrūviai, agresyvaus elgesio epizodai, higienos įgūdžių stoka. Oftalmologiniai ligos požymiai taip pat neišnyksta. Praėjus ketveriems metams po KI, kalbos supratimas tyloje labai geras (90 proc.), tačiau kalbos vystymasis vėluoja.

Biocheminiai tyrimai. 1 m. 9 mėn. amžiaus vaiko laktato koncentracija kraujo plazmoje buvo 2,1 mmol/l, kraujo plazmos aminorūgščių tyrime – ribinis šakotųjų aminorūgščių koncentracijų padidėjimas.

Genetiniai tyrimai. Nustačius klinikinę TRMA s. diagnozę, *Sanger* sekoskaitos būdu buvo nusekvenuota *SLC19A2* geno koduojanti seka ir nustatytas naujas homozigotinis variantas c. 205G>T; p.(Val69Phe).

SLC19A2 geno antro egzono pirmoje pozicijoje G pakitęs į T. Šis variantas nėra aprašytas mokslinėje literatūroje, jo nėra duomenų bazėje *Human Gene Mutation Database*. Pokytis buvo įvertintas atlikus *in silico* analizę: **SIFT** įvertis 0,003 (patogeninis), **Polyphen2** įvertis 0,998 (galimai patogeninis) [274]], **Mutation taster2** bioinformacinis įrankis vertino variantą kaip patogeninį. Tėvams ir seseriai nustatyta varianto nešiotojų būklė.

Nepaisant būdingų ligos požymių triados (megaloblastinės mažakraujystės, kurtumo, cukrinio diabeto) TRMA sindromo diagnozavimas nėra paprastas netgi giminingoje santuokoje. Neretai liga pradedama įtarti tik antrame gyvenimo dešimtmetyje po ilgai trunkančių ir varginančių bandymų TRMA sindromą gydyti

simptomiškai, kaip tarpusavyje nesusijusių patologijų rinkinį [267]. Šios trijų pagrindinių organų patologijos iš tiesų atrodo kaip skirtingos ligos, turinčios nesusijusią etiologiją ir vystymąsi, todėl tik daugiadisciplinis požiūris gali padėti ligą diagnozuoti anksti. TRMA s. pasižymi progresavimu, simptomai dažniausiai nėra įgimti ir paprastai vystosi vienas po kito per ilgą laikotarpį [267]. Be to, sergantiems asmenims nustatoma nemažai papildomų patologijų, todėl sudėtinga atskirti šią ligą nuo kitų, išsivysčiusių dėl santuokos giminingumo. Negana to, TRMA s. buvo diagnozuotas ir pacientams, neturintiems vieno iš trijų klasikinės triados požymių [275].

Šiam pacientui patologija buvo nustatyta, kai vaikui sukako 2 m. 10 mėn., nors pirmieji požymiai (kurtumas, cukrinis diabetas) prasidėjo per pirmuosius jo gyvenimo metus. Diagnozuoti ligą užtruko dėl kelių priežasčių – (1) itin reta liga, ypač Europoje, kur giminingos santuokos nėra dažnos; (2) skirtinga simptomų pradžia; (3) platus simptomų spektras, nevisiškas požymių penetrantiškumas. Europoje publikuoti tik keli TRMA s. atvejai, šis pacientas pirmasis Lietuvoje, kuriam nustatyta TRMA s. diagnozė.

Klinikinė įvairovė bei nevisiškas penetrantiškumas yra svarbios ligos ypatybės, lemiančios TRMA s. diagnozavimo sudėtingumą. Bet kurie du iš trijų klasikinės triados požymių turėtų kelti TRMA s. įtarimą. Įvairių sričių specialistų bendradarbiavimas buvo svarbiausias veiksnys nustatyti mūsų paciento diagnozę ir pradėti gydymą būklei pablogėjus. Esminė buvo genetinė konsultacija, kurios metu atliekama visų duomenų analizė, ieškoma informacijos duomenų bazėse, įtartas TRMA sindromas. Išsivysčiusi progresuojanti sunki anemija ir trombocitopenija, kaulų čiulpų aspirate nustatyti žiediniai sideroblastai, nepaisant normalios folio rūgšties ir B12 vitamino koncentracijos serume, cukrinis diabetas ir kurtumas buvo pagrindiniai tikslios diagnozės požymiai.

Diagnozuojant TRMA s. svarbus išsamus klinikinis ir laboratorinis ištyrimas. Ligos požymiai iš dalies sutampa su *Wolfram* s. (*DIDMOAD*) ir mitochondriopatijomis (*Kearns–Sayre* s., *Pearson* s.).

TRMA s. dažniausiai nustatomas asmenims, gimusiems giminingsose santuokose, beveik visiems identifikuojami nauji unikalūs patogeniniai variantai, demonstruojantys įkūrėjo efektą toje populiacijoje. Nuo *SLC19A2* geno atradimo nustatyta daugiau kaip 30 skirtingų patogeninių variantų, daugelis jų homozigotiniai dėl giminų santuokų, etninės izoliacijos arba bendro tolumo protėvio [267, 276, 277]. Dažniausiai atvejų patogeniniai variantai lemia priešlaikinio baigmės kodono susidarymą, tik keli iš jų keičia baltymo aminorūgštį [265, 267]. Mūsų pacientui nustatytas *SLC19A2* geno antro egzono pirmos pozicijos homozigotinis variantas, kurio pasekmės baltymui gali būti dvejopos: (1) konservatyvios aminorūgšties Val69 pakeitimas Phe THTR1 baltymo ekstraceliulinėje kilpoje tarp pirmo ir antro membraninių domenų; (2) sukirpimo akceptoriaus praradimas ir baltymo sutrumpėjimas (arba iRNR suardymas dėl priešlaikinės baigmės kodono). *In silico* analizės duomenimis, variantas yra patogeninis. Šie duomenys sutampa su rezultatais mokslinio tyrimo, kuriame analizuotas *Lactococcus lactis* ThiT baltymo S komponentas ir daroma prielaida, kad ekstraceliulinė baltymo kilpa 1-2 atlieka tiamino prisijungimo vietos „dangčio“ funkciją, leidžiančio ar trukdančio substratui iš ekstraceliulinės terpės jungtis prie membranos baltymo [278]. Nustatytasis variantas ateityje gali būti naudingas funkciniam tiamino apykaitos tyrimams. *SLC19A2* geno sekoskaitos rezultatai suderinami su ankstyva ligos pradžia. Variantas nebuvo aprašytas mokslinėje literatūroje, jis, tikėtina, atsirado tolumo bendro protėvio genome. Tėvų giminystės nebuvimas galbūt rodo didesnę varianto nešiotojų dažnį mūsų populiacijoje ir didesnę TRMA s. tikimybę Lietuvos populiacijoje ateityje.

Interpretuoti laboratorinių tyrimų rezultatus taip pat sudėtinga. Nėra ligai patognomoninių rutininių laboratorinių tyrimų rezultatų, netgi serumo tiamino koncentracija būna normos ribose. Gydimui atspari megaloblastinė anemija, nepaisant normalios folio r. ir vitamino B12 koncentracijos serume turėtų kelti TRMA s. diagnozės įtarimą. Nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas be specifinių antikūnų prieš insuliną, antiGAD65, antiIA2 ir transglutaminazę kartu

su kurtumu taip pat svarbūs požymiai ligai įtarti. Kadangi tiaminas yra daugelio svarbių fermentų, dalyvaujančių angliavandenių ir aminorūgščių apykaitoje, net nežymūs biocheminių genetinių tyrimų pokyčiai (pvz. ribinis laktato, šakotųjų amino rūgščių ir organinių rūgščių padidėjimas, atspindintis šakotųjų α ketorūgščių dehidrogenazės, α -ketogliutarato dehidrogenazės ir piruvato dehidrogenazės komplekso stoka) turi būti pastebėti ir tinkamai įvertinti.

Nepaisant didėjančių instrumentinės diagnostikos galimybių, kol kas TRMA s. diagnozės nustatymas priklauso nuo išsamaus klinikinio ištyrimo. Diferencijuoti nuo kitų ligų padeda empirinis gydymas farmakologinėmis tiamino dozėmis. Kasdienis gydymas tiaminu sėkmingai taikomas beveik visiems TRMA s. pacientams, tokiu būdu pagerinama hematopoezė ir glikemijos kontrolė, kai kuriais atvejais net išsaugoma klausa. Pacientų sveikatos pagerėjimas siejamas su aktyvesne tiamino pernaša per membraną, kuris vyksta kitais būdais, esant didelei tiamino koncentracijai kraujo plazmoje. Iki šiol tik dvi tiamino formos – tiamino hidrochloridas ir S-benzoiltiamino O-monofosfatas (benfotiaminas) yra aprašytos TRMA s. gydyti. Gydymas sintetiniu tiamino analogo O-izobutiriltiamino disulfidu – sulbutiaminu (*SbTh*) mokslinėje literatūroje nėra publikuotas.

SbTh yra riebaluose tirpus tiamino junginys, pasižymintis puikiu patekimu į organizmą, gerai praeina kraujo-smegenų barjerą. Skirtingai nuo kitų tiamino formų, *SbTh* žymiai padidina laisvo tiamino ir tiamino fosfato kiekį ląstelėje [279].

SbTh reguliuoja daugelio neurotransmisijos sistemų sinapsinę pernašą ir yra naudojamas kaip psichotropinis medikamentas – nustatyta, kad *SbTh* pagerina graužikų atmintį ir kognityvinius gebėjimus, taipogi turi teigiamą poveikį žmonėms astenijos atveju. Išlieka neaišku, ar nepakankamas sulbutiamino poveikis paciento psichinei sveikatai buvo dėl pavėluotos diagnozės, ar papildomos patologijos.

Retinopatijos požymių buvimas, nepaisant adekvataus gydymo, galėtų būti paaiškintas aukštu medžiagų apykaitos aktyvumu tinklainėje ir dideliu tiamino

poreikiu, kurio negali patenkinti kitų tiamino nešiklių (SLC19A3) suaktyvėjimas ar pasyvi difuzija per ląstelės membraną [280].

Sergančio asmens fizinės sveikatos prognozė yra gera. Palaikant kraujodarą ir gliukozės koncentraciją kraujo plazmoje, sergančio asmens gyvenimo trukmė neturėtų trumpėti.

Nepaisant TRMA s. retumo, sėkmingo gydymo galimybė įpareigoja atpažinti ją kiek įmanoma anksčiau.

IV.3. Genetinio tyrimo rezultatai sveikų lietuvių populiacijos asmenų grupėje (LITGEN)

Etninę lietuvių populiacijos grupę sudarė 98 negiminingi sveiki asmenys (49 moterys ir 49 vyrai). Analizuojant tiriamųjų viso egzomo sekoskaitos duomenis, nustatyti patogeniniai variantai, lemiantys autosominio recesyvaus ir su X chromosoma susijusio recesyvaus paveldėjimo KS.

Atlikta binominio tiksliojo kriterijaus galios *post hoc* analizė – darant prielaidą apie vidutinio efekto poveikį 98 asmenų grupėje, apskaičiuota galia viršija 0,8.

IV.3.1. AR paveldėjimo KS genų tyrimo rezultatai

Išanalizavus 83-ųjų AR paveldėjimo KS genų (sąrašas pateikiamas 9 priede) sekoskaitos rezultatus, remiantis ACMG rekomendacijomis, LITGEN tiriamųjų grupėje nustatyta 16 patogeninių / galimai patogeninių variantų (26 lentelė). Analizuotų genų koduojančioje sekoje nustatyti dar 144-i nauji arba anksčiau identifikuoti neaiškios klinikinės reikšmės VNV ir 9-i intarpai ar iškritos.

LITGEN grupėje *GJB2* (NM_004004.5) geno patogeniniai pokyčiai sudaro didžiausią KS lemiančių genetinių priežasčių dalį. Heterozigotinis *GJB2* geno patogeninių variantų genotipas nustatytas septyniems LITGEN grupės asmenims (7,14 proc.). Šie rezultatai atskleidžia, kad lietuvių populiacijoje ~1 iš 14-os sveikų asmenų yra patogeninio *GJB2* geno varianto nešiotojas (26 lentelė).

Trims sveikiems lietuvių populiacijos asmenims nustatytas *GJB2* patogeninis variantas c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622), jo nešiotųjų dažnis lietuvių populiacijos grupėje 3,1 proc. Heterozigotinių variantų c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) ir c.35delG, p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939) nešiotųjų dažniai lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje sudaro atitinkamai 2,0 proc. ir 1,0 proc. Šie trys variantai buvo identifikuoti ir DEAFGEN pacientų grupėje.

Naujas anksčiau neaprašytas patogeninis baltymą inaktyvuojantis variantas c.206delT p.(Phe69Serfs*13) buvo nustatytas vienam LITGEN tiriamajam (genotipo dažnis 1,0 proc.).

Patogeninio pokyčio c.313_326del14, p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253) identifikavimas dviem iš 98-ių LITGEN grupės asmenų (nešiotųjų dažnis 2,0 proc. tirtoje grupėje) patvirtina ankstesnę prielaidą apie didelį šio *GJB2* geno varianto nešiotųjų dažnį lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje. Šią nuomonę sustiprina ir tai, kad heterozigotinis pokytis nustatytas ir dviem sindrominio KS pogrupio asmenims, kuriems vėliau molekuliniais genetinėmis tyrimais patvirtintos *Usher s.* ir *Rogers s.* diagnozės. Šio pokyčio nešiotųjų dažnis $4,9 \times 10^{-4}$, nustatytas NHLBI Egzomo sekoskaitos projekte (angl. *Exome Sequencing Project*) Amerikos baltaodžių grupėje, rodo ypač retą varianto dažnį tarp sveikų asmenų [281].

SLC26A4 (NM_000441.1) geno patogeniniai variantai yra antroje vietoje pagal dažnį LITGEN grupėje. Šio geno izoliuotą / sindrominį KS lemiantys heterozigotiniai pokyčiai c.1003T>C, p.(Phe335Leu) (rs111033212) ir c.1963A>G, p.(Ile655Val) (rs397516424) nustatyti po vieną dviem sveikiems asmenims (2,0 proc.). Antrasis iš variantų buvo identifikuotas ir DEAFGEN grupėje.

USH2A (NM_206933.2) geno patogeniniai variantai siejami su lengvos formos (vėlyva pradžia, lengvesnė ir lėtesnė eiga, nėra vestibulinės funkcijos sutrikimo) dažniausiu II tipo *Usher s.* Variantas c.10073G>A p.(Cys3358Tyr) buvo identifikuotas dviem LITGEN tiriamiesiems (2,0 proc.), o kitose pasaulio populiacijose šio pokyčio alelio dažnis daug mažesnis arba visai nenustatytas

(*1000genomes_all*: ND; *ExAC_ALL*: 0,0003). Toks dažnių skirtumas gali būti laikomas lietuvių populiacijos ypatybe, kurią lemia pokyčio kilmė mūsų protėvių genome arba kitos priežastys (pvz., populiacijų asimiliacija, migracija).

DEAFGEN grupėje *USH2A* geno patogeninis homozigotinis variantas buvo identifikuotas vienam *Usher* s. sergančiam asmeniui. II tipo *Usher* s. gali būti rečiau atpažįstamas specialistų galbūt dėl vėlyvos ir lengvos klausos sutrikimo formos – pacientams (ypač vyresnio amžiaus) dažniau nustatomas izoliuotas pigmentinis retinitas, o nedidelis klausos sutrikimas neretai nesusiejamas su akių patologija.

ATP6V1B1 (NM_001692) ir *TMPRSS3* (NM_032405.1) genų heterozigotiniai patogeniniai variantai nustatyti po 1,0 proc. tiriamųjų. *ATP6V1B1* genas siejamas su AR paveldėjimo inkstų tubuline acidoze ir kurtumu, o *TMPRSS3* genas – su izoliuotu AR klausos sutrikimu. Abu pokyčiai ypač reti kitose populiacijose, mūsų populiacijose identifikuota po vieną tiriamąjį, todėl sudėtinga spręsti apie jų dažnių skirtumus, lyginant lietuvių ir kitas populiacijas.

Be jau aprašytų patogeninių variantų, LITGEN grupėje nustatyti ir galimai patogeniniai *BDP1*, *MYO15A*, *OTOF*, *OTOG*, *COL4A4*, *HSD17B4* ir *PNPT1* genų pokyčiai. Dalis genų (*BDP1*, *MYO15A*, *OTOF*, *OTOG*) siejami su izoliuotu KS, kiti (*COL4A4* ir *HSD17B4*) – su sindrominiu KS, *PNPT1* geno pokyčiai lemia tiek izoliuotą, tiek sindrominį KS. LITGEN grupėje nustatyti šių genų pokyčiai neaprašyti mokslinėje literatūroje, nebuvo nustatyti kitose populiacijose sveikų arba sergančių asmenų grupėse, tačiau jų savybės (sukelia priešlaikinės baigmės kodoną arba pakeičia iRNR sukirpimo vietą) leidžia priskirti juos galimai patogeninių variantų grupei. *OTOF* (NM_194248.2): c.5474C>T, p.(Pro1825Leu); (NM_194323): c.3173C>T, p.(Pro1058Leu) skiriasi nuo kitų naujų variantų tuo, kad keičia aminorūgštį, o ne nutraukia baltymo seką. Šis variantas priskirtas galimai patogeniniam dėl to, kad trumpesniame *OTOF* geno transkripte NM_194323 kitas pokytis tame pačiame kodone c.3172C>G, p.(Pro1058Ala) yra patogeninis (*DVD*), todėl tikėtina, kad 1058-oje pozicijoje esanti aminorūgštis yra svarbi baltymo funkcijai.

SLC26A4, *MYO15A* ir *TMPRSS3* genų pokyčiai buvo identifikuoti ir DEAFGEN sergančių pacientų grupėje. Šių genų patogeniniai variantai sveikų ir sergančių asmenų grupėse atspindi didesnę jų dažnį lietuvių populiacijoje. *SLC26A4*, *MYO15A*, *TMPRSS3*, *OTOF*, *USH2A*, *COL4A4* ir *ATP6V1B1* genų pokyčiai dažni ir kitų tautų sergančių asmenų grupėse, o *BDP1*, *HSD17B4* ir *PNPT1* genų patogeniniai variantai pasaulyje identifikuoti pavieniems pacientams.

IV.3.2. XR paveldėjimo KS genų tyrimo rezultatai

Ištyrus 4-ių XR paveldėjimo KS genų (sąrašas pateikiamas 10 priede) sekoskaitos rezultatus remiantis ACMG rekomendacijomis, patogeninių / galimai patogeninių variantų LITGEN tiriamųjų asmenų grupėje nenustatyta. Analizuotų genų koduojančioje sekoje nustatyti 1-as anksčiau identifikuotas neaiškios klinikinės reikšmės VNV.

XR paveldimas klausos sutrikimas nėra dažnas visame pasaulyje (iki 1 proc.). Šiuo metu žinomi keturi genai, kurių pokyčiai lemia izoliuotą arba sindrominį XR paveldėjimo KS, jų koduojančios sekos analizės rezultatai LITGEN asmenų grupėje rodo mažą patogeninių variantų dažnį mūsų populiacijoje.

Šie rezultatai sutampa su anksčiau publikuotais kitų populiacijų tyrimais, stiprindami įrodymus, kad XR paveldimas klausos sutrikimas yra retas visame pasaulyje [282].

26 lentelė. AR paveldėjimo KS genų patogeninių variantų alelių dažniai ir nešiotojų dažniai lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje

Nr	Variantas (identifikacinis Nr.)	Nešiotojų dažnis, proc.	Alelio dažnis kitose populiacijose	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais	Varianto tipas (HGMD ID)	Patologija, siejama su genu (MIM)
1	<i>GJB2</i> (NM_004004.5): c.101T>C, p.(Met34Thr) (rs35887622)	3,1	1000genomes _all: 0,0060 ExAC_ALL: 0,0085	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0.027) <i>Polyphen-2</i> nepatogeninis (įvertis 0.083) <i>MutationTaster2</i> patogeninis	Patogeninis (HGMD ID CM970679)	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (220290) · Izoliuotas AD paveldėjimo klausos sutrikimas (601544) · <i>Bart–Pumphrey</i> s. (149200) · Palmoplantarinė keratoderma (148350) · Ichtiozė su KS (602540) · <i>Vohwinkel</i> s. (124500) · KID s. (148210)
2	<i>GJB2</i> (NM_004004.5): c.313_326del14 p.(Lys105Glyfs*5) (rs111033253)	2,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: 0,00010	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Patogeninis (HGMD ID CD982677)	
3	<i>GJB2</i> (NM_004004.5): c.35delG p.(Gly12Valfs*2) (rs80338939)	1,0	1000genomes _all: 0,0024 ExAC_ALL: 0,0060	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Patogeninis (HGMD ID CD972240)	
4	<i>GJB2</i> (NM_004004.5): c.206delT p.(Phe69Serfs*13)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis	
5	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1003T>C, p.(Phe335Leu) (rs111033212)	1,0	1000genomes _all: 0,000799 ExAC_ALL: 0,0009	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,727) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 0,997) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus regionas (įvertis 1,061) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,62)	Patogeninis (HGMD ID CM011490)	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas su išsiplėtusiu vandentiekio latakų (600791) · AR paveldėjimo <i>Pendred</i> s. (274600)
6	<i>SLC26A4</i> (NM_000441.1): c.1963A>G, p.(Ile655Val) (rs397516424)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: 0,000033	<i>SIFT</i> nepatogeninis (įvertis 0,56) <i>Polyphen-2</i> nepatogeninis (įvertis 0,034) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0) <i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>PhyloP</i> konservatyvus (įvertis 2,183) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,74)	Patogeninis (HGMD ID CM109556)	
7	<i>USH2A</i> (NM_206933.2): c.10073G>A p.(Cys3358Tyr) (rs148660051)	2,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: 0,0003	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,0) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 1,0) <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 0,000141) <i>MutationTaster2</i> patogeninis (įvertis 1,0) <i>PhyloP</i> nekonservatyvus (įvertis 0,935) <i>GERP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 5,76)	Patogeninis (HGMD ID CM104136)	· Izoliuotas AR paveldėjimo pigmentinis retinitas 39 (613809); · AR paveldėjimo <i>Usher</i> s., 2A tipas) (276901)

26 lentelė (tęsinys). AR paveldėjimo KS genų patogeninių variantų alelių dažniai ir nešiotų dažniai lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje

Nr	Variantas (identifikacinis Nr.)	Nešiotų dažnis, proc.	Alelio dažnis kitose populiacijose	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais	Varianto tipas (HGMD ID)	Patologija, siejama su genu (MIM)
8	ATP6V1B1 (NM_001692): c.1149dupC, p.(Tyr383fs)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: 0,0002	MutationTaster2 patogeninis	Patogeninis (HGMD ID CI991978)	· AR paveldėjimo inkstų tubulinė acidozė su kurtumu (267300)
9	TMPRSS3 (NM_024022.2): c.413C>A, p.(Ala138Glu) (rs147231991)	1,0	1000genomes _all: 0,000599 ExAC_ALL: 0,0008	SIFT patogeninis (įvertis 0,003) Polyphen-2 galimai patogeninis (įvertis 0,973) LRT neutralus (įvertis 0,004687) MutationTaster2 patogeninis (įvertis 0,99) PhyloP nekonservatyvus regionas (įvertis 0,998) GERP++ konservatyvus regionas (įvertis 4,03)	Patogeninis (HGMD ID CM054159)	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (601072)
10	PNPT1 (NM_033109.4): c.977-1G>A	2,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	MutationTaster2 patogeninis	Galimai patogeninis	· Sudėtinė oksidacinio fosforilinimo stoka 13 (614932); · Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (614934)
11	BDPI (NM_018429.2): c.1114C>T, p.(Gln372Ter)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	MutationTaster2 patogeninis	Galimai patogeninis	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas
12	COL4A4 (NM_000092.4): c.4775G>A p.(Trp1592Ter)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	MutationTaster2 patogeninis	Galimai patogeninis	· AR paveldėjimo <i>Alport</i> s. (203780)

26 lentelė (tęsinys). AR paveldėjimo KS genų patogeninių variantų alelių dažniai ir nešiotjų dažniai lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje

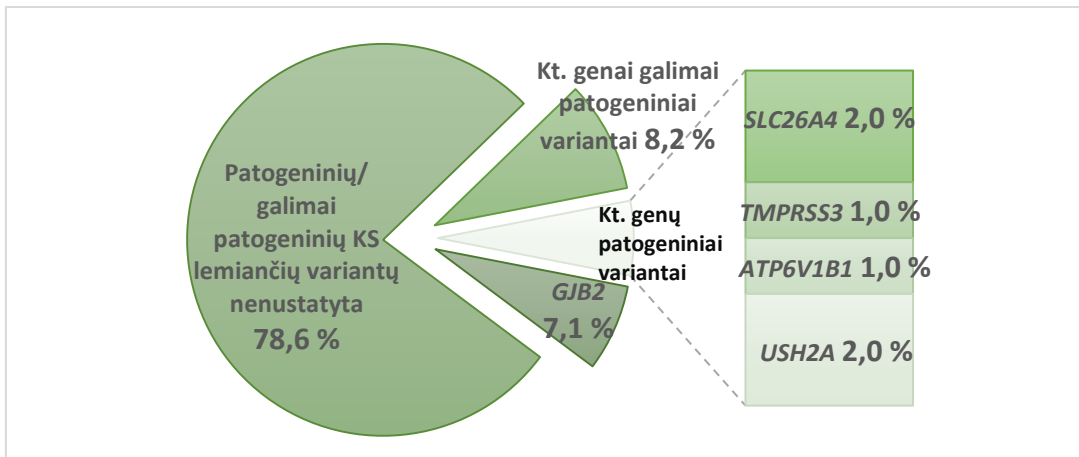
Nr	Variantas (identifikacinis Nr.)	Nešiotjų dažnis, proc.	Alelio dažnis kitose populiacijose	Įvertinimas <i>in silico</i> bioinformaciniais įrankiais	Varianto tipas	Patologija, siejama su genu (MIM)
13	<i>HSD17B4</i> (NM_001199291.2): c.424+1G>A	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>Human splicing finder</i> patogeninis	Galimai patogeninis	· AR paveldėjimo D-bifunkcinio baltymo stoka (261515); AR paveldėjimo <i>Perrault</i> s. (233400)
14	<i>MYO15A</i> (NM_016239.3): c.7978C>T, p.(Arg2660Ter)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (600316)
15	<i>OTOF</i> (NM_194248.2): c.5474C>T, p.(Pro1825Leu)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	<i>SIFT</i> patogeninis (įvertis 0,000) <i>Polyphen-2</i> galimai patogeninis (įvertis 1,00) <i>MutationTaster2</i> patogeninis	Galimai patogeninis	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (601071); · AR paveldėjimo klausos neuropatija (601071)
16	<i>OTOG</i> (NM_001277269.1) c.3457C>T, p.(Arg1153Ter)	1,0	1000genomes _all: ND ExAC_ALL: ND	<i>MutationTaster2</i> patogeninis <i>LRT</i> patogeninis (įvertis 1×10^{-6}) <i>PhyloP</i> nekonservatyvus (įvertis 0.852) <i>GERPP++</i> konservatyvus regionas (įvertis 4,46)	Galimai patogeninis	· Izoliuotas AR paveldėjimo klausos sutrikimas (614945)
IŠ VISO 21,4 (13.8- 30.9)						

IV.3.3. AR paveldėjimo klausos sutrikimo dažnis lietuvių populiacijoje

Vienas iš šio mokslinio darbo uždavinių – nustatyti su AR ir XR būdu paveldimo ĮPKS siejamų genų patogeninių variantų nešiotojų dažnį lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje, įvertinti paveldimo klausos sutrikimo dažnį mūsų populiacijoje.

Dėl griežtų įtraukimo į LITGEN projektą kriterijų, garantuojančių kohortos unikalumą, sveikų tiriamų asmenų grupę sudarė tik lietuvių tautybės asmenys, kurių trijų kartų šeimos nariai buvo lietuvių tautybės ir gyveno tame pačiame etnoligvistiniame regione. Šios ypatybės leidžia teigti, kad tirtos LITGEN grupės tyrimo rezultatai atspindi lietuvių populiacijos ypatybes. Nors didesnės etninės populiacijos grupės tyrimai leistų geriau įvertinti AR ir XR paveldėjimo KS dažnį mūsų populiacijoje, nustatyti statistiškai reikšmingi rezultatai ($p \leq 0,05$) rodo, kad grupės dydis pakankamas atlikti lietuvių populiacijos analizę.

Remiantis LITGEN grupės analizės rezultatais lietuvių populiacijoje 21-am tiriamajam (21,4 proc., arba ~1-am iš 5-ių sveikų asmenų) nustatyta AR paveldėjimo klausos sutrikimą lemiančio patogeninio / galimai patogeninio varianto nešiotų būklė (žr. 30 pav.).



30 pav. AR KS lemiančių patogeninių variantų etiologinė struktūra lietuvių populiacijos sveikų asmenų grupėje

Apskaičiuotas AR paveldimo KS genų patogeninių variantų lemiamas ligos dažnis lietuvių populiacijoje pateikiamas 27 lentelėje.

27 lentelė. AR būdu paveldimo KS genų patogeninių variantų lemiamas ligos dažnis lietuvių populiacijoje

Genas	Patogeninių / galimai patogeninių variantų nešiotojų santykinis dažnis	Ligos dažnis lietuvių populiacijoje (proc.)
<i>GJB2</i>	7,14	1 iš 784 (0,1275)
<i>SLC26A4</i>	2,04	1 iš 9604 (0,0104)
<i>USH2A</i>	2,04	1 iš 9604 (0,0104)
<i>ATP6V1B1</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>TMPRSS3</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>PNPT1</i>	2,04	1 iš 9604 (0,0104)
<i>BDP1</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>COL4A4</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>HSD17B4</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>MYO15A</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>OTOF</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
<i>OTOG</i>	1,02	1 iš 38416 (0,0026)
IŠ VISO	21,4	~1 iš 557 (0,1795)

Pagal *GJB2* geno patogeninių variantų nešiotojų dažnį sveikų asmenų grupėje (7,1 proc., arba 1 iš 14) apskaičiuotas su *GJB2* genu siejamo izoliuoto klausos sutrikimo dažnis Lietuvių populiacijoje – apytikriai 1-as iš 784-ių asmenų neasortatyvių santuokų atveju.

SLC26A4, *USH2A*, *ATP6V1B1*, *TMPRSS3* genų patogeniniai variantai lemia ligos dažnį nuo 1 iš 9604 iki 1 iš 38 416, jų suminis dažnis 1 iš 3842 (0,026 proc.).

PNPT1, *BDP1*, *COL4A4*, *HSD17B4*, *MYO15A*, *OTOF*, *OTOG* genų galimai patogeninių variantų lemiamas KS nuo 1 iš 9604 iki 1 iš 38 416, jų suminis dažnis Lietuvių populiacijoje 1 iš 3842 (0,026 proc.).

Remiantis visų LITGEN grupėje nustatytų patogeninių / galimai patogeninių variantų alelių dažniu, apskaičiuotas AR paveldimo KS dažnis populiacijoje ~1 iš 557 asmenų (0,18 proc.). Lietuvos statistikos departamento duomenimis [259], 2016 m. Lietuvoje gimė 30 623 naujagimiai. Remiantis atliktais paveldimo KS

dažnio skaičiavimais, 2016 m. mūsų šalyje turėjo gimti 55 vaikai, turintys AR paveldėjimo KS.

Gauti rezultatai rodo didelį paveldimo klausos sutrikimo dažnį Lietuvių populiacijoje.

Reikėtų įvertinti, kad skaičiavimai atlikti naudojant tik AR paveldėjimo KS patogeninių / galimai patogeninių variantų alelių dažnius, nors buvo nustatyta daugiau kaip 150 neaiškios klinikinės reikšmės pokyčių, kurių dalis taip pat gali būti patogeniniai. Įvertinus, kad LITGEN grupėje nebuvo analizuojamas AD, XD ir mitochondrinio paveldėjimo KS dažnis mūsų populiacijoje, galima teigti, kad tikrasis paveldimo KS dažnis Lietuvių populiacijoje yra dar didesnis.

IV.4. Įgimto / paveldimo klausos sutrikimo genetinio ištyrimo gairės

KS genetinių priežasčių tyrimas svarbus paciento ištyrimo ir sveikatos priežiūros etapas. Gydytojo genetiko konsultacija ir ištyrimas naudingi sergančiam asmeniui dėl šių priežasčių:

- Žinojimas apie genetinę ligos kilmę naudingas pacientams psichologiniu požiūriu ir gydytojams, planuojantiems tyrimus;
- Žinojimas apie (galimai) sindrominį KS tipą svarbus tolesnei paciento sveikatos priežiūrai ir gydymui;
- Prognozė šeimos nariams reikalinga stebint jų sveikatą ir planuojant palikuonis;
- Žinojimas apie jautrumą ototoksiniams aminoglikozidų grupės vaistams reikalingas planuojant infekcinių ligų gydymą antibakteriniais vaistais.

Sergančio asmens konsultavimas pasižymi specifika, tiesiogiai susijusia su liga – pacientai ir (ar) jų tėvai neretai kalba tik ženklų kalba, todėl konsultacijoje dažnai dalyvauja gestų kalbos vertėjas arba informacija renkama raštu. Kita ypatybė, kurią reikia įvertinti konsultacijos metu – sergantys asmenys (ypač kurčiųjų šeimose), skirtingai nei medicinos specialistais, KS laiko arba neutraliu, arba netgi teigiamu bruožu. Ši nuostata neretai sunkina diagnostiką ir siaurina

klausos reabilitacijos galimybes. Požiūrių skirtumus reikia įvertinti net vartojant specifinius terminus (pvz.: „tikimybė turėti klausos sutrikimą“, o ne „rizika sirgti“).

Paciento genetinis ištyrimas atliekamas etapais, pradedant nuo genetinės konsultacijos (žr. schemą 31 pav.).

Vienas svarbiausių genetinės konsultacijos tikslų – atskirti sindrominį KS nuo izoliuoto. Patyrusiam gydytojui genetikui nustatyti sindrominio KS diagnozę gali pakakti ligos anamnezės ir paciento klinikinio ištyrimo.

I. Genetinė konsultacija:

(1) **Ligos anamnezė** svarbi nustatant aplinkos veiksnių lemiamą KS, taip pat kitų organų sistemų patologiją:

- Mamos nėštumo anamnezė:
 - infekcijos (CMV, raudonukė, sifilis);
 - vartoti vaistai (aminoglikozidai, talidomidas)
- Gimimo anamnezė (neišnešiotumas, mažas gimimo svoris, hipoksija, hiperbilirubinemija, ototoksiniai vaistai);
- Anamnezė po gimimo (virusinė infekcija, bakterinis meningitas, galvos trauma, ototoksiniai vaistai, triukšmas aplinkoje);
- Audiometrinis įvertinimas (kondukcinis / neurosensorinis KS; ligos pradžia; progresuojanti / stabili / banguojanti eiga; simetriškumas, sunkumo laipsnis; pusiausvyros sutrikimai, auditorinė neuropatija; kitų organų patologija). Reikia nepamiršti, kad aplinkos veiksnių identifikavimas iš anamnezės gali turėti įtakos klaidingam sprendimui dėl ligos etiologijos, todėl genetiniai tyrimai šiais atvejais turėtų būti atlikti. Tikrai neradus genetinės priežasties, patvirtinama aplinkos veiksnių sukelta patologija.

(2) **Trijų kartų genealogijos analizė** gali suteikti papildomos informacijos diferencijuojant ligos priežastį:

- Tautybė, kilmės šalis;
- Ligos paveldėjimo būdas;

- Šeimos narių ligos (persileidimai, intelektinė negalia, širdies ligos, inkstų ligos, cukrinis diabetas, regos sutrikimai, skydliaukės patologija);

- Giminingos santuokos.

(3) **Klinikinis ištyrimas** yra vienas svarbiausių etapų klinikinei ligos diagnozei nustatyti:

- Antropometrinių rodiklių įvertinimas (ūgis, svoris, galvos apimtis). Daugeliui įgimtų vystymosi anomalijų esant KS būdinga mikrocefalija, žemas ūgis arba augimo atsilikimas (*Cornelia de Lange* s., chromosomų persitvarkymai, mitochondriopatijos (*MELAS* s.), *Cockayne* s.);

- Kraniofacialinių ypatybių, kaklo, išorinės ausies išsivystymo įvertinimas padės nustatyti požymius, būdingus *Treacher–Collins* s., *BOR* s., *CHARGE* s., *Goldenhar* s., *DiGeorge* s., kraniosinostozėms;

- Griaucių ir raumenų sistemos būklės įvertinimas padės nustatyti nebaigtinę osteogenezę, *Stickler* s., kaulų displazijas;

- Neurologinės būklės įvertinimas atskleis galimą sindrominį KS su įvairia neurologine patologija (II tipo neurofibromatozė, ataksijos, paveldimos motorinės ir sensorinės neuropatijos, mitochondriopatijos);

- Odos ir plaukų apžiūra (pigmentacija, dėmės, odos išaugos) padės identifikuoti požymius, būdingus *Waardenburg* s. (hipopigmentacija, balta plaukų sruoga viršugalvyje), *KID* s., pigmentinei kserodermai.

(4) **Instrumentinių tyrimų rezultatų įvertinimas:**

- smilkinkaulių kompiuterinės tomografijos tyrimas padės identifikuoti anatomines vidinės ir vidurinės ausies vystymosi anomalijas (*Mondini* displazija, būdinga *Pendred* s., intrakranijinės kalcifikacijos kelia *CMV* infekcijos arba toksoplazmozės įtarimą, sraigės ir pusratinių kanalų displazijos, būdingos *CHARGE* s.);

- galvos magnetinio rezonanso tyrimas padės nustatyti klausos nervo hipoplaziją, akustinę neuromą;

- inkstų biopsijos tyrimas reikalingas paveldimai glomerulų pamatinės membranos patologijai patvirtinti.

(5) Kitų specialybių gydytojų išvadų analizė:

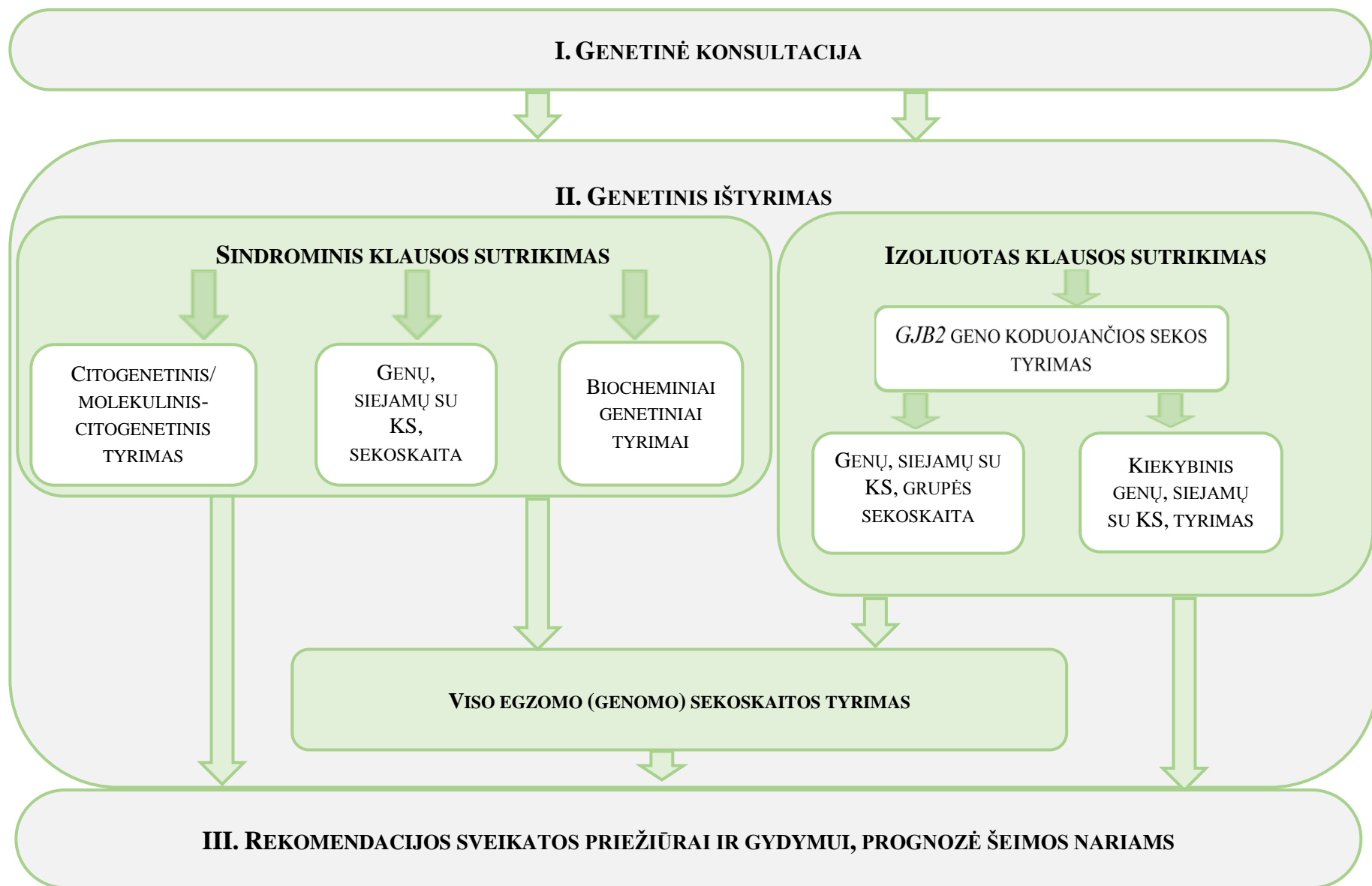
- Oftalmologinės apžiūros metu gali būti nustatyta neišnešiotų naujagimių retinopatija, akių albinizmas, *Usher s.*, *Stickler s.*, *Alport s.*;
- Endokrinologo ištyrimas padės nustatyti *Pendred s.*;
- Nefrologiniai tyrimai svarbūs *BOR s.*, *Alport s.* diagnozei nustatyti.

Genetinės konsultacijos metu surinkti duomenys naudojami sindromologinei analizei duomenų bazėse (POSSUM, LMD), mokslinėje literatūroje.

II. Kryptingas genetinis ištyrimas klinikinei diagnozei patvirtinti arba nustatyti.

Priklausomai nuo klinikinio ištyrimo išvadų, genetinis laboratorinis tyrimas vykdomas dviem (sindrominio arba nesindrominio KS) kryptimis.

- Sindrominio KS atveju tyrimas atliekamas priklausomai nuo įtariamo sindromo:
 - įtariant chromosominę patologiją, atliekami molekuliniai citogenetiniai tyrimai (VNP-LGH, vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija);
 - įtariant monogeninę sindrominę patologiją, atliekami molekuliniai genetiniai tyrimai (konkreto geno koduojančios sekos sekoskaita arba genų, siejamų su įtariamu sindromu, koduojančių sekų tyrimas);
 - įtariant paveldimą medžiagų apykaitos ligą, atliekami biocheminiai genetiniai tyrimai (glikozaminoglikanų kiekybinis ir kokybinis tyrimas; angliavandenių plonasluoksnė chromatografija, organinių rūgščių tyrimas šlapime, kt.).
- Izoliuoto KS atveju genetinis tyrimas vykdomi etapais:
 - *GJB2* geno koduojančios sekos tyrimas;
 - kiekybinis genų, siejamų su izoliuotu KS, tyrimas (MLPA arba VNP-LGH);
 - genų grupių, siejamų su izoliuotu KS, koduojančių sekų tyrimas naujos kartos sekoskaitos būdu;
 - nenustačius sindrominio / izoliuoto KS priežasties, atliekamas viso egzomo sekoskaitos tyrimas (ypač svarbu sindrominio KS atveju).



31 pav. Pacientų, turinčių klausos sutrikimą, ištyrimo schema

III. Sveikatos priežiūros ir gydymo rekomendacijos, prognozė šeimos nariams

Priklausomai nuo nustatytos klinikinės diagnozės, jos paveldėjimo tipo, genetinio pokyčio ypatybių, pacientui sudaromas sveikatos priežiūros ir gydymo planas. Nustačius sindrominį KS, svarbu numatyti kitų organų patologiją, kuri gali išsivystyti ateityje (pvz., pigmentinis retinitas *Usher* s., skydliaukės hipofunkcija *Pendred* s., glomerulonefritas *Alport* s. atvejais), kryptingai stebėti, imtis patologijos pasireiškimą silpninančių priemonių, anksti diagnozuoti ir gydyti.

Kita svarbi informacija, pateikiama pacientui ir (ar) tėvams (globėjams) po ištyrimo – ligos išsivystymo prognozė šeimos nariams, nustatoma pagal paveldėjimo tipą. Ši informacija aktuali jų sveikatos priežiūrai, taip pat planuojant susilaukti vaikų, todėl pirmos eilės šeimos nariams rekomenduojamas šeiminių genetinių pokyčių tyrimas.

Pacientų, turinčių KS, sveikatos priežiūra turėtų būti koordinuojama referentiniuose kompetencijos centruose, kuriuose otorinolaringologų, gydytojų genetikų, medicinos genetikų, audiologų, surdopedagogų, logopedų, oftalmologų, neurologų, endokrinologų, kardiologų, nefrologų, psichologų ir kitų specialistų komanda optimaliai užtikrina medicininius pacientų ir jų šeimos narių poreikius.

Nenustačius genetinio pokyčio, lemiančio KS, rekomenduojama apsilankyti pas gydytoją genetiką kas trejus metus. Pacientui tai naudinga dėl kelių priežasčių: (1) subtilūs sindrominio KS požymiai gali būti nepastebimi ankstyvoje vaikystėje, tačiau taps ryškesni vaikui augant, todėl bus galima atlikti papildomus genetinius tyrimus; (2) pakartotiniai apsilankymai leis informuoti pacientus apie naujas tyrimo galimybes arba naują nustatytų variantų interpretavimą; (3) pakartotinių apsilankymų metu gali būti nustatyta nesusijusi su KS patologija ir pacientas nusiųstas pas kitą specialistą.

Pacientų, turinčių KS, genetinio ištyrimo gaires pateikia mokslinės institucijos, išorinę kokybės kontrolę vykdančios įstaigos. 2013 m. EMQN Gerosios praktikos gairėse rekomenduojama izoliuoto klausos sutrikimo atveju tyrimus pradėti nuo *GJB2* geno koduojančios sekos tyrimo, vėliau atlikti *DFNB1*

srities iškritų tyrimą. 2014 m. Amerikos medicinos genetikos ir genomikos kolegija (ACMG) paskelbė KS turinčių asmenų genetinės diagnostikos rekomendacijas [283]. Jose siūloma genetinius tyrimus atlikti diferencijuojant pagal pacientų fenotipą (sindrominis / nesindrominis KS).

Genetinės konsultacijos metu diferencijuodami sindrominį ir izoliuotą KS bei spręsdami dėl genetinių tyrimų skyrimo ir gautų rezultatų interpretacijos, gydytojai genetikai susiduria su šiais diagnostikos iššūkiais:

1. „Nepastebėtas“ sindromas. Sindrominio KS požymiai dar nepasireiškė, todėl apžiūrint kliniškai nustatomas izoliuotas KS. *Pendred* s. atveju skydliaukės patologija gali išsivystyti tik paauglystėje; chromosomų mikroiškritos, apimančios *STRC* ir *CATSPER2* genus, lemia KS ir nevaisingumą, kuris nustatomas tik suaugusiam asmeniui.

2. Kelių genų patogeniniai variantai vienoje šeimoje. Asmenys, turintys KS, dėl socialinių ir kultūrinių ypatybių yra linkę sudaryti asortatyvias santuokas. Dėl šių priežasčių neretai vienoje šeimoje segreguoja kelios paveldimos KS priežastys, ypač turint omenyje didelį *GJB2* geno patogeninių variantų nešiotojų dažnį populiacijoje. Todėl asortatyviose šeimose tikslingas platesnis sergančių narių ištyrimas, siekiant identifikuoti kelias galimas KS priežastis.

3. Pseudodominantinis klausos sutrikimo paveldėjimas. Recessyvus KS gali būti palaikytas dominantiniu dėl didelio patogeninio alelio nešiotojų dažnio populiacijoje (pvz., *GJB2* geno). Dėl šios priežasties genealogijoje patologijos paveldėjimas atrodo dominantinio pobūdžio.

4. Neaprašytų genetinių pokyčių klinikinės reikšmės įvertinimas. Kai kuriais atvejais pokyčio prigimties pakanka (rėmelio poslinkį lemiantis pokytis, priešlaikinės baigmės kodono susidarymas), norint paaiškinti jo patogeniškumą. Aminorūgšties pakaitą lemiančio varianto patogeniškumui įvertinti naudojami *in silico* analizės metodai, leidžiantys apytikriai spręsti apie klinikinį reikšmingumą. Kadangi naujai identifikuotų genų ir (ar) jų patogeninių variantų funkciniai tyrimai bei genotipo ir fenotipo koreliacijos tyrimai nėra atlikti, daugeliu tokių atvejų tenka

laukti išsamesnių mokslinių tyrimų arba kitų pacientų, turinčių tuos pačius variantus, kol bus nustatyta jų klinikinė reikšmė.

5. Bioetiniai klausimai, susiję su paciento ištyrimu:

- Vaisiaus genetinių tyrimų dėl KS tikslingumas. Tėvai, auginantys sergantį vaiką, kito nėštumo metu pageidauja kuo anksčiau žinoti jo būklę. Prenatalinis invazinis vaisiaus tyrimas susijęs su persileidimo tikimybe, todėl izoliuoto KS atveju neturėtų būti atliekamas. Sindrominio KS atveju prenatalinio ištyrimo poreikis turėtų būti sprendžiamas atsižvelgiant į konkrečią situaciją (tėvų požiūris, būklės sunkumas ir kt.);

- Tikimybė nustatyti biologinės tėvystės nebuvimą. Ši situacija galima ir kitų genetinių tyrimų atveju, jei atliekamas nustatytų genetinių pokyčių segregacijos tyrimas šeimoje. Šeima apie tokią galimybę turėtų būti informuojama pasirašytinai ir iki tyrimo apsispręsti, ar sutinka jį atlikti.

- Tikimybė nustatyti papildomus patogeninius genų variantus, nesusijusius su paciento esama liga, tačiau ateityje galinčius sukelti sunkias, gyvybei pavojingas ligas. Tai aktualu atliekant genų grupių, VES tyrimus.

Sprendimas dėl tyrimų apimties turi būti priimtas įvertinus potencialios naudos ir žalos pacientui santykį.

Genetinių KS tyrimų mastai ir galimybės per pastaruosius du dešimtmečius stipriai išaugo. Vis dėlto pacientų ištyrimas dar kelia didelių iššūkių. Ankstyva ligos diagnozė leidžia laiku imtis klausos reabilitacijos priemonių, pagerinančių paciento socialinę integraciją. Akivaizdu, kad gerėjant paveldimų KS priežasčių identifikavimui, genetiniai tyrimai ateityje bus anksčiau įtraukti į KS ištyrimo procesą. Molekulinės ligos priežasties nustatymas bus svarbus žingsnis individualios medicinos ir genetinės etiologijos nulemtu KS gydymo link.

V. IŠVADOS

1. Tiroje Lietuvos populiacijos asmenų, turinčių klausos sutrikimą, grupėje dominuoja izoliuotas klausos sutrikimas (74,7 proc. negiminingų asmenų):

- Izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje vyrauja visiškas, simetriškas klausos sutrikimas (atitinkamai 47,7 proc. ir 87,0 proc.), teigiama genealogija nustatyta 40,7 proc. tiriamųjų;

- Sindrominio klausos sutrikimo pogrupyje vyrauja vidutinis, simetriškas klausos sutrikimas, be išorinės / vidurinės / vidinės ausies vystymosi ydų (atitinkamai 41,1 proc., 86,3 proc., 68,5 proc. tiriamųjų), teigiama genealogija nustatyta 27,4 proc. tiriamųjų.

2. Lietuvos populiacijos etiologinė klausos sutrikimo struktūra panaši į kitų Europos populiacijų:

- izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje dažniausia ligos priežastis – genetiniai veiksniai (55,6 proc.), vyrauja *GJB2* geno patogeniniai variantai (51,4 proc.);

- sindrominio klausos sutrikimo pogrupyje klinikinė sindromo diagnozė nustatyta 64,4 proc. asmenų (iš jų 63,8 proc. monogeninės, 12,8 proc. chromosominės priežastys). Tačiau ji turi savitų ypatybių: didelis *GJB2* c.313_326del alelio dažnis izoliuoto KS pogrupyje, nustatytos ir ypač retos patologijos – *Rogers* sindromas, ichtiozės ir neišnešiotumo sindromas.

3. Izoliuoto klausos sutrikimo pogrupyje genetiniai veiksniai dažniau lemia visišką / sunkų (OR 3,3; $p=7,9 \times 10^{-5}$), simetrišką (OR 3,0; $p=1,4 \times 10^{-2}$) klausos sutrikimą ir dažnesnę teigiamą genealogiją (OR 2,6; $p=2,1 \times 10^{-3}$).

4. Lietuvių populiacijai būdingas didelis autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimo genų patogeninių / galimai patogeninių variantų nešiotųjų dažnis (21,4 proc. LITGEN grupėje), vyraujant *GJB2* geno patogeniniams variantams (7,1 proc. tiriamųjų), ir didelis autosominio recesyvaus paveldėjimo klausos sutrikimo dažnis (~1 iš 557 asmenų).

5. Didelis klinikinis ir genetinis ligos heterogeniškumas lemia poreikį daugiadisciplinio požiūrio ir kompleksinio ištyrimo, kurio pagrindas yra gydytojo genetiko konsultacija ir genetinis ištyrimas, siekiant tiksliai diagnozuoti ligą.

LITERATŪRA

1. **Pasaulio sveikatos organizacija**
[<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>]
2. **LIETUVOS GYVENTOJŲ SVEIKATA IR SVEIKATOS PRIEŽIŪROS ĮSTAIGŲ VEIKLA 2015 m.** In. Edited by centras HiSi; 2016m.: 19.
3. Castiglione A, Busi M, Martini A: **Syndromic hearing loss: an update.** *Hearing, Balance and Communication* 2013, **11**(3):146-159.
4. Vona B, Hofrichter MA, Chioza BA, Crosby AH, Nanda I, Haaf T: **Genetic elucidation of nonsyndromic hearing loss in the high-throughput sequencing era.** In: *Genetics of Deafness*. vol. 20: Karger Publishers; 2016: 56-72.
5. Wilson JA: **A note on the Edwin Smith Surgical Papyrus.** *Journal of Near Eastern Studies* 1952, **11**(1):76-80.
6. Ritner RK: **Innovations and adaptations in ancient Egyptian Medicine.** *Journal of Near Eastern Studies* 2000, **59**(2):107-117.
7. **Hippocrates, De morbis popularibus**
[<http://data.perseus.org/citations/urn:cts:greekLit:tlg0627.tlg006.perseus-eng2:3.3.7>]
8. Azizi M-H: **The otorhinolaryngologic concepts as viewed by Rhazes and Avicenna.** *Arch Iran Med* 2007, **10**(4):552-555.
9. Cranefield PF, Federn W: **Paulus Zacchias on mental deficiency and on deafness.** *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 1970, **46**(1):3-21.
10. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM: **Hereditary hearing loss and its syndromes:** Oxford University Press, USA; 1995.
11. Groce NE: **Everyone here spoke Sign language: hereditary deafness on Martha's Vineyard:** Harvard University Press; 1985.

12. Thomson A: **Notice of several cases of malformation of the external ear, together with experiments on the state of hearing in such persons.** *Monthly J Med Sci* 1846, **7**:420.
13. Graefe Av: **Vereinzelte Beobachtungen und Bemerkungen.** *Archiv für Ophthalmologie* 1858, **4**(2):211-276.
14. Pendred V: **Deaf-mutism and goitre.** *The Lancet* 1896, **148**(3808):532.
15. Hammerschlag V: **Zur Kenntnis der hereditär-degenerativen Taubstummheit.** *Z Ohrenheilk* 1910, **61**:225.
16. Darwin GH: **Marriages between first cousins in England and their effects.** *Journal of the Statistical Society of London* 1875, **38**(2):153-184.
17. Bell AG: **Memoir upon the formation of a Deaf variety of the human race.** 1969.
18. Watson JD, Crick FHC: **THE STRUCTURE OF DNA.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1953, **18**:123-131.
19. Nirenberg M, Leder P, Bernfield M, Brimacombe R, Trupin J, Rottman F, O'Neal C: **RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965, **53**(5):1161-1168.
20. Nance WE, Sweeney A: **Symposium on sensorineural hearing loss in children: early detection and intervention. Genetic factors in deafness of early life.** *Otolaryngologic Clinics of North America* 1975, **8**(1):19-48.
21. Wallis C, Ballo R, Wallis G, Beighton P, Goldblatt J: **X-linked mixed deafness with stapes fixation in a Mauritian kindred: Linkage to Xq probe pDP34.** *Genomics* 1988, **3**(4):299-301.
22. de Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I: **Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene *POU3F4*.** *Science* 1995, **267**(5198):685.

23. Vona B, Nanda I, Hofrichter MAH, Shehata-Dieler W, Haaf T: **Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future.** *Molecular and Cellular Probes* 2015, **29**(5):260-270.
24. P G, S BA, S B, J L, J W: **A nonsyndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q.** *Nat Genet* 1994, **6**:24.
25. Kelsell D, Dunlop J, Stevens H, Lench N, Liang J: **Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness.** *Nature* 1997, **387**:80.
26. Toriello HV, Smith SD: **Hereditary hearing loss and its syndromes:** Oxford University Press; 2013.
27. Doetzlhofer A, Avraham KB: **Insights into inner ear-specific gene regulation: Epigenetics and non-coding RNAs in inner ear development and regeneration.** *Seminars in Cell & Developmental Biology.*
28. Kellis M, Wold B, Snyder MP, Bernstein BE, Kundaje A, Marinov GK, Ward LD, Birney E, Crawford GE, Dekker J *et al*: **Defining functional DNA elements in the human genome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, **111**(17):6131-6138.
29. Ramsebner R, Ludwig M, Lucas T, de Jong D, Hamader G, del Castillo I, Parzefall T, Baumgartner W-D, Schoefer C, Szuhai K: **Identification of a SNP in a regulatory region of *GJB2* associated with idiopathic nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in a multicenter study.** *Otology & Neurotology* 2013, **34**(4):650-656.
30. Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ: **Dominant modifier *DFNMI* suppresses recessive deafness *DFNB26*.** *Nature genetics* 2000, **26**(4):431-434.
31. Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, Morell RJ, Mohiddin SA, Fananapazir L, Madeo AC: **Modification of**

- human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2.** *New England Journal of Medicine* 2005, **352**(15):1557-1564.
32. Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, Belyantseva IA, Pellegrino R, Kachar B, Steel KP, Noben-Trauth K: **Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in *waltzer*, the mouse model for Usher syndrome type 1D.** *Nature genetics* 2001, **27**(1):103-107.
33. Metodiev Metodi D, Thompson K, Alston Charlotte L, Morris Andrew A, He L, Assouline Z, Rio M, Bahi-Buisson N, Pyle A, Griffin H *et al*: **Recessive mutations in *TRMT10C* cause defects in mitochondrial RNA processing and multiple respiratory chain deficiencies.** *American Journal of Human Genetics* 2016, **98**(5):993-1000.
34. Sun J, Hao Z, Luo H, He C, Mei L, Liu Y, Wang X, Niu Z, Chen H, Li J-D *et al*: **Functional analysis of a nonstop mutation in *MITF* gene identified in a patient with Waardenburg syndrome type 2.** *J Hum Genet* 2017.
35. Liu F, Xia W, Hu J, Wang Y, Yang F, Sun S, Zhang J, Jiang N, Wang H, Tian W *et al*: **Solute carrier family 26 member a2 (*slc26a2*) regulates otic development and hair cell survival in Zebrafish.** *PLoS ONE* 2015, **10**(9):e0136832.
36. Schimmang T, Maconochie M: **Gene expression profiling of the inner ear.** *Journal of Anatomy* 2016, **228**(2):255-269.
37. Keeler CE: **The laboratory mouse: its origin, heredity, and culture.**[With illustrations and a bibliography.]: Harvard University Press; 1931.
38. RJ R: **The mouse: from pet to paradigm. The mouse and the ear: A brief history.** *Otol Jpn* 2005, **15**:259.
39. Deol MS: **The anatomy and development of the mutants *pirouette*, *shaker-1* and *waltzer* in the mouse.** *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 1956, **145**(919):206-213.
40. Deol MS: **The anomalies of the labyrinth of the mutants *varitint-waddler*, *shaker-2* and *jerker* in the mouse.** *Journal of Genetics* 1954, **52**(3):562.

41. Meng T-H: **The internal ear of the shaker *Mus musculus***: publisher not identified; 1933.
42. Gruneberg H, Hallpike CS, Ledoux A: **Observations on the structure, development and electrical reactions of the internal ear of the *Shaker-1* mouse (*Mus musculus*)**. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 1940, **129**(855):154-173.
43. Deol MS: **The abnormalities of the inner ear in 'kreisler' mice**. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1964, **12**(3):475-490.
44. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M *et al*: **Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse**. *PLOS Biology* 2009, **7**(5):e1000112.
45. Mburu P, Liu XZ, Walsh J, Saw D, Cope M, Gibson F, Kendrick- Jones J, Steel K, Brown S: **Mutation analysis of the mouse myosin VIIA deafness gene**. *Genes and function* 1997, **1**(3):191-203.
46. Yang T, Kahrizi K, Bazazzadeghan N, Meyer N, Najmabadi H, Smith RJH: **A novel mutation adjacent to the *Bth* mouse mutation in the *TMCI* gene makes this mouse an excellent model of human deafness at the *DFNA36* locus**. *Clinical genetics* 2010, **77**(4):395-398.
47. Mitchem KL, Hibbard E, Beyer LA, Bosom K, Dootz GA, Dolan DF, Johnson KR, Raphael Y, Kohrman DC: **Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss *DFNB6***. *Human molecular genetics* 2002, **11**(16):1887-1898.
48. Varshney GK, Pei W, LaFave MC, Idol J, Xu L, Gallardo V, Carrington B, Bishop K, Jones M, Li M: **High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9**. *Genome research* 2015, **25**(7):1030-1042.

49. Whitfield TT: **Zebrafish as a model for hearing and deafness.** *Journal of Neurobiology* 2002, **53**(2):157-171.
50. Blanco-Sánchez B, Clément A, Phillips JB, Westerfield M: **Chapter 16 - Zebrafish models of human eye and inner ear diseases.** In: *Methods in Cell Biology*. Edited by H. William Detrich MW, Leonard IZ, vol. Volume 138: Academic Press; 2017: 415-467.
51. Groves AK: **The induction of the otic placode.** In: *Development of the inner ear*. Springer; 2005: 10-42.
52. Groves AK, LaBonne C: **Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border.** *Developmental biology* 2014, **389**(1):2-12.
53. Khatri SB, Edlund RK, Groves AK: **Foxi3 is necessary for the induction of the chick otic placode in response to FGF signaling.** *Developmental biology* 2014, **391**(2):158-169.
54. Alsina B, Abelló G, Ulloa E, Henrique D, Pujades C, Giraldez F: **FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo.** *Developmental biology* 2004, **267**(1):119-134.
55. Maier EC, Whitfield TT: **RA and FGF signalling are required in the zebrafish otic vesicle to pattern and maintain ventral otic identities.** *PLoS Genet* 2014, **10**(12):e1004858.
56. Groves AK, Fekete DM: **Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning.** *Development* 2012, **139**(2):245-257.
57. Ozaki H, Nakamura K, Funahashi J-i, Ikeda K, Yamada G, Tokano H, Okamura H-o, Kitamura K, Muto S, Kotaki H: **Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle.** *Development* 2004, **131**(3):551-562.
58. Jayasena CS, Ohyama T, Segil N, Groves AK: **Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode.** *Development* 2008, **135**(13):2251-2261.

59. Lin Z, Cantos R, Patente M, Wu DK: **Gbx2 is required for the morphogenesis of the mouse inner ear: a downstream candidate of hindbrain signaling.** *Development* 2005, **132**(10):2309-2318.
60. Head JR, Gacioch L, Pennisi M, Meyers JR: **Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line.** *Developmental Dynamics* 2013, **242**(7):832-846.
61. Cai T, Groves AK: **The role of atonal factors in mechanosensory cell specification and function.** *Molecular neurobiology* 2015, **52**(3):1315-1329.
62. Jahan I, Pan N, Kersigo J, Fritsch B: **Neurod1 suppresses hair cell differentiation in ear ganglia and regulates hair cell subtype development in the cochlea.** *PloS one* 2010, **5**(7):e11661.
63. Tateya T, Imayoshi I, Tateya I, Hamaguchi K, Torii H, Ito J, Kageyama R: **Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea.** *Development* 2013, **140**(18):3848-3857.
64. Daudet N, Lewis J: **Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation.** *Development* 2005, **132**(3):541-551.
65. Engel J, Braig C, Rüttiger L, Kuhn S, Zimmermann U, Blin N, Sausbier M, Kalbacher H, Münkner S, Rohbock K: **Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea.** *Neuroscience* 2006, **143**(3):837-849.
66. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH: **Larsen's human embryology:** Elsevier Health Sciences; 2014.
67. Dror AA, Avraham KB: **Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology.** *Annual Review of Genetics* 2009, **43**(1):411-437.
68. Smith RJH SA, Hildebrand MS, et al. : **Deafness and hereditary hearing loss overview.** . In: *I.* 1999 Feb 14 [Updated 2014 Jan 9]. .

69. Van Camp G SR: **Hereditary hearing loss homepage**. . last update: May 19 th, 2014
70. Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol N, Rayyan AA, Parzefall T, Lev D, Shalev S, Frydman M *et al*: **Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in middle eastern families**. *Genome Biol* 2011, **12**(9).
71. Manor U, Kachar B: **Dynamic length regulation of sensory stereocilia**. *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19**:502.
72. Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F: **The autosomal recessive isolated deafness, *DFNB2*, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene**. *Nat Genet* 1997, **16**:191.
73. Prosser H, Rzadzinska A, Steel K, Bradley A: **Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia**. *Mol Cell Biol* 2008, **28**:1702.
74. Kros C, Marcotti W, Netten Sv, Self T, Libby R: **Reduced climbing and increased slipping adaptation in cochlear hair cells of mice with *Myo7a* mutations**. *Nat Neurosci* 2002, **5**:41.
75. Watanabe S, Umeki N, Ikebe R, Ikebe M: **Impacts of Usher syndrome type IB mutations on human myosin VIIa motor function**. *Biochemistry* 2008, **47**:9505.
76. Sweeney H, Houdusse A: **What can myosin VI do in cells?** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**:57.
77. Hertzano R, Shalit E, Rzadzinska A, Dror A, Song L: **A *Myo6* mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells**. *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000207.
78. Sato O, White H, Inoue A, Belknap B, Ikebe R, Ikebe M: **Human deafness mutation of myosin VI (C442Y) accelerates the ADP dissociation rate**. *J Biol Chem* 2004, **279**:28844.

79. Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, Frolenkov GI, Sellers JR, Ahmed ZM, Griffith AJ, Friedman TB: **Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**(2):148-156.
80. Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Ben-David O: **Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:1571.
81. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner H, Blin N: **Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4).** *Am J Hum Genet* 2004, **74**:770.
82. Lalwani A, Goldstein J, Kelley M, Luxford W, Castelein C, Mhatre A: **Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**:1121.
83. Petit C, Richardson GP: **Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function.** *Nat Neurosci* 2009, **12**(6):703-710.
84. Wijk Ev, Krieger E, Kemperman M, Leenheer ED, Huygen P: **A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26).** *J Med Genet* 2003, **40**:879.
85. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Sa'ed JA, Rayan AA: **Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss.** *Am J Hum Genet* 2006, **78**:144.
86. Lynch E, Lee M, Morrow J, Welch P, Leon P, King M: **Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous.** *Science* 1997, **278**:1315.
87. Naz S, Griffith A, Riazuddin S, Hampton L, Battey J: **Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction.** *J Med Genet* 2004, **41**:591.

88. Khan S, Ahmed Z, Shabbir M, Kitajiri S, Kalsoom S: **Mutations of the *RDX* gene cause nonsyndromic hearing loss at the *DFNB24* locus.** *Hum Mutat* 2007, **28**:417.
89. Modamio-Hoybjor S, Mencia A, Goodyear R, Castillo Id, Richardson G: **A mutation in *CCDC50*, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss.** *Am J Hum Genet* 2007, **80**:1076.
90. Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A: **Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with *DFNB31*.** *Nat Genet* 2003, **34**:421.
91. Michalski N, Michel V, Caberlotto E, Lefèvre GM, Van Aken AF, Tinevez J-Y, Bizard E, Houbbron C, Weil D, Hardelin J-P: **Harmonin-b, an actin-binding scaffold protein, is involved in the adaptation of mechanoelectrical transduction by sensory hair cells.** *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2009, **459**(1):115.
92. Michalski N, Michel V, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P, Hardelin J-P: **Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning.** *Journal of Neuroscience* 2007, **27**(24):6478-6488.
93. Michel V, Goodyear RJ, Weil D, Marcotti W, Perfettini I, Wolfrum U, Kros CJ, Richardson GP, Petit C: **Cadherin 23 is a component of the transient lateral links in the developing hair bundles of cochlear sensory cells.** *Developmental biology* 2005, **280**(2):281-294.
94. Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, Richardson GP, Petit C: **Stereocilin connects outer-hair-cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane.** *The Journal of comparative neurology* 2011, **519**(2):194-210.

95. Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, Liu XZ, Nouaille S, Nance WE, Kanaan M, Avraham KB: **Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**(9):6240-6245.
96. Zhu Y, Liang C, Chen J, Zong L, Chen G-D, Zhao H-B: **Active cochlear amplification is dependent on supporting cell gap junctions.** *Nature communications* 2013, **4**:1786.
97. Meşe G, Londin E, Mui R, Brink P, White T: **Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss.** *Hum Genet* 2004, **115**(3):191-199.
98. Wingard JC, Zhao H-B: **Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss – A common hereditary deafness.** *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015, **9**(202).
99. Ortolano S, Pasquale GD, Crispino G, Anselmi F, Mammano F, Chiorini J: **Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:18776.
100. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ *et al*: **Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29.** *Cell*, **104**(1):165-172.
101. Matter K, Balda MS: **Signalling to and from tight junctions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(3):225-237.
102. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S-i, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM *et al*: **Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing.** *The American Journal of Human Genetics*, **79**(6):1040-1051.

103. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S: **The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and signalling center.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2008, **1778**(3):601-613.
104. Santos MS, Li H, Voglmaier SM: **Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse.** *Neuroscience* 2009, **158**(1):189-203.
105. Yasunaga Si, Grati Mh, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C: **A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness.** *Nat Genet* 1999, **21**(4):363-369.
106. Washington NL, Ward S: **FER-1 regulates Ca²⁺-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis.** *Journal of Cell Science* 2006, **119**(12):2552-2562.
107. Delmaghani S, Castillo Fd, Michel V, Leibovici M, Aghaie A: **Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy.** *Nat Genet* 2006, **38**:770.
108. Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, Steffy BM, Federe GC, Lagler EA, Banan R *et al*: **A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejvakin is essential for outer hair cell function.** *The Journal of Neuroscience* 2007, **27**(9):2163-2175.
109. Schoen CJ, Emeryn SB, C.Thorne M, Ammana HR, Śliwerska E, Arnett J, Hortsch M, Hannan F, Burmeister M, Lesperance MM: **Increased activity of *Diaphanous* homolog 3 (*DIAPH3*)/*diaphanous* causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(30):13396–13401.
110. Wangemann P, Itza E, Albrecht B, Wu T, Jabba S: **Loss of *KCNJ10* protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model.** *BMC Med* 2004, **2**:30.

111. Zdebik AA, Wangemann P, Jentsch TJ: **Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models**, vol. 24; 2009.
112. Kubisch C, Schroeder B, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A: **KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness**. *Cell* 1999, **96**:437.
113. Yang T, Gurrola JG, II, Wu H, Chiu SM, Wangemann P, Snyder PM, Smith RJH: **Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome**. *The American Journal of Human Genetics*, **84**(5):651-657.
114. Meehan DT, Delimont D, Dufek B, Zallocchi M, Phillips G, Gratton MA, Cosgrove D: **Endothelin-1 mediated induction of extracellular matrix genes in strial marginal cells underlies strial pathology in Alport mice**. *Hearing Research* 2016, **341**:100-108.
115. Verhoeven K, Laer LV, Kirschhofer K, Legan P, Hughes D: **Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant nonsyndromic hearing impairment**. *Nat Genet* 1998, **19**:60.
116. McGuirt W, Prasad S, Griffith A, Kunst H, Green G: **Mutations in COL11A2 cause nonsyndromic hearing loss (DFNA13)**. *Nat Genet* 1999, **23**:413.
117. Robertson N, Lu L, Heller S, Merchant S, Eavey R: **Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction**. *Nat Genet* 1998, **20**:299.
118. Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R: **Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:6240.

119. Verpy E, Weil D, Leibovici M, Goodyear R, Hamard G: **Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions.** *Nature* 2008, **456**:255.
120. Kok Yd, Maarel SVD, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco A: **Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4.** *Science* 1995, **267**:685.
121. Weiss S, Gottfried I, Mayrose I, Khare S, Xiang M: **The DFNA15 deafness mutation affects POU4F3 protein stability, localization, and transcriptional activity.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7957.
122. Wayne S, Robertson N, DeClau F, Chen N, Verhoeven K: **Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**:195.
123. Laer LV, Eyken EV, Fransen E, Huyghe J, Topsakal V: **The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCEP2L3, is associated with age-related hearing impairment.** *Hum Mol Genet* 2008, **17**:159.
124. Collin RWJ, Kalay E, Tariq M, Peters T, van der Zwaag B, Venselaar H, Oostrik J, Lee K, Ahmed ZM, Çaylan R *et al*: **Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35.** *The American Journal of Human Genetics* 2008, **82**(1):125-138.
125. Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F: **Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss.** *Nat Genet* 2009, **41**:609.
126. Fischel-Ghodsian N: **Genetic factors in aminoglycoside toxicity.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999, **884**(1):99-109.
127. Kokotas H, Petersen M, Willems P: **Mitochondrial deafness.** *Clinical Genetics* 2007, **71**(5):379-391.
128. Chou S-J, Tseng W-L, Chen C-T, Lai Y-F, Chien C-S, Chang Y-L, Lee H-C, Wei Y-H, Chiou S-H: **Impaired ROS scavenging system in human**

- induced pluripotent stem cells generated from patients with MERRF syndrome. *Scientific Reports* 2016, **6**:23661.
129. **Online Mendelian Inheritance in Man OMIM®. MIM Number: {*590060}: {10/10/2016}**. In. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. .
130. **GeneReviews Waardenburg syndrome**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1531/>]
131. Tassabehji M, Newton VE, Liu X-Z, Brady A, Donnai D, Krajewska-Walasek M, Murday V, Norman A, Obersztyn E, Reardon W *et al*: **The mutational spectrum in Waardenburg syndrome**. *Human Molecular Genetics* 1995, **4**(11):2131-2137.
132. **GeneReviews Branchiootorenal Spectrum Disorders**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1380/>]
133. **GeneReviews Stickler Syndrome**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1302/>]
134. **GeneReviews Neurofibromatosis 2**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1201/>]
135. **GeneReviews Treacher Collins Syndrome**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1532/>]
136. **GeneReviews CHARGE Syndrome**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1117/>]
137. Vissers LELM, van Ravenswaaij CMA, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BBA, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EHLPG, de Jong PJ, Hamel BCJ *et al*: **Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome**. *Nat Genet* 2004, **36**(9):955-957.
138. De Keulenaer S, Hellemans J, Lefever S, Renard J-P, De Schrijver J, Van de Voorde H, Tabatabaieifar MA, Van Nieuwerburgh F, Flamez D, Pattyn F *et al*: **Molecular diagnostics for congenital hearing loss including 15 deafness genes using a next generation sequencing platform**. *BMC Medical Genomics* 2012, **5**:17-17.

139. **GeneReviews Usher Syndrome Type I**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1265/>]
140. **GeneReviews Usher Syndrome Type II**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1341/>]
141. **GeneReviews Pendred Syndrome/DFNB4**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1467/>]
142. **GeneReviews Biotinidase Deficiency**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1322/>]
143. Abdelfatah N, Merner N, Houston J, Benteau T, Griffin A, Doucette L, Stockley T, Lauzon JL, Young TL: **A novel deletion in *SMPX* causes a rare form of X- Linked progressive hearing loss in two families due to a founder effect.** *Human mutation* 2013, **34**(1):66-69.
144. **GeneReviews Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1207/>]
145. **OMIM MOHR-TRANEBJAERG SYNDROME**
[<http://www.omim.org/entry/304700?search=Mohr-Tranebjaerg&highlight=mohrtranebjaerg>]
146. Wang Q, Xue Y, Zhang Y, Long Q, Yang F, Turner Daniel J, Fitzgerald T, Ng Bee L, Zhao Y, Chen Y *et al*: **Genetic Basis of Y-Linked Hearing Impairment.** *The American Journal of Human Genetics* 2013, **92**(2):301-306.
147. **MELAS** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/>]
148. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A *et al*: ***GJB2* mutations and degree of hearing loss: A multicenter study.** *The American Journal of Human Genetics*, **77**(6):945-957.
149. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, Fransen E, Dieltjens N, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Skorka A, Waligora J, Ploski R: **Phenotypic variability of patients homozygous for the *GJB2* mutation 35delG**

- cannot be explained by the influence of one major modifier gene. *European Journal of Human Genetics* 2009, **17**(4):517-524.
150. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, José Gurrola I, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJH: **Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(49): 21104–21109.
 151. Rubel EW, Furrer SA, Stone JS: **A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future.** *Hearing research* 2013, **297**:42-51.
 152. Yang S-M, Chen W, Guo W-W, Jia S, Sun J-H, Liu H-Z, Young W-Y, He DZ: **Regeneration of stereocilia of hair cells by forced *Atoh1* expression in the adult mammalian cochlea.** *PLoS one* 2012, **7**(9):e46355.
 153. Sage C, Huang M, Karimi K, Gutierrez G, Vollrath MA, Zhang D-S, García-Añoveros J, Hinds PW, Corwin JT, Corey DP: **Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein.** *Science* 2005, **307**(5712):1114-1118.
 154. Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS: **Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma.** *Neuron* 2013, **77**(1):58-69.
 155. Burns JC, Corwin JT: **A historical to present-day account of efforts to answer the question:“what puts the brakes on mammalian hair cell regeneration?”.** *Hearing research* 2013, **297**:52-67.
 156. Okano T, Kelley MW: **Stem cell therapy for the inner ear: recent advances and future directions.** *Trends in amplification* 2012, **16**(1):4-18.
 157. Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, Eshtan SJ, Johnson SL, Kuhn S, Milo M, Thurlow JK, Andrews PW, Marcotti W: **Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors.** *Nature* 2012, **490**(7419):278-282.

158. Luebke A, Rova C, Von Doersten P, Poulsen D: **Adenoviral and AAV-mediated gene transfer to the inner ear: role of serotype, promoter, and viral load on in vivo and in vitro infection efficiencies.** In: *Gene Therapy of Cochlear Deafness*. vol. 66: Karger Publishers; 2009: 87-98.
159. Askew C, Rochat C, Pan B, Asai Y, Ahmed H, Child E, Schneider BL, Aebischer P, Holt JR: **Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice.** *Science Translational Medicine* 2015, **7**(295):295ra108-295ra108.
160. Akil O, Rouse SL, Chan DK, Lustig LR: **Surgical method for virally mediated gene delivery to the mouse inner ear through the round window membrane.** *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2015(97):e52187-e52187.
161. Yu Q, Wang Y, Chang Q, Wang J, Gong S, Li H, Lin X: **Virally expressed connexin26 restores gap junction function in the cochlea of conditional Gjb2 knockout mice.** *Gene therapy* 2014, **21**(1):71-80.
162. Akil O, Seal RP, Burke K, Wang C, Alemi A, During M, Edwards RH, Lustig LR: **Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy.** *Neuron* 2012, **75**(2):283-293.
163. Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, McCaffrey KE, Farris HE, Spalitta MJ, Bazan NG, Duelli DM, Rigo F, Hastings ML: **Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness.** *Nature medicine* 2013, **19**(3):345-350.
164. Thomas AJ, Wu P, Raible DW, Rubel EW, Simon JA, Ou HC: **Identification of small molecule inhibitors of cisplatin-induced hair cell death: results of a 10,000 compound screen in the zebrafish lateral line.** *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 2015, **36**(3):519.

165. Namdaran P, Reinhart KE, Owens KN, Raible DW, Rubel EW: **Identification of modulators of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line.** *Journal of Neuroscience* 2012, **32**(10):3516-3528.
166. Wu C-C, Lin Y-H, Liu T-C, Lin K-N, Yang W-S, Hsu C-J, Chen P-L, Wu C-M: **Identifying children with poor cochlear implantation outcomes using massively parallel sequencing.** *Medicine* 2015, **94**(27):e1073.
167. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL: **Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.** *BMC Bioinformatics* 2012, **13**:134-134.
168. DN C, M K: **Human Gene Mutation.**: BIOS Scientific Publishers; 1993.
169. Ballana E VM, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X.: **Connexins and deafness Homepage.** . In <http://davinci.crg.es/deafness/>.
170. **Deafness Variation Database.** In <http://deafnessvariationdatabase.org/>.
171. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G: **Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses.** *Behavior research methods* 2009, **41**(4):1149-1160.
172. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nature methods* 2010, **7**(4):248-249.
173. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D: **MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age.** *Nat Meth* 2014, **11**(4):361-362.
174. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RKC, Feuk L, Scherer SW: **The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**(Database issue):D986-D992.
175. Yang H, Wang K: **Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR.** *Nat Protocols* 2015, **10**(10):1556-1566.

176. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E *et al*: **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015, **17**(5):405-424.
177. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB *et al*: **Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.** *Nature* 2016, **536**(7616):285-291.
178. Raz T, Labay V, Baron D, Szargel R, Anbinder Y, Barrett T, Rabl W, Viana MB, Mandel H, Baruchel A *et al*: **The spectrum of mutations, including four novel ones, in the thiamine-responsive megaloblastic anemia gene *SLC19A2* of eight families.** *Human Mutation* 2000, **16**(1):37-42.
179. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA: **A map of human genome variation from population-scale sequencing.** *Nature* 2010, **467**(7319):1061-1073.
180. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: **dbSNP: the NCBI database of genetic variation.** *Nucleic acids research* 2001, **29**(1):308-311.
181. Abboud MR, Alexander D, Najjar SS: **Diabetes mellitus, thiamine-dependent megaloblastic anemia, and sensorineural deafness associated with deficient α -ketoglutarate dehydrogenase activity.** *The Journal of pediatrics* 1985, **107**(4):537-541.
182. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN: **The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for**

- medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017;1-13.
183. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A: **OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)), an online catalog of human genes and genetic disorders.** *Nucleic acids research* 2015, **43**(Database issue):D789-798.
184. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J *et al*: **ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants.** *Nucleic acids research* 2016, **44**(D1):D862-868.
185. Fokkema IFAC, Taschner PEM, Schaafsma GCP, Celli J, Laros JFJ, den Dunnen JT: **LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases.** *Human Mutation* 2011, **32**(5):557-563.
186. **Genome.** In.: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
187. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP: **Integrative Genomics Viewer.** *Nature Biotechnology* 2011, **29**(1):24-26.
188. Li H, Durbin R: **Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.** *Bioinformatics* 2010, **26**(5):589-595.
189. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M *et al*: **A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data.** *Nature genetics* 2011, **43**(5):491-498.
190. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Álvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S *et al*: **A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in**

- subjects with *DFNB1* non-syndromic hearing impairment.** *Journal of Medical Genetics* 2005, **42**(7):588-594.
191. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T: **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics* 2005, **21**(13):2933-2942.
192. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP: **Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs.** *eLife* 2015, **4**:e05005.
193. Zuker M: **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(13):3406-3415.
194. Garrison E, Marth G: **Haplotype-based variant detection from short-read sequencing.** *arXiv preprint arXiv:12073907* 2012.
195. Team RC: **R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.** In.; 2015.
196. Dahl H, Saunders K, Kelly TM, Osborn AH, Wilcox S, Cone-Wesson B, Wunderlich JL, Du Sart D, Kamarinos M, Gardner RJ: **Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness.** *The Medical journal of Australia* 2001, **175**(4):191-194.
197. Hoefsloot LH, Roux A-F, Bitner-Glindzicz M: **EMQN Best practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the *DFNB1* locus.** *European Journal of Human Genetics* 2013, **21**(11):1325-1329.
198. Tang H-Y, Fang P, Ward PA, Schmitt E, Darilek S, Manolidis S, Oghalai JS, Roa BB, Alford RL: **DNA Sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls.** *American journal of medical genetics Part A* 2006, **140**(22):2401-2415.

199. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Milà M *et al*: **Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness**. *The Lancet* 1998, **351**(9100):394-398.
200. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H *et al*: **Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness**. *New England Journal of Medicine* 1998, **339**(21):1500-1505.
201. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S-i: **GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation**. *Human Genetics* 2003, **112**(4):329-333.
202. Tekin M, Xia X-J, Erdenetungalag R, Cengiz FB, White TW, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Tastan H, Nance WE, Pandya A: **GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the Deaf**. *Annals of Human Genetics* 2010, **74**(2):155-164.
203. Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbonés ML, Gasparini P, Estivill X: **Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene**. *Hum Genet* 2000, **106**(1):40-44.
204. Kupka S, Braun S, Aberle S, Haack B, Ebauer M, Zeißler U, Zenner H-P, Blin N, Pfister M: **Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment**. *Human Mutation* 2002, **20**(1):77-78.
205. Marlin S, Feldmann D, Blons H, et al.: **Gjb2 and gjb6 mutations: Genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients**. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 2005, **131**(6):481-487.

206. Seeman P, Malíková M, Rašková D, Bendová O, Groh D, Kubálková M, Sakmaryová I, Seemanová E, Kabelka Z: **Spectrum and frequencies of mutations in the *GJB2* (Cx26) gene among 156 Czech patients with prelingual deafness.** *Clinical Genetics* 2004, **66**(2):152-157.
207. Wiszniewski W, Sobieszczanska-Radoszewska L, Nowakowska-Szyrwinska E, Obersztyn E, Bal J: **High frequency of *GJB2* gene mutations in Polish patients with prelingual nonsyndromic deafness.** *Genetic Testing* 2001, **5**(2):147-148.
208. Sterna O, Pronina N, Grinfelde I, Kuske S, Krumina A, Lugovska R, Petersons A: **Spectrum and frequency of the *GJB2* gene mutations among Latvian patients with prelingual nonsyndromic hearing loss.** *Proc Latvian Acad Sci, Section B*, 2009, **63**(4/5):198-203.
209. Danilenko N, Merkulava E, Siniauskaya M, Olejnik O, Levaya-Smaliak A, Kushniarevich A, Shymkevich A, Davydenko O: **Spectrum of genetic changes in patients with non-syndromic hearing impairment and extremely high carrier frequency of 35delG *GJB2* mutation in Belarus.** *PLoS ONE* 2012, **7**(5):e36354.
210. Minárik G, Tretinárová D, Szemes T, Kádasi E: **Prevalence of *DFNB1* mutations in Slovak patients with non-syndromic hearing loss.** *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2012, **76**(3):400-403.
211. Rădulescu L, Mârțu C, Birkenhäger R, Cozma S, Ungureanu L, Laszig R: **Prevalence of mutations located at the *dfnb1* locus in a population of cochlear implanted children in eastern Romania.** *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2012, **76**(1):90-94.
212. Teek R, Kruustük K, Zordania R, Joost K, Reimand T, Möls T, Oitmaa E, Kahre T, Tõnisson N, Õunap K: **Prevalence of c.35delG and p.M34T mutations in the *GJB2* gene in Estonia.** *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2010, **74**(9):1007-1012.

213. Bliznetz E, Galkina V, Matyushchenko G, Kisina A, Markova T, Polyakov A: **Changes in the connexin 26 (*GJB2*) gene in Russian patients with hearing disorders: results of long-term molecular diagnostics of hereditary nonsyndromic deafness.** *Genetika* 2012, **48**(1):112-124.
214. Siem G, Fagerheim T, Jonsrud C, Laurent C, Teig E, Harris S, Leren TP, Früh A, Heimdal K: **Causes of hearing impairment in the Norwegian paediatric cochlear implant program.** *International Journal of Audiology* 2010, **49**(8):596-605.
215. Popova D, Kaneva R, Varbanova S, Popov T: **Prevalence of *GJB2* mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population.** *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2012, **269**(6):1589-1592.
216. Dzhemileva L, Khidiyatova I, Khusnutdinova E: **Molecular screening of deafness in populations and patients with nonsyndromic congenital deafness from the Volga-Ural region of Russia.** In: *Deafness, Hearing Loss and the Auditory System*. Edited by Krause DFaR: Nova Science Publishers, Inc.; 2009.
217. Tsukada K, Nishio S-y, Hattori M, Usami S-i: **Ethnic-Specific Spectrum of *GJB2* and *SLC26A4* Mutations: Their Origin and a Literature Review.** *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 2015, **124**(1 suppl):61S-76S.
218. Bliznets EA, Marcul' DN, Khorov OG, Markova TG, AV P: **The mutation spectrum of the *GJB2* gene in Belarussian patients with hearing loss. Results of pilot genetic screening of hearing impairment in newborns.** *Genetika* 2014, **50**(2):214-221.
219. Stagg AR, Fleming JC, Baker MA, Sakamoto M, Cohen N, Neufeld EJ: **Defective high-affinity thiamine transporter leads to cell death in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome fibroblasts.** *The Journal of Clinical Investigation* 1999, **103**(5):723-729.

220. Griffith AJ, Friedman TB: **Auditory function and the m34t allele of connexin 26.** *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 2002, **128**(1):94-94.
221. Bicego M, Beltramello M, Melchionda S, Carella M, Piazza V, Zelante L, Bukauskas FF, Arslan E, Cama E, Pantano S *et al*: **Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26.** *Human molecular genetics* 2006, **15**(17):2569-2587.
222. Hall A, Pembrey M, Lutman M, Steer C, Bitner-Glindzicz M: **Prevalence and audiological features in carriers of GJB2 mutations, c.35delG and c.101T>C (p.M34T), in a UK population study.** *BMJ Open* 2012, **2**(4).
223. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ: **Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss.** *American Journal of Human Genetics* 1998, **62**(4):792-799.
224. Roux A-F, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, Artières F, Lina G, Molinari N, Blanchet P *et al*: **Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France.** *BMC Medical Genetics* 2004, **5**:5-5.
225. Wattanasirichaigoon D, Limwongse C, Jariengprasert C, Yenchtsomanus PT, Tocharoenthanaphol C, Thongnoppakhun W, Thawil C, Charoenpipop D, Pho-iam T, Thongpradit S *et al*: **High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals.** *Clinical Genetics* 2004, **66**(5):452-460.
226. Li L, Lu J, Tao Z, Huang Q, Chai Y, Li X, Huang Z, Li Y, Xiang M, Yang J *et al*: **The p.V37I exclusive genotype of GJB2: a genetic risk-indicator of postnatal permanent childhood hearing impairment.** *PLoS ONE* 2012, **7**(5):e36621.
227. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR: **ClinVar: public archive of relationships among sequence**

- variation and human phenotype.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**(Database issue):D980-D985.
228. Dahl Hans-Henrik M SK, Kelly Therese M, Osborn Amelia H, Wilcox Stephen, Cone-Wesson Barbara, Wunderlich Julia L, Du Sart Desiree, Kamarinos Maria, McKinlay Gardner Robert J, Dennehy Shirley, Williamson Robert, Vallance Neil, Mutton Patricia: **Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness** *Med J Aust* 2001 Aug 20, **175**(4):191-194.
229. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y: **The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses.** *Current Protocols in Bioinformatics* 2016:1.30. 31-31.30. 33.
230. Houseman MJ, Ellis LA, Pagnamenta A, Di W-L, Rickard S, Osborn AH, Dahl H-HM, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, Reardon W: **Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss.** *Journal of medical genetics* 2001, **38**(1):20-25.
231. Matos TD, Caria H, Simões-Teixeira H, Aasen T, Nickel R, Jagger D, O'Neill A, Kelsell D, Fialho G: **A novel hearing loss-related mutation occurring in the GJB2 basal promoter.** *Journal of medical genetics* 2007, **44**(11):721-725.
232. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y: **Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2013, **1828**(1):118-133.
233. Matos T, Simões-Teixeira H, Caria H, Cascão R, Rosa H, O'Neill A, Dias O, Andrea M, Kelsell D, Fialho G: **Assessing noncoding sequence variants of GJB2 for hearing loss association.** *Genetics research international* 2011, **2011**.

234. Sirnes S, Honne H, Ahmed D, Danielsen SA, Rognum TO, Meling GI, Leithe E, Rivedal E, Lothe RA, Lind GE: **DNA methylation analyses of the connexin gene family reveal silencing of *GJC1* (Connexin45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer.** *Epigenetics* 2011, **6**(5):602-609.
235. Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, Fischer JJ, Zhang Q, Krueger T, Lange M, Tönjes M, Dunkel I, Sperling SR: **The cardiac transcription network modulated by *Gata4*, *Mef2a*, *Nkx2.5*, *Srf*, histone modifications, and microRNAs.** *PLoS Genet* 2011, **7**(2):e1001313.
236. Ballana E, Morales E, Rabionet R, Montserrat B, Ventayol M, Bravo O, Gasparini P, Estivill X: **Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **341**(4):950-957.
237. Li R, Greinwald J, Yang L, Choo D, Wenstrup R, Guan M: **Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNASer (UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss.** *Journal of medical genetics* 2004, **41**(8):615-620.
238. Tang H-Y, Basehore MJ, Blakey GL, Darilek S, Oghalai JS, Roa BB, Fang P, Alford RL: **Infrequency of two deletion mutations at the *DFNB1* locus in patients and controls.** *American journal of medical genetics Part A* 2008, **146**(7):934.
239. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Álvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F: **A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment.** *New England Journal of Medicine* 2002, **346**(4):243-249.
240. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G: **Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA**

- diagnostics?** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009, **681**(2):189-196.
241. Lin X, Tang W, Ahmad S, Lu J, Colby CC, Zhu J, Yu Q: **Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities.** *Hearing research* 2012, **288**(0):10.1016/j.heares.2012.1001.1004.
242. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G: **Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?** *Mutation research* 2009, **681**(2-3):189-196.
243. Pourová R, Janoušek P, Jurovčík M, Dvořáková M, Malíková M, Rašková D, Bendová O, Leonardi E, Murgia A, Kabelka Z *et al*: **Spectrum and frequency of SLC26A4 mutations among Czech Patients with early hearing loss with and without enlarged vestibular aqueduct (EVA).** *Annals of Human Genetics* 2010, **74**(4):299-307.
244. Dahl H-HM, Ching TYC, Hutchison W, Hou S, Seeto M, Sjahalam-King J: **Etiology and audiological outcomes at 3 years for 364 children in Australia.** *PLoS ONE* 2013, **8**(3):e59624.
245. Schrauwen I, Sommen M, Corneveaux JJ, Reiman RA, Hackett NJ, Claes C, Claes K, Bitner- Glindzicz M, Coucke P, Van Camp G: **A sensitive and specific diagnostic test for hearing loss using a microdroplet PCR-based approach and next generation sequencing.** *American Journal of Medical Genetics Part A* 2013, **161**(1):145-152.
246. Sloan-Heggen CM, Babanejad M, Beheshtian M, Simpson AC, Booth KT, Ardalani F, Frees KL, Mohseni M, Mozafari R, Mehrjoo Z: **Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran.** *Journal of medical genetics* 2015:jmedgenet-2015-103389.
247. Schultz JM, Bhatti R, Madeo AC, Turriff A, Muskett JA, Zalewski CK, King KA, Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad N *et al*: **Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher**

- syndrome USH1D in compound heterozygotes. *Journal of Medical Genetics* 2011, **48**(11):767-775.**
248. Kwon T-J, Oh S-K, Park H-J, Sato O, Venselaar H, Choi SY, Kim S, Lee K-Y, Bok J, Lee S-H: **The effect of novel mutations on the structure and enzymatic activity of unconventional myosins associated with autosomal dominant non-syndromic hearing loss.** *Open biology* 2014, **4**(7):140107.
249. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Corneveaux JJ, Ende J, Boudewyns A, Leenheer E, Janssens S, Claes K: **DNA diagnostics of hereditary hearing loss: a targeted resequencing approach combined with a mutation classification system.** *Human mutation* 2016, **37**(8):812-819.
250. Battelino S, Klancar G, Kovac J, Battelino T, Trebusak Podkrajsek K: **TMPRSS3 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.** *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2016, **273**(5):1151-1154.
251. Bademci G, Foster II J, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, Menendez I, Diaz-Horta O, Shirkavand A, Zeinali S: **Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort.** *Genetics in Medicine* 2015.
252. Bademci G, Cengiz F, Foster II J, Duman D, Sennaroglu L, Diaz-Horta O, Atik T, Kirazli T, Olgun L, Alper H: **Variations in multiple syndromic deafness genes mimic non-syndromic hearing loss.** *Scientific Reports* 2016, **6**.
253. Park H, Shaukat S, Liu XZ, Hahn S, Naz S, Ghosh M, Kim H, Moon S, Abe S, Tukamoto K: **Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness.** *Journal of medical genetics* 2003, **40**(4):242-248.
254. Yan D, Tekin D, Bademci G, Foster J, Cengiz FB, Kannan-Sundhari A, Guo S, Mittal R, Zou B, Grati M: **Spectrum of DNA variants for non-**

- syndromic deafness in a large cohort from multiple continents.** *Hum Genet* 2016, **135**(8):953-961.
255. Kim BJ, Kim AR, Lee C, Kim SY, Kim NK, Chang MY, Rhee J, Park M-H, Koo SK, Kim MY: **Discovery of *CDH23* as a significant contributor to progressive postlingual sensorineural hearing loss in Koreans.** *PloS one* 2016, **11**(10):e0165680.
256. Wattenhofer M, Di Iorio M, Rabionet R, Dougherty L, Pampanos A, Schwede T, Montserrat-Sentis B, Arbones M, Iliades T, Pasquadibisceglie A: **Mutations in the *TMPRSS3* gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients.** *Journal of molecular medicine* 2002, **80**(2):124-131.
257. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC: **Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment.** *Journal of Clinical Virology* 2008, **41**(2):57-62.
258. Shearer AE, Smith RJ: **Massively parallel sequencing for genetic diagnosis of hearing loss: the new standard of care.** *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 2015, **153**(2):175-182.
259. Departamentas LS: **Oficialiosios statistikos portalas** In <https://osp.stat.gov.lt/>.
260. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A *et al*: ***GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study.** *American Journal of Human Genetics* 2005, **77**(6):945-957.
261. Schimmenti LA, Martinez A, Telatar M, Lai C-H, Shapiro N, Fox M, Warman B, McCarra M, Crandall B, Sininger Y *et al*: **Infant hearing loss and connexin testing in a diverse population.** *Genet Med* 2008, **10**(7):517-524.
262. Beck C, Pérez-Álvarez JC, Sigruener A, Haubner F, Seidler T, Aslanidis C, Strutz J, Schmitz G: **Identification and genotype/phenotype correlation**

- of mutations in a large German cohort with hearing loss. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2015, **272**(10):2765-2776.
263. **Orphanet** [<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>]
264. Mozzillo E, Melis D, Falco M, Fattorusso V, Taurisano R, Flanagan SE, Ellard S, Franzese A: **Thiamine responsive megaloblastic anemia: a novel *SLC19A2* compound heterozygous mutation in two siblings.** *Pediatric Diabetes* 2013, **14**(5):384-387.
265. Pichler H, Zeitlhofer P, Dworzak M, Diakos C, Haas O, Kager L: **Thiamine-responsive megaloblastic anemia (TRMA) in an Austrian boy with compound heterozygous *SLC19A2* mutations.** *Eur J Pediatr* 2012, **171**(11):1711-1715.
266. **Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)** [<http://www.omim.org/entry/249270>]
267. Bergmann AK, Sahai I, Falcone JF, Fleming J, Bagg A, Borgna-Pignati C, Casey R, Fabris L, Hexner E, Mathews L: **Thiamine-responsive megaloblastic anemia: identification of novel compound heterozygotes and mutation update.** *The Journal of pediatrics* 2009, **155**(6):888-892. e881.
268. Rogers LE, Porter FS, Sidbury Jr JB: **Thiamine-responsive megaloblastic anemia.** *The Journal of pediatrics* 1969, **74**(4):494-504.
269. Neufeld EJ, Mandel H, Raz T, Szargel R, Yandava CN, Stagg A, Fauré S, Barrett T, Buist N, Cohen N: **Localization of the gene for thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome, on the long arm of chromosome 1, by homozygosity mapping.** *The American Journal of Human Genetics* 1997, **61**(6):1335-1341.
270. Fleming JC, Tartaglini E, Steinkamp MP, Schorderet DF, Cohen N, Neufeld EJ: **The gene mutated in thiamine-responsive anaemia with diabetes and deafness (TRMA) encodes a functional thiamine transporter.** *Nat Genet* 1999, **22**(3):305-308.

271. Oishi K, Hofmann S, Diaz GA, Brown T, Manwani D, Ng L, Young R, Vlassara H, Ioannou YA, Forrest D *et al*: **Targeted disruption of *Slc19a2*, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter Thtr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice.** *Human Molecular Genetics* 2002, **11**(23):2951-2960.
272. Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, Da Silva-Costa SM, Del Castillo I, Haaf T *et al*: **A novel *DFNB1* deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression.** *Clinical Genetics* 2010, **78**(3):267-274.
273. Liberman MC, Tartaglioni E, Fleming JC, Neufeld EJ: **Deletion of *SLC19A2*, the high affinity thiamine transporter, causes selective inner hair cell loss and an auditory neuropathy phenotype.** *JARO* 2006, **7**(3):211-217.
274. Feldmann D, Le Maréchal C, Jonard L, Thierry P, Czajka C, Couderc R, Ferec C, Denoyelle F, Marlin S, Fellmann F: **A new large deletion in the *DFNB1* locus causes nonsyndromic hearing loss.** *European Journal of Medical Genetics* 2009, **52**(4):195-200.
275. Liu G, Yang F, Han B, Liu J, Nie G: **Identification of four *SLC19A2* mutations in four Chinese thiamine responsive megaloblastic anemia patients without diabetes.** *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2014, **52**(4):203-204.
276. Yilmaz Agladioglu S1 AZ, Bas VN, Peltek Kendirci HN, Onder A.: **Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome: a novel mutation.** *Genetic counseling* 2012, **23**(2):149-156.
277. Ghaemi N GM, Abbaszadegan MR, Baradaran-Heravi A, Vakili R.: **Novel mutation in the *SLC19A2* gene in an Iranian family with thiamine-responsive megaloblastic anemia: A series of three cases.** *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 2013, **5**(3):199-201.

278. Majsnerowska M, Hänelt I, Wunnicke D, Schäfer Lars V, Steinhoff H-J, Slotboom Dirk J: **Substrate-induced conformational changes in the S-component ThiT from an energy coupling factor transporter.** *Structure* 2013, **21**(5):861-867.
279. Lonsdale D: **A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin (e) and its derivatives.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2006, **3**(1):49-59.
280. Subramanian VS, Mohammed ZM, Molina A, Marchant JS, Vaziri ND, Said HM: **Vitamin B1 (thiamine) uptake by human retinal pigment epithelial (ARPE- 19) cells: mechanism and regulation.** *The Journal of physiology* 2007, **582**(1):73-85.
281. Zhao R, Goldman ID: **Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (*SLC19A1-3* and *SLC46A1*) and folate receptors.** *Molecular Aspects of Medicine* 2013, **34**(2–3):373-385.
282. Stelma F, Bhutta M: **Non-syndromic hereditary sensorineural hearing loss: review of the genes involved.** *The Journal of Laryngology & Otology* 2014, **128**(01):13-21.
283. Practice P, Committee G: **American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss.** *Genetics in Medicine* 2014, **16**(4):347-355.

PRIEDAI

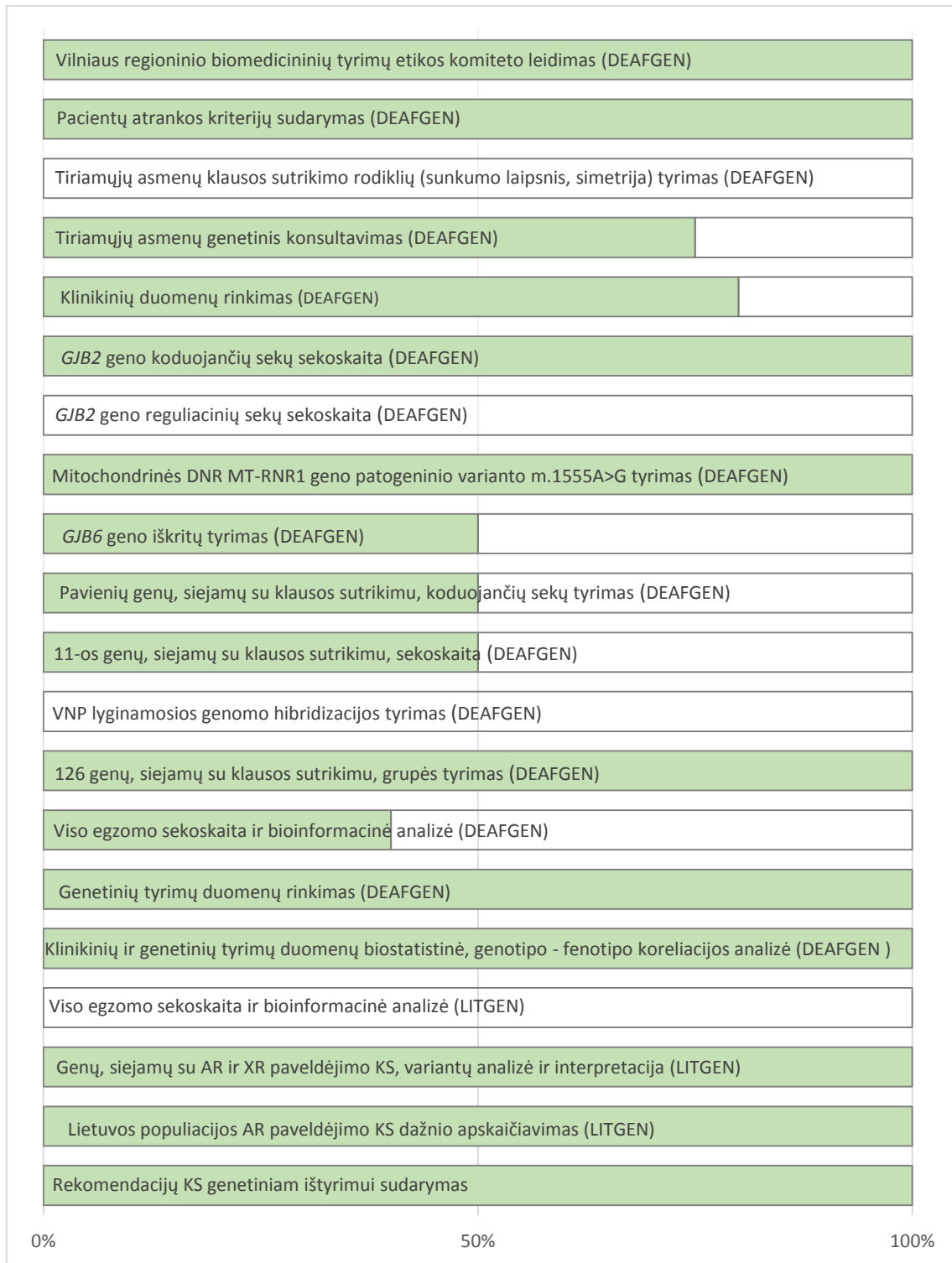
1 priedas. Mokslinės duomenų bazės

Duomenų bazės pavadinimas	Interneto puslapio adresas	Trumpas apibūdinimas
Bendrosios duomenų bazės		
Nacionalinio biotechnologijų informacijos centro duomenų bazės (angl. <i>NCBI – National Center for Biotechnology Information</i>)	Books	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/ Laisva knygų ir dokumentų, susijusių su gyvybės mokslais ir sveikatos priežiūra, prieiga
	ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ Informacija apie genomo variantų sąsajas su žmogaus sveikata
	dbVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/ Genomo struktūros įvairovės – intarpų, iškritų, inversijų, judriųjų elementų intarpų, translokacijų ir sudėtinių chromosominių persitvarkymų duomenų bazė
	Gene	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ Daugelio organizmų genų nomenklatūra, referentinės sekos, genolapiai, signaliniai keliai, variantai, fenotipai, nuorodos į kitas genotipo, genetinės srities, fenotipo duomenų bases
	Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ Daugiau kaip 27 milijonų medicinos mokslo publikacijų iš MEDLINE, gyvybės mokslų žurnalų, elektroninių knygų
	OMIM	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ Išsami žmogaus genų ir fenotipų santrauka
	SNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ Vieno nukleotido polimorfizmų (VNP), smulkių intarpų/iškritų, mikrosatelitinių sekų, nepolimorfinių variantų duomenų bazė
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	Stuburinių (ir žmogaus) genomo naršyklė, naudinga lyginamosios genomikos, sekos įvairovės, raiškos reguliacijos tyrimams. Atliekama genų anotacija, dauginis sekų sulgiavimas, spėjama reguliacinė funkcija, kaupiama informacija apie patologiją
The Human Phenotype Ontology	http://human-phenotype-ontology.github.io/	Standartizuotas fenotipinių požymių apibūdinimo žodynas. Informacija, reikalinga klinikinei diagnostikai ir bioinformacinei fenotipo ir ląstelių/biocheminių mechanizmų sąsajų analizei
The Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	Informacija apie žinomus (publikuotus) genų, siejamų su paveldimomis ligomis, variantus su nuorodomis
Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl/3.0/home	Informacija apie žinomus (publikuotus) genų, siejamų su paveldimomis ligomis, variantus su nuorodomis

1 priedas (tęsinys). Mokslinės duomenų bazės

Duomenų bazės pavadinimas		Interneto puslapio adresas	Trumpas apibūdinimas
Specifinės (klausos sutrikimo) duomenų bazės			
Hereditary Hearing Loss Homepage		http://hereditaryhearingloss.org/	Naujausia informacija apie paveldimo klausos sutrikimo genetiką, pateikiamas visų žinomų genų, siejamų su nesindrominiu monogeniniu klausos sutrikimu, sąrašas su nuorodomis į mokslines publikacijas
Deafness Variation Database		http://deafnessvariationdatabase.org/	Išsami informacija apie sekos variantus, nustatytus genuose, siejamuose su klausos sutrikimu
Genų/genų grupių duomenų bazės	CHD7 database	https://molgenis51.gcc.rug.nl/	<i>Charge</i> s. geno variantų duomenų bazė
	The Connexin-deafness homepage	http://davinci.crg.es/deafness/index.php	Koneksinų genų variantų duomenų bazė

2 priedas. Mokslinio darbo vykdymo etapai (autorės indėlis pažymėtas žalia spalva)



3 priedas. Vilniaus regioninio biomedicinių tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti DEAFGEN biomedicininį tyrimą



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Vietoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. info@cf.vu.lt.
 Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.
 Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705,
 el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

**LEIDIMAS
 ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ**

2014-06-10 Nr.158200-14-739-255

Tyrimo pavadinimas: [GIMTO/PAVELDIMO KLAUSOS SUTRIKIMO GENOMIKA: [TAKA PATOGENEZELI, FENOTIPINEI IŠRAIŠKAI, GYDYMO EFEKTYVUMUI]

Protokolo Nr.: 4
 Versija: 1
 Data: 2014-05-23
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Tėvams/globėjams
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Tėvams/globėjams (paštu)
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Tiriamajam suaugusiam
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Tiriamajam suaugusiam (paštu)
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Vaikui iki 12 m.
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma : Vaikui 12-18 m.
 Versija: 1
 Data: 2014-05-21
 Pagrindiniai tyrėjai: **Algirdas Utkus**
 Įstaigos pavadinimas: Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas
 Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius
 Leidimas galioja iki: 2024-08-31

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2014/06), vykusio 2014 m. birželio mėn. 10 d., sprendimu.

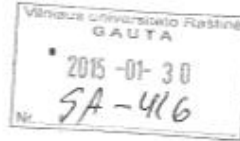
Vilniaus regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	Laura Linkevičienė	odontologija	taip
6	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
7	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	Eglė Zubienė	psichologija	ne
9	Ugnė Šakūnienė	psicentų teisės	ne

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

4 priedas. Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimas VU atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus



VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

Vilniaus universitetui
Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius
(registr. laišku ir el.p. algirdas.utkus@mf.vu.lt)

**SPRENDIMAS
DĖL LEIDIMO VILNIAUS UNIVERSITETUI ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO
VEIKSMUS**

2015 m. sausio 11 d. Nr. 2R-1447(2.6-1.)
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, išnagrinėjusi Vilniaus universiteto 2014-12-22 pateiktą Pranešimą Nr. 150000-SI-534 dėl išankstinės patikros dėl mokslinio biomedicininio tyrimo ir 2015-01-22 raštu pateiktus patikslinimus (Inspekcijoje gauta 2014-12-29, reg. Nr. 1R-8167 ir 2015-01-22, reg. Nr. 1R-590),

n u s t a t ė,

kad Vilniaus universiteto Pranešime ir patikslinimuose nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus, bei numatytos tinkamos organizacinės ir techninės duomenų saugumo priemonės.

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2006 m. vasario 2 d. įsakymu Nr. 1T-6 patvirtintų Išankstinės patikros atlikimo taisyklių 11 ir 18.1 punktais,

n u s p r e n d ž i a

Vilniaus universitetui išduoti leidimą atlikti Pranešime ir patikslinimuose nurodytų asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „Įgimto/paveldimo klausos sutrikimo genomika: įtaka patogenizei, fenotipinei išraiškai, gydymo efektyvumui“, prot. Nr.4, tikslu veiksmus.

Direktorius



dr. Algirdas Kuncinas

V. Perednienė, tel. (8 5) 219 7279, el. p. vanda.perednieno@ada.lt;
K. Prakupavičienė, tel. (8 5) 219 7265, el. p. kornelija.prakupaviciene@ada.lt



Biidžetinė įstaiga
A. Juozapavičiaus g. 6,
LT-09310 Vilnius

Tel. (8 5) 279 1445
Faks. (8 5) 261 9494
El. p. ada@ada.lt

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 188607912

5 priedas. 11-os genų grupės, tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

<i>Genas</i>	<i>Genetinė sritis</i>	<i>Fenotipas</i>	<i>MIM</i>	<i>Paveldėjimas</i>	
1	<i>CDH23</i>	10q22.1	AR paveldėjimo KS 12	601386	AR
			<i>Usher s.</i> , 1D tipas	601067	DR, AR
			<i>Usher s.</i> , 1D/F tipas digeninis	601067	DR, AR
2	<i>DFNB59</i>	2q31.2	AR paveldėjimo KS 59	610220	AR
3	<i>GJB6</i>	13q12.11	AD paveldėjimo KS 3B	612643	AD
			AR paveldėjimo KS 1B	612645	AR
			Digeninio paveldėjimo kurtumas GJB2/GJB6	220290	AR, DD
			Ektoderminė displazija 2, <i>Clouston</i> tipas	129500	AD
4	<i>MYO15A</i>	17p11.2	AR paveldėjimo KS 3	600316	AR
5	<i>OTOF</i>	2p23.3	Klausos neuropatija, AR paveldėjimo, 1	601071	AR
			AR paveldėjimo KS 9	601071	AR
6	<i>SLC26A4</i>	7q22.3	AR paveldėjimo KS 4, su prieangio latako išsiplėtimu	600791	AR
			<i>Pendred s.</i>	274600	AR
7	<i>TECTA</i>	11q23.3	AD paveldėjimo KS 8/12	601543	AD
			AR paveldėjimo KS 21	603629	AR
8	<i>TMC1</i>	9q21.13	AD paveldėjimo KS 36	606705	AD
			AR paveldėjimo KS 7	600974	AR
9	<i>TMIE</i>	3p21.31	AR paveldėjimo KS 6	600971	AR
10	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	AR paveldėjimo KS 8/10	601072	AR
11	<i>TRIOBP</i>	22q13.1	AR paveldėjimo KS 28	609823	AR

6 priedas. 126-ių genų grupės (*Deafness research v2 rinkinys*, gamintojas *ThermoFisher Scientific*, JAV), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

Nr.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
1	ACTG1	17q25.3	<i>Baraitser–Winter</i> s. 2	614583	AD
			AD paveldėjimo KS 20/26	604717	AD
2	ADCY1	7p12.3	?AR paveldėjimo KS 44	610154	AR
3	AIFM1	Xq26.1	Sudėtinė oksidacinio fosforilinimo stoka 6	300816	XR
			<i>Cowchock</i> s.	310490	XLR
			XR paveldėjimo KS 5	300614	XLR
4	ATP6VOA4	7q34	AR paveldėjimo inkstų distalinė tubulinė acidozė	602722	AR
5	ATP6V1B1	2p13.3	AR paveldėjimo inkstų distalinė tubulinė acidozė su kurtumu	267300	AR
6	BSND	1p32.3	<i>Barter</i> s., 4a tipas	602522	AR
7	CABP2	11q13.2	AR paveldėjimo KS 93	614899	AR
8	CACNA1D	3p21.1	Pirminis aldosteronizmas, traukuliai ir neurologinė patologija	615474	AD
			Sinusinio mazgo disfunkcija ir kurtumas	614896	AR
9	CCDC50	3q28	?AD paveldėjimo KS 44	607453	AD
10	CDH23	10q22.1	AR paveldėjimo KS 12	601386	AR
			<i>Usher</i> s., 1D tipas	601067	DR, AR
			<i>Usher</i> s., 1D/F tipas digeninis	601067	DR, AR
11	CEACAM1 6	19q13.31- q13.32	AD paveldėjimo KS 4B	614614	AD
12	CHD7	8q12.2	<i>CHARGE</i> s.	214800	AD
			Hipopogonadotropinis hipogonadizmas 5 su anosmija ar be jos	612370	
13	CIB2	15q25.1	AR paveldėjimo KS 48	609439	AR
			<i>Usher</i> s., IJ tipas	614869	AR
14	CLDN14	21q22.13	AR paveldėjimo KS 29	614035	AR
15	CLPP	19p13.3	<i>Perrault</i> s. 3	614129	AR
16	CLRNI	3q25.1	Pigmentinis retinitas 61	614180	
			<i>Usher</i> s., 3A tipas	276902	AR
17	COCH	14q12	AD paveldėjimo KS 9	601369	AD
18	COL11A1	1p21.1	Fibrochondrogenėzė 1	228520	AR
			<i>Marshall</i> s.	154780	AD
			<i>Stickler</i> s., II tipas	604841	AD
19	COL11A2	6p21.32	AD paveldėjimo KS 13	601868	AD
			AR paveldėjimo KS 53	609706	AR
			Fibrochondrogenėzė 2	614524	AD, AR
			Otospondilomegaepifizinė displasija	215150	AR
			<i>Stickler</i> s., III tipas	184840	AD
<i>Weissenbacher–Zweymuller</i> s.	277610	AD			

6 priedas (tęsinys). 126-ių genų grupės (*Deafness research v2 rinkinys*, gamintojas *ThermoFisher Scientific*, JAV), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

Nr.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
20	COL2A1	12q13.11	Achondrogenezė, II tipas arba hipochondrogenezė	200610	AD
			Avaskulinė šlaunikaulio galvutės nekrozė	608805	AD
			Czech displazija	609162	AD
			Dauginė epifizinė displazija, su miopija ir kurtumu	132450	AD
			Kniest displazija	156550	AD
			Legg-Calve-Perthes liga	150600	AD
			Osteoartritas su lengva chondrodysplazija	604864	AD
			Otospondilomegapifizinė displazija	215150	AR
			Platispondilinė skeleto displazija, Torrance tipo	151210	AD
			Igimtas SED	183900	AD
			Strudwick tipo SMED	184250	AD
			Spondiloepifizinė displazija, Stanescu tipo	616583	AD
			Spondiloperiferinė displazija	271700	AD
			Stickler s., I tipas, nesindrominis akių pažeidimas	609508	AD
			Stickler s., I tipas	108300	AD
21	COL4A3	2q36.3	Vitreoretinopatija su pirštakaulių epifizinė displazija		
			AD paveldėjimo Alport s.	104200	AD
			AR paveldėjimo Alport s.	203780	AR
22	COL4A4	2q36.3	Hematurija, gerybinė šeiminė	141200	AD
			AR paveldėjimo Alport s.	203780	AR
23	COL4A5	Xq22.3	Hematurija, gerybinė šeiminė		
			Alport s.	301050	XD
24	COL9A1	6q13	?Epifizinė displazija, dauginė, 6	614135	AD
			Stickler s., IV tipas	614134	
25	COL9A2	1p34.2	?Stickler s., V tipas	614284	AR
			Epifizinė displazija, dauginė, 2	600204	AD
26	CRYM	16p12.2	AD paveldėjimo KS 40	616357	AD
27	DFNA5	7p15.3	AD paveldėjimo KS 5	600994	AD
28	DFNB31	9q32	AR paveldėjimo KS 31	607084	AR
			Usher s., 2D tipas	611383	AR
29	DFNB59	2q31.2	AR paveldėjimo KS 59	610220	AR
30	DIABLO	12q24.31	AD paveldėjimo KS 64	614152	AD
31	DIAPH1	5q31.3	AD paveldėjimo KS 1	124900	AD
			Traukulių, žievinio aklumo, mikrocefalijos s.	616632	AR
32	DIAPH3	13q21.2	AD paveldėjimo klausos neuropatija, I	609129	AD
33	DSPP	4q22.1	AD paveldėjimo KS 39, su dentinogeneze	605594	AD
			Dentino displazija, II tipas	125420	AD
			Dentinogenezės sutrikimas, Shields II tipas	125490	AD
			Dentinogenezės sutrikimas, Shields III tipas	125500	AD
34	EDN3	20q13.32	Centrinis hipoventiliacijos s., igimtas	209880	AD
			Waardenburg s., 4B tipas	613265	AD, AR
			{Hirschsprung liga, polinkis,	613712	
35	EDNRB	13q22.3	ABCD s.	600501	AR
			Waardenburg s., tipas 4A	277580	AD, AR
			{Hirschsprung liga, polinkis, 2}	600155	AR

6 priedas (tęsinys). 126-ių genų grupės (*Deafness research v2* rinkinys, gamintojas *ThermoFisher Scientific, JAV*), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
36	<i>ESPN</i>	1p36.31	AR paveldėjimo KS 36 AD paveldėjimo KS	609006	AR
37	<i>ESRRB</i>	14q24.3	AR paveldėjimo KS 35	608565	AR
38	<i>EYA1</i>	8q13.3	?Otofaciocervikalinis s. Viršutinio segmento anomalijos su katarakta ar be jos Branchiootinis s. 1 Branchiootorenalinis s. 1, su katarakta ar be jos	166780 602588 602588 113650	AD AD AD AD
39	<i>EYA4</i>	6q23.2	Dilatacinė kardiomiopatija, 1J tipas AD paveldėjimo KS 10	605362 601316	AD AD
40	<i>FGF3</i>	11q13.3	Igimtas kurtumas su vidinės ausies agenize, mikrotija ir mikrodontija	610706	AR
41	<i>FOX11</i>	5q35.1	Prieangio latako išsiplėtimas	600791	AR
42	<i>GATA3</i>	10p14	Hipoparatiroidizmas, neurosensorinis kurtumas ir inkstų displazija	146255	AD
43	<i>GIPC3</i>	19p13.3	AR paveldėjimo KS 15	601869	AR
44	<i>GJB2</i>	13q12.11	<i>Bart–Pumphrey</i> s. AD paveldėjimo KS 3A AR paveldėjimo KS 1A Žvyninė ichtiozė su kurtumu Keratito, ichtiozės, kurtumo s. Palmoplantarinė keratoderma su kurtumu <i>Vohwinkel</i> s.	149200 601544 220290 602540 148210 148350 124500	AD AD AR, DD AD AD AD AD
45	<i>GJB3</i>	1p34.3	AD paveldėjimo KS 2B 1p34.3, su periferine neuropatija AR paveldėjimo KS Digeninio paveldėjimo kurtumas, GJB2/GJB3 Progresuojanti eritrokeratoderma	612644 220290 133200	AD AD, DD AD, AR
46	<i>GJB6</i>	13q12.11	AD paveldėjimo KS 3B AR paveldėjimo KS 1B Digeninio paveldėjimo kurtumas GJB2/GJB6 Ektoderminė displazija 2, <i>Clouston</i> tipas	612643 612645 220290 129500	AD AR AR, DD AD
47	<i>GPR98</i>	5q14.3 5q14.3 10q24.31	<i>Usher</i> s., 2C tipas, GPR98/PDZD7 digeninis <i>Usher</i> s., 2C tipas <i>Usher</i> s., IIC tipas, GPR98/PDZD7 digeninis	605472 605472 605472	AR, DD AR, DD AR, DD
48	<i>GPSM2</i>	1p13.3	<i>Chudley–McCullough</i> s.	604213	AR
49	<i>GRHL2</i>	8q22.3	AD paveldėjimo KS 28 Ektoderminės displazijos/žemo ūgio s.	608641 616029	AD AR
50	<i>GRXC1</i>	4p13	AR paveldėjimo KS 25	613285	AR
51	<i>HARS</i>	5q31.3	<i>Charcot–Marie–Tooth</i> liga, aksoninio tipo 2W <i>Usher</i> s., 3B tipas	616625 614504	AD AR
52	<i>HARS2</i>	5q31.3	? <i>Perrault</i> s. 2	614926	AR
53	<i>HGF</i>	7q21.11	AR paveldėjimo KS 39	608265	AR
54	<i>HOXA1</i>	7p15.2	Atabaskų smegenų kamieno disgenezės s. <i>Bosley–Salih–Alorainy</i> s.	601536 601536	AR AR

6 priedas (tęsinys). 126-ių genų grupės (*Deafness research v2* rinkinys, gamintojas *ThermoFisher Scientific, JAV*), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
55	<i>HOXA2</i>	7p15.2	?Mikrotija su klausos sutrikimu ar be jo (AD)	612290	AD, AR
			?Mikrotija, klausos sutrikimas, gomurio nesuaugimas (AR)	612290	AD, AR
56	<i>HSD17B4</i>	5q23.1	D-bifunkcinio baltymo stoka	261515	AR
			Perrault s. 1	233400	AR
57	<i>IGF1</i>	12q23.2	Augimo atsilikimas su kurtumu ir intelektine negalia dėl IGF1 stokos	608747	AR
58	<i>ILDR1</i>	3q13.33	AR paveldėjimo KS 42	609646	AR
59	<i>KCNE1</i>	21q22.12	<i>Jervell</i> ir <i>Lange-Nielsen</i> s. 2	612347	AR
			Ilgo QT s. 5	613695	AD
60	<i>KCNJ10</i>	1q23.2	Prieangio latako išsiplėtimas, digeninis	600791	AR
			<i>SESAME</i> s.	612780	AR
61	<i>KCNQ1</i>	11p15.5- p15.4	Prieširdžių virpėjimas, šeiminis, 3	607554	AD
			<i>Jervell</i> ir <i>Lange-Nielsen</i> s.	220400	AR
			Ilgo QT s. 1	192500	AD
			Trumpo QT s. 2	609621	AD
			{Ilgo QT s. 1, įgytas, polinkis}	192500	AD
62	<i>KCNQ4</i>	1p34.2	AD paveldėjimo KS 2A	600101	AD
63	<i>KIAA1199</i>	15q25.1	Izoliuotas klausos sutrikimas		
64	<i>LARS2</i>	3p21.31	?Vandenė, laktatinė acidozė ir sideroblastinė anemija	617021	AR
			<i>Perrault</i> s. 4	615300	AR
65	<i>LHFPL5</i>	6p21.31	AR paveldėjimo KS 67	610265	AR
66	<i>LHX3</i>	9q34.3	Hipofizės hormonų stoka, sudėtinė, 3	221750	AR
67	<i>LOXHD1</i>	18q21.1	AR paveldėjimo KS 77	613079	AR
68	<i>LRTOMT</i>	11q13.4	AR paveldėjimo KS 63	611451	AR
69	<i>MARVELD2</i>	5q13.2	AR paveldėjimo KS 49	610153	AR
70	<i>MITF</i>	3p13	<i>COMMAD</i> s.	617306	AR
			<i>Tietz</i> albinizmo ir kurtumo s.	103500	AD
			<i>Waardenburg</i> s., 2A tipas	193510	AD
			<i>Waardenburg</i> s./akių albinizmas, digeninis {Melanoma, odos, polinkis, 8}	103470	AD
71	<i>MYH14</i>	19q13.33	?Periferinė neuropatija, miopatija, užkimimas ir klausos sutrikimas	614369	AD
			AD paveldėjimo KS 4A	600652	AD
72	<i>MYH9</i>	22q12.3	AD paveldėjimo KS 17	603622	AD
			<i>Epstein</i> s.	153650	AD
			<i>Fechtner</i> s.	153640	AD
			Makrotrombocitopenija ir progresuojantis neurosensorinis kurtumas	600208	AD
			<i>May-Hegglin</i> anomalija	155100	AD
			Sebastian s.	605249	AD
73	<i>MYO1A</i>	12q13-q14	AD paveldėjimo KS 48	607841	AD
74	<i>MYO3A</i>	10p12.1	AR paveldėjimo KS 30	607101	AR

6 priedas (tęsinys). 126-ių genų grupės (*Deafness research v2* rinkinys, gamintojas *ThermoFisher Scientific, JAV*), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
75	MYO7A	11q13.5	AD paveldėjimo KS 11	601317	AD
			AR paveldėjimo KS 2	600060	AR
			<i>Usher s.</i> , 1B tipas	276900	AR
76	MYO15A	17p11.2	AR paveldėjimo KS 3	600316	AR
77	MYO6	6q14.1	AD paveldėjimo KS 22	606346	AD
			AD paveldėjimo KS 22, su hipertrofine kardiomiopatija	606346	AD
			AR paveldėjimo KS 37	607821	AR
78	MIR96	7q32.2	AD paveldėjimo KS 50	613074	AD
79	MSRB3	12q14.3	AR paveldėjimo KS 74	613718	AR
80	MTAP	9p21.3	Diafizinė medulinė stenozė su piktybine fibrozine histiocitoma	112250	AD
81	NDP	Xp11.3	Eksudacinė vitreoretinopatija 2, XR paveld.	305390	XR
			<i>Norrie</i> liga	310600	
82	OTOA	16p12.2	AR paveldėjimo KS 22	607039	AR
83	OTOF	2p23.3	Klausos neuropatija, AR paveldėjimo, 1	601071	AR
			AR paveldėjimo KS 9	601071	AR
84	OTOG	11p15.1	AR paveldėjimo KS 18B	614945	AR
85	OTOGL	12q21.31	AR paveldėjimo KS 84B	614944	AR
86	P2RX2	12q24.33	AD paveldėjimo KS 41	608224	AD
87	PAX3	2q36.1	Kraniofacialinis-kurtumo-rankos s.	122880	AD
			Rabdomiosarkoma 2, alveolinė	268220	AR
			<i>Waardenburg s.</i> , 1 tipas	193500	AD
			<i>Waardenburg s.</i> , 3 tipas	148820	AD, AR
88	PCDH15	2q36.1	AR paveldėjimo KS 23	609533	AR
			<i>Usher s.</i> , 1D/F tipas, digeninis	601067	AR, DR
			<i>Usher s.</i> , 1F tipas	602083	AR
89	PDZD7	10q24.31	<i>Usher s.</i> , IIC tipas, GPR98/PDZD7 digeninis {Tinklainės ligos modifikatorius (<i>Usher s.</i> IIA t.)}	605472	AR, DD
			276901	AR	
90	PEX6	6p21.1	<i>Heimler s.</i> 2	616617	AR
			Peroksisomų biogenezės sutrikimas 4A (<i>Zellweger</i>)	614862	AR
			Peroksisomų biogenezės sutrikimas 4B	614863	AR
91	PNPT1	2p16.1	Sudėtinė oksidacinio fosforilavimo stoka 13	614932	AR
			AR paveldėjimo KS 70	614934	AR
92	POLD1	19q13.33	Apatinio žandikaulio hipoplazijos, kurtumo, progeroidinių požymių ir lipodistrofijos s. {Storosios žarnos vėžys, polinkis, 10}	615381	AD
			612591	AD	
93	POU3F4	Xq21.1	XR paveldėjimo KS 2	304400	XR
94	POU4F3	5q32	AD paveldėjimo KS 15	602459	AD
95	PRPS1	Xq22.3	<i>Arts s.</i>	301835	XR
			<i>Charcot-Marie-Tooth</i> liga, XR paveldėjimo, 5	311070	XR
			XR paveldėjimo KS 1	304500	X
			Su PRPS susijusi podagra, Fosforibozilpirofosfato sintetazės hiperaktyvumas	300661	XR
300661	XR				
96	PTPRQ	12q21.31	AR paveldėjimo KS 84A	613391	AR
97	RDX	11q22.3	AR paveldėjimo KS 24	611022	AR
98	SCARF2	22q11.21	<i>Van den Ende-Gupta s.</i>	600920	AR

6 priedas (tęsinys). 126-ių genų grupės (*Deafness research v2* rinkinys, gamintojas *ThermoFisher Scientific, JAV*), tirtos naujos kartos sekoskaitos metodu, sąrašas

Nr.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
99	<i>SEMA3E</i>	7q21.11	? <i>CHARGE</i> s.	214800	AD
100	<i>SERPINB6</i>	6p25.2	?AR paveldėjimo KS 91	613453	AR
101	<i>SIX1</i>	14q23.1	Branchiootinis s. 3 AD paveldėjimo KS 23	608389 605192	AD AD
102	<i>SIX5</i>	19q13.32	Branchiootorenalinis s. 2	610896	
103	<i>SLC17A8</i>	12q23.1	AD paveldėjimo KS 25	605583	AD
104	<i>SLC26A4</i>	7q22.3	AR paveldėjimo KS 4, su prieangio latako išsiplėtimu <i>Pendred</i> s.	600791 274600	AR AR
105	<i>SLC26A5</i>	7q22.1	?AR paveldėjimo KS 61	613865	AR
106	<i>SLC4A11</i>	20p13	Ragenos distrofija, Fuchs endotelinio tipo, 4 Ragenos endotelio distrofija ir kurtumas AR paveldėjimo ragenos endotelio distrofija	613268 217400 217700	AR AR AR
107	<i>SMPX</i>	Xp22.12	XD paveldėjimo KS 4	300066	XD
108	<i>SNAI2</i>	8q11.21	Paibaldizmas <i>Waardenburg</i> s., 2D tipas	172800 608890	AD AR
109	<i>SOX10</i>	22q13.1	<i>PCWH</i> s. <i>Waardenburg</i> s., 2E tipas, su neurologine patologija ar be jos <i>Waardenburg</i> s., tipas 4C	609136 611584 613266	AD AD AD
110	<i>STRC</i>	15q15.3	AR paveldėjimo KS 16	603720	AR
111	<i>TCOF1</i>	5q32-q33	<i>Treacher-Collins</i> s. 1	154500	AD
112	<i>TECTA</i>	11q23.3	AD paveldėjimo KS 8/12 AR paveldėjimo KS 21	601543 603629	AD AR
113	<i>TJP2</i>	9q21.11	Cholestazė, progresuojanti šeiminė intrahepatinė 4 Hipercholanemija, šeiminė	615878 607748	AR AR
114	<i>TIMM8A</i>	Xq22.1	<i>Mohr-Tranebjaerg</i> s.	304700	XLR
115	<i>TMC1</i>	9q21.13	AD paveldėjimo KS 36 AR paveldėjimo KS 7	606705 600974	AD AR
116	<i>TMIE</i>	3p21.31	AR paveldėjimo KS 6	600971	AR
117	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	AR paveldėjimo KS 8/10	601072	AR
118	<i>TNC</i>	9q33.1	AD paveldėjimo KS 56	615629	AD
119	<i>TPRN</i>	9q34.3	AR paveldėjimo KS 79	613307	AR
120	<i>TRIOBP</i>	22q13.1	AR paveldėjimo KS 28	609823	AR
121	<i>TSPEAR</i>	21q22.3	AR paveldėjimo KS 98	614861	AR
122	<i>TSHZ1</i>	18q22.3	Igimta klausosmosios landos atrezija	607842	AD
123	<i>USH1C</i>	11p15.1	AR paveldėjimo KS 18A <i>Usher</i> s., 1C tipas	602092 276904	AR AR
124	<i>USH1G</i>	17q25.1	<i>Usher</i> s., 1G tipas	606943	AR
125	<i>USH2A</i>	1q41	Pigmentinis retinitas 39 <i>Usher</i> s., 2A tipas	613809 276901	AR AR
126	<i>WFS1</i>	4p16.1	?Katarakta 41 AD paveldėjimo KS 6/14/38 <i>Wolfram</i> s. Panašus į <i>Wolfram</i> s., AD paveldėjimo {Cukrinis diabetas, nepriklausomas nuo insulino, asociacija}	116400 600965 222300 614296 125853	AD AD AR AD AD

7 priedas. Pradmenų sekos ir PGR reakcijos sąlygos *GJB2* geno reguliacinėms sekoms tirti

7P1 lentelė. Pradmenų sekos *GJB2* geno reguliacinių sekų tyrimui

Amplikonas	Pradmens seka	Pradmens lydymosi temperatūra, °C	Fragmento ilgis, bp
5' reg.seka 1	F 5'-CTTTCGTGCTGTGTGCATCG-3'	60,45	589
	R 5'-GATGGCTGTGGTCGTTGTC-3'	58,84	
5' reg.seka 2	F 5'-CGCTCATAAATGCCAAGTCCT-3'	58,71	494
	R 5'-AGTCGGGGAGAGGAGCG-3'	60,09	
3' NTS 1	F 5'-AAATAGACAGCATGAGAGGGATG-3'	58,03	474
	R 5'-AGGCACTGGTAACTTTGTCCA-3'	59,51	
3' NTS 2	F 5'-CAGTGGACAAAAGTTACCAAGTGC-3'	59,71	495
	R 5'-AAAATTCCCAAGCGACCTCT-3'	57,41	
3' NTS 3	F 5'-AGGCCTGTCCAACACATCTC-3'	59,67	424
	R 5'-ACAACAGGAAAATACTTACCCTCAC-3'	59,00	
3' NTS 4	F 5'-TGCCATTATGCTTGACATGGTTT-3'	59,49	318
	R 5'-GACTCTGGCAACTTACCCAT-3'	60,29	

7P1 lentelė. PGR sąlygos

Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų sk.
Pradinė denatūracija	95	4 min	1
Denatūracija	95	45 s	
Pradmenų prilydymas	55-56*	45 s	30
DNR sintezė	72	45 s	
Galutinė DNR sintezė	72	10 min	1
-	4	∞	-

*priklausomai nuo pradmenų poros.

8 priedas. Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai/ amplikonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos
1	<i>CDH23</i>	2 egzonas	547	F 5'-TTCCTTCTCCTCCCTTCCCA-3' R 5'-TGCCTCCTTCCCTTAGAGCT-3'
		3 egzonas	489	F 5'-GGTCCTGGGAAGTTGACCAT-3' R 5'-TCACAAGGCCTTCAAGTGCA-3'
		4–6 egzonai	1418	F 5'-CCTGCTGGAGGATTGCTGAA-3' R 5'-CCCAGGGTACCAGCATGTTTC-3'
		7 egzonas	296	F 5'-CACTGGCTCACCCCTTGTACT-3' R 5'-ACTCTCTTCCAGGGTGGGAA-3'
		8 egzonas	493	F 5'-CCCCACCATCACTCAACCTAAG-3' R 5'-GCACAGGCTGAATTTTCCAT-3'
		9 egzonas	500	F 5'-TCTACTTCCTGGGTGCCCCT-3' R 5'-ACCGTCTCAGACCTTGGACA-3'
		10–11 egzonai	2240	F 5'-GGCCATGCTGTTCTCCTTCT-3' R 5'-AGAACCTACCAGGAGTGGGG-3'
		12–14 egzonai	3001	F 5'-GTCCTCTAGGGTGTGATCC-3' R 5'-TTCCTGATTGCTGAGGTCC-3'
		15 egzonas	2568	F 5'-TTTCTGTGGACCTGAAGCC-3' R 5'-ACGTTGTCGTTGACATCCAA-3'
		16–17 egzonai	2113	F 5'-ACAAGGACACGGGACTCATC-3' R 5'-GTCAGGGAGACAAGGAGTGC-3'
		18 egzonas	499	F 5'-TCTGGACGGGCATCTCAAGT-3' R 5'-TCACTTGACTCCAGCTCCT-3'
		19 egzonas	411	F 5'-CTAGCCTGACTCCTTGGTGC-3' R 5'-AGGAGAGCAGGAACCAAGTG-3'
		20 egzonas	546	F 5'-TGAGAGCTGGTCACTGGGAG-3' R 5'-TTCCTGAAGAGGGGTGTGTT-3'
		21–22 egzonai	1693	F 5'-CCGCCAGATCATGGTAGC-3' R 5'-CCTCTGACTGCCTTTCACCA-3'
		23–24 egzonai	926	F 5'-CCAGGACCAACGTCTGAGC-3' R 5'-TTTCCTGCCACACTTCCCTC-3'
		25–26 egzonai	2333	F 5'-GAGGAGGAGCACTTCTTGGG-3' R 5'-CCCTGACCTCTTTTCCACCC-3'
		27 egzonas	475	F 5'-CTCTGTTTCCCAGCCGGAAG-3' R 5'-CTCTGTGTTTGCACCACTGCT-3'
		28 egzonas	522	F 5'-CAGGAAGTGTGCCCTCTC-3' R 5'-CGTCTCTTTCTCCCCGCTAC-3'
		29–30 egzonai	1631	F 5'-GGATGCGTGAAGGGAAGGAA-3' R 5'-TGTTCTAGCTGTGGGCTTGG-3'
		31–32 egzonai	2098	F 5'-CAGGAAAGCAGTGACCACAC-3' R 5'-CAAAGAGGAGAGTGCTGTGC-3'
33–34 egzonai	618	F 5'-AAGGGTGCATGTTGTCAC-3' R 5'-GTGTGAGAGTGAGGCACTG-3'		
35–38 egzonai	3648	F 5'-GTCAGGATAGGCTTCGGTGG-3' R 5'-TCTTGTTCCCCTCACTCGGA-3'		

8 priedas (tęsinys). Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai/ amplikonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos
1	<i>CDH23</i>	39–41 egzonai	1997	F 5'-CACCCCCTGCTTTCTTCTCC-3' R 5'-TGAGGCCAAATGCCTTGAGA-3'
		42–44 egzonai	1624	F 5'-CGAGTGAGGCTTGCTAGAGG-3' R 5'-GCAGGAGGGGTGATGTGTTC-3'
		45–47 egzonai	2685	F 5'-GAGTTCATGTTGGTGTGGGC-3' R 5'-CTCCTGACTCCCTCTCCAGT-3'
		48 egzonas	747	F 5'-CAAGGCTGTCATGAGAAGGGG-3' R 5'-AGCAAGGGGAGAGATGGAAA-3'
		49–53 egzonai	3834	F 5'-CCAGCCACAAGTCCCAGATT-3' R 5'-CAACCCCAGTCCCTGTCATC-3'
		54–55 egzonai	2622	F 5'-TGGTGCCTGTCCTTCCCTTA-3' R 5'-GCTCTCTCTGCTACCCAAA-3'
		56–60 egzonai	2914	F 5'-TAGCTCAACAGCGTTCAGGA-3' R 5'-CCATATCCTGTGGTGTCCC-3'
		61–69 egzonai	3651	F 5'-TGAGTCTCTGAGCCGTACCC-3' R 5'-GAAGGACAGCAGGACAGCAA-3'
		70 egzonas	613	F 5'-GGTAGGAGCCCAAGGTTTACAG-3' R 5'-ATGAGCGTCTGGCAAAAGTG-3'
		2	<i>DFNB59</i>	2–4 egzonai
5–7 egzonai	3000			F 5'-ACCAGGAGTTTCTGTTGGAC-3' R 5'-TGGCACAACCTGCACCTAAAA-3'
3	<i>GJB6</i>	5 egzonas	1005	F 5'-CAGGGCAGGGAGTTGAAGTT-3' R 5'-CAGGTTGGTATTGCCTTCTGG-3'
4	<i>MYO15A</i>	2a amplikonas	1920	F 5'-CAAGAGACAGAGCAGGTCCC-3' R 5'-GTAGCCGAAGCGTTTGTAGG-3'
		2b1 amplikonas	1031	F 5'-CGGTTCTCAAGAAGACGCT-3' R 5'-TCTGAGTCCTCGGGTTCTCG-3'
		2b2 amplikonas	1099	F 5'-GCTCCCTGAATCTGCCCTC-3' R 5'-GCTGTCTCTTGGCCCTGTT-3'
		3–7 egzonai	2913	F 5'-CTCATGTGTGAGGGTCGCAT-3' R 5'-GTGTTCAGCCTAGGGTCCTG-3'
		8–12 egzonai	2747	F 5'-CCTGGTCTGAGGCTCCTAGT-3' R 5'-AAAGACGGCCAAGTCCAGAG-3'
		13–19 egzonai	4109	F 5'-TCAAAGCACATTCTGTTGGT-3' R 5'-CCAAGCTAGGTGGGAACAGG-3'
		20–29 egzonai	4370	F 5'-CCTTGACAGAGAGAACAGGGG-3' R 5'-GCCAGATTTCCCCCTCTGAC-3'
		30–35 egzonai	3927	F 5'-TGGGGACTGGAAGGAACAAC-3' R 5'-ACCCTCATCCTTTGTCCAGC-3'
		36–45 egzonai	4603	F 5'-TGCCATAGGGGTAAAGGCTG-3' R 5'-CATGTCTGGGAGATGGTGGG-3'

8 priedas (tęsinys). Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai/ amplikonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos
4	<i>MYO15A</i>	46–51 egzonai	3058	F 5'-TCTTGCTGGGTATCAGCCAC-3' R 5'-GCCACACCTCCAACCATCTC-3'
		52–56 egzonai	1726	F 5'-CAGCAAGTAAAAGGCGTGGG-3' R 5'-GACACAGTGAGGGGATGGTG-3'
		57–60 egzonai	2896	F 5'-CCCTTCTGTCCCTATCCCCA-3' R 5'-GGACAGATAAAGGGCTGGGC-3'
		61–62 egzonai	1606	F 5'-CTGGGTAGCAGATTGGGGTC-3' R 5'-GGACAGCCCCTTCCCAGATA-3'
		63–65 egzonai	2481	F 5'-ACAGTGAGGATTGCCTGAGC-3' R 5'-TGTGCTGTGGTTGGTTCTGT-3'
		66 egzonas	345	F 5'-CACCCCAAGGTAAGAGCTGG-3' R 5'-TCCCAGTTCAGGATGGGTCT-3'
		5	<i>OTOF</i>	1 egzonas
2 egzonas	639			F 5'-CCATGCTCATCGTCTGGACA-3' R 5'-CGCCCCCTATACTAGGCTTC-3'
3 egzonas	489			F 5'-CCACAAGAGATTCCCCTCCC-3' R 5'-CGTGGCATTGAGGGAGACTT-3'
4-5 egzonas	2801			F 5'-CCTCACCTGGTCTCTTCCA-3' R 5'-AGGTCTCTTCCCCGTGTCTT-3'
6-8 egzonai	2282			F 5'-TCTCGGGACCAGTAGGTGAG-3' R 5'-TCCCCCACTAGAGCAGAGTC-3'
9 egzonas	544			F 5'-GCTCAGGCAGCTTTCCTTCT-3' R 5'-CACCATGGGTTGGAATGA-3'
10–11 egzonai	721			F 5'-GATGAGTTGCCTCTGCTGCT-3' R 5'-CATGCACACCTCGACTGACT-3'
12–16 egzonai	4673			F 5'-CATTGGTTCTGCCACCCCT-3' R 5'-TCTCAGGGGAAAGGGGTCAA-3'
17–18 egzonai	2017			F 5'-CTCTCCCCTTCCCAAACCC-3' R 5'-GTTCAGGCCTTCTTCTGTG-3'
19–25 egzonai	2677			F 5'-AGCTCCAGATCATGAGGTC-3' R 5'-AGGCAGGAGGAGCTAGATGT-3'
26–32 egzonai	4185			F 5'-GGACAGCAAGCACCAAGAG-3' R 5'-GGACAGGAGGGTCTGAGTGT-3'
33–36 egzonai	2293			F 5'-ACAGACTCCTCCCCAGGAAA-3' R 5'-TCTCTGGGCGTTGACTTCTT-3'
37–41 egzonai	2986			F 5'-CACCAGGAGATCATTGGT-3' R 5'-GGTTGGTCAGTTTCTCCCCT-3'
42–46 egzonai	2633			F 5'-ACCTGGGGCTGCTAACCA-3' R 5'-TCTGGGAGAAACATGGCTGG-3'

8 priedas (tęsinys). Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos
6	<i>SLC26A4</i>	2–3 egzonai	1920	F 5'-CTCCGATCGTCCTCGCTTAC-3' R 5'-TGGTAGCTGGGAGAAAGTGT-3'
		4–6 egzonai	3058	F 5'-ACTGTAACCTTTGGTTTGTGAATGT-3' R 5'-GAACAGTGACCCATCCCTGG-3'
		7–8 egzonai	735	F 5'-GTAATGGTCTCTGTATCAACCAACA-3' R 5'-AGAGCATATACGGGCTGCTTT-3'
		9–10 egzonai	1309	F 5'-GGGGAAAAAGGATGGTGGTC-3' R 5'-AGCCTTCCTCTGTTGCCATT-3'
		11–14 egzonai	4008	F 5'-TTGAGCAGAAGGGGGAGACA-3' R 5'-GGTGTGAGAAGGTGCACTGG-3'
		15–18 egzonai	4473	F 5'-TACCCAGCTCCTCTGAGCAA-3' R 5'-AGGAGAAAGGGCTTACGGGA-3'
		19–20 egzonai	3079	F 5'-ACGTGATCGTCCACAAGGT-3' R 5'-CCATCTTTTCTGCATTTGGGGG-3'
		21 egzonas	449	F 5'-TGCAGACTTAAGGAGAATTCAGT-3' R 5'-GTGATCAGTGCAGCTCATGG-3'
7	<i>TECTA</i>	2 egzonas	491	F 5'-ACGGTTTTGATGGTCTTGGGA-3' R 5'-CAGACATGAAGTGCACATACCC-3'
		3 egzonas	488	F 5'-GCTGGCTTCAGTAGGTAGGAG-3' R 5'-GGGGCTTCTGCTTCACTTCT-3'
		4 egzonas	514	F 5'-AGTCTGAGCAATGGAACCCG-3' R 5'-CGTGGTAGCGAAGATGGACA-3'
		5–6 egzonai	924	F 5'-AGAGGAGTCAGAGCTGGAGG-3' R 5'-TCCATTACCCAGCGGAGAGA-3'
		7 egzonas	908	F 5'-TCGGAAGGAAAGGCAGGAAA-3' R 5'-AGCTGTGCATCTCTTTGGCA-3'
		8 egzonas	798	F 5'-GGCCATTCTCTCTGGAGTGT-3' R 5'-CCTCCCCCTCATTCTTGGGT-3'
		9 egzonas	792	F 5'-ATTCTGGCGGGTTAGCACTC-3' R 5'-CCCGTTTGGAGCCATCTTCT-3'
		10 egzonas	846	F 5'-TAGCAATAGGGCAGACCGTG-3' R 5'-CTCCGGTTTGGGGTGATGAG-3'
		11 egzonas	650	F 5'-CACTGGAGTGCCAGAGAA-3' R 5'-CTGACGTCTCCACGATTCCC-3'
		12 egzonas	667	F 5'-GGGCCAACTGTGTTTCTCCA-3' R 5'-CTGGCCTTCCCAGAGCAATC-3'
		13 egzonas	542	F 5'-CCTTGTGATCGTGCAGTCTT-3' R 5'-AAGGCACGACACAGACACAC-3'
		14 egzonas	581	F 5'-CTCCTACAAATTCCAGCCCCA-3' R 5'-CCTACACAGTCCCCTAGCCA-3'
		15–16 egzonai	2695	F 5'-TTGGGGCAACTACACAGTAAGA-3' R 5'-CCCGTCACTGAATCTCGGC-3'
		17–20 egzonai	3854	F 5'-GTGGCAAGTCTGGAGTGGAA-3' R 5'-TTCTGGCCTTGTAGGCAGC-3'
		21–24 egzonai	3277	F 5'-CAGTCCAGGGTCACTTTCA-3' R 5'-GCTGGTTTCTGGACCTTGGA-3'

8 priedas (tęsinys). Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos		
8	<i>TMCI</i>	5 egzonas	485	F 5'-CCAAACTAGCCAGCCACTGA-3' R 5'-AACGGAAGCAGAACACATCC-3'		
		6 egzonas	413	F 5'-TCGTGCTCATTTTGGCAAGT-3' R 5'-CAAGCAATCAAGGGAACACA-3'		
		7 egzonas	445	F 5'-TTGGTAGTGGGAGGAAGCAC-3' R 5'-GAATTTCTCATGGTCCATTTTT-3'		
		8 egzonas	938	F 5'-ATGGGTCCTAATGTTGACTGC-3' R 5'-TGTGTGCTCTGACTGCGTT-3'		
		9 egzonas	460	F 5'-AGTCATTGCAACTCACCTCCT-3' R 5'-CAGAACCCCTTCACTTCCAG-3'		
		10 egzonas	508	F 5'-TGTAATGTTTTGAGGTGGGGGA-3' R 5'-CATTGCCAAAATAAAAATCTCTGC-3'		
		11 egzonas	300	F 5'-TGAAGGCAACCAAGACAAAGC-3' R 5'-ACTCTAAGACGTGAAAATAGCCAGT-3'		
		12 egzonas	300	F 5'-GAGACCCAAAGAGTCCCAT-3' R 5'-GAGGCCGTGGGTTTCAGAAT-3'		
		13 egzonas	520	F 5'-TGCTCTTCACGACAACCTGCT-3' R 5'-ACCAGCAGCTGTTTTCTGT-3'		
		14–15 egzonai	1190	F 5'-TGCTTCTCCACTTCAACTCA-3' R 5'-GGGCAGGATAGGGGATAGGT-3'		
		16–17 egzonai	698	F 5'-AGCCTAGCTCAGAATCTTCCA-3' R 5'-AGCCAGCACACAGTCAACAT-3'		
		18 egzonas	530	F 5'-TGCAGTCTTCAAGCCAATACT-3' R 5'-GTGGTGCAAGATGTGCTTTG-3'		
		19 egzonas	655	F 5'-ACCATGTGAGACGCTAATCCA-3' R 5'-CTGATGTGCCATGGCCCTAT-3'		
		20 egzonas	360	F 5'-ACAGGTGCAGTGTGACTTTGT-3' R 5'-CTCCACCCCGAAAGAACAC-3'		
		21 egzonas	526	F 5'-CCCTGAAAGAGGACCTAAGC-3' R 5'-TGTTTCCCTTGCTTTAGCTGT-3'		
		22–23 egzonai	622	F 5'-TTCACCCCAGCTTCATCCCT-3' R 5'-TACCCTGGATGTGATGCCTG-3'		
		24 egzonai	530	F 5'-GGCCACCTCATTGAGAACCAT-3' R 5'-AAGGAAACTCAGGCAAAAGAAAC-3'		
		9	<i>TMIE</i>	1 egzonas	493	F 5'-GGAACCTGACACCGAGGATG-3' R 5'-TCTCCCCGTCAGACTAATG-3'
				2 egzonas	551	F 5'-AGTGTGCTGAGACCTGGG-3' R 5'-CTTTAAGCTGGCCAACTGC-3'
				3–4 egzonai	744	F 5'-TGCCATTCCCTGGGTCTCTG-3' R 5'-TCAGCTCCCTCTCTGACCA-3'

8 priedas (tęsinys). Pradmenų sekos 11-os genų tyrimui NKS metodu

Nr.	Genas	Egzonai	Amplikono ilgis, bp	Pradmenų sekos
10	<i>TMPRSS3</i>	1–2 egzonai	1060	F 5'-TATTTCCCTGCTTCCTCCGC-3' R 5'-AGCCTGTGGGTGTCAGAATG-3'
		3–5 egzonai	1857	F 5'-TGGCACTCCAAGTCAGGTTTC-3' R 5'-TGCTTGCCTGTGAAGTGAGG-3'
		6–9 egzonai	3964	F 5'-AGCCTTTGATGGGTTTGGGG-3' R 5'-AGCCACCAATCTACCTGGC-3'
		10 egzonas	300	F 5'-GGGCTTGACCTTCCTTCCC-3' R 5'-AATGGGACATTGGGGGAGC-3'
		11–12 egzonai	1133	F 5'-GACACACCAGAGAGCATCCC-3' R 5'-AAAAGCCAGGGACAACGTGA-3'
		13 egzonas	510	F 5'-AAAGTCAACGTGAGGGCCTT-3' R 5'-CGGGCTGTCTTCATCACCTC-3'
		11	<i>TRIOBP</i>	3 egzonas
4 egzonas	579			F 5'-CCGAGGAGATGCCTGGAGA-3' R 5'-AAGGTGAGTGTACAGCAGCC-3'
5 egzonas	300			F 5'-GTGGGGGATGCTCCTAACTC-3' R 5'-AGGTGTGAGCCACTCTTGTC-3'
6 egzonas	362			F 5'-TTCCCTTCCTTCTGCCCT-3' R 5'-AAAGTAAGCCGTGCCCAGAG-3'
7 egzonas	3554			F 5'-TCAGCCTTGGTCAGAGAGGT-3' R 5'-AACCCTTCACCTGTCCTGCT-3'
8–9 egzonai	2402			F 5'-TGTCCACATCTCCTCCTGT-3' R 5'-GTTTGGTGATCGGGATGGGT-3'
10 egzonai	265			F 5'-AGAATAAGTTGGGCTAAGCTGT-3' R 5'-GGCTGACTGGGTACATCCTC-3'
11 egzonai	333			F 5'-CCCCATCCTGCCAAAGGG-3' R 5'-GCTCCACCTCTCCTGTCAT-3'
12 egzonai	525			F 5'-CCTGCTGGACCCAACCTCAC-3' R 5'-GGAGGCTTTGACTCAACCAG-3'
13–15 egzonai	1023			F 5'-TGTGGTTACGGAGGGGAAAC-3' R 5'-GGGTAAGTGCCTCCCTCAAG-3'
16–17 egzonai	1960			F 5'-CAAGAGGTGGAGCTGGGATG-3' R 5'-TCAAATGCCCCACACAGGTT-3'
18 egzonai	550			F 5'-GCTGTCCAGAGGAACGGG-3' R 5'-TCCTATGAGGACAGGGGATG-3'
19–21 egzonai	1456			F 5'-CCCCCTCCAGTCTCTTGT-3' R 5'-ACTGGGAGACTTGCTTTCC-3'
22–23 egzonai	1452			F 5'-GAATCGGAGAGGGCTTCCTG-3' R 5'-GATCTCTGCAACAACCCCGT-3'

9 priedas. AR paveldėjimo KS genų, analizuotų LITGEN grupėje, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
1	<i>ADCY1</i>	7p12.3	?AR paveldėjimo KS 44	610154	AR
2	<i>ADGRV1</i>	5q14.3	?Febriliniai traukuliai, šeiminiai, 4	604352	AD
			<i>Usher s.</i> , 2C tipas	605472	DD, AR
			<i>Usher s.</i> , type 2C tipas, GPR98/PDZD7 digeninis	605472	DD, AR
3	<i>ATP2B2</i>	3p25.3	{AR paveldėjimo KS 12, modifikatorius}	601386	AR
4	<i>ATP6V1B1</i>	2p13.3	AR paveldėjimo inkstų distalinė tubulinė acidozė su kurtumu	267300	AR
5	<i>BDP1</i>	5q13.2	AR paveldėjimo KS	-	AR
6	<i>BSND</i>	1p32.3	<i>Barter s.</i> , 4a tipas	602522	AR
7	<i>CABP2</i>	11q13.2	AR paveldėjimo KS 93	614899	AR
8	<i>CACNAID</i>	3p21.1	Pirminis aldosteronizmas, traukuliai ir neurologinė patologija	615474	AD
			Sinusinio mazgo disfunkcija ir kurtumas	614896	AR
9	<i>CDC14A</i>	1p21.2	AR paveldėjimo kurtumas 105	616958	AR
10	<i>CDH23</i>	10q22.1	AR paveldėjimo KS 12	601386	AR
			<i>Usher s.</i> , 1D tipas	601067	DR, AR
			<i>Usher s.</i> , 1D/F tipas digeninis	601067	DR, AR
			Hopogonadotropinis hipogonadizmas 5 su anosmija ar be jos	612370	
11	<i>CIB2</i>	15q25.1	AR paveldėjimo KS 48	609439	AR
			<i>Usher s.</i> , IJ tipas	614869	AR
12	<i>CISD2</i>	4q24	<i>Wolfram s. 2</i>	604928	AR
13	<i>CLDN14</i>	21q22.13	AR paveldėjimo KS 29	614035	AR
14	<i>CLIC5</i>	6p21.1	?AR paveldėjimo KS 103	616042	AR
15	<i>CLPP</i>	19p13.3	<i>Perrault s. 3</i>	614129	AR
16	<i>CLRN1</i>	3q25.1	Pigmentinis retinitas 61	614180	
			<i>Usher s.</i> , 3A tipas	276902	AR
17	<i>COL11A2</i>	6p21.32	AD paveldėjimo KS 13	601868	AD
			AR paveldėjimo KS 53	609706	AR
			Fibrochondrogenėzė 2	614524	AD, AR
			Otospondilomegaepifizinė displasija	215150	AR
			<i>Stickler s.</i> , III tipas	184840	AD
			<i>Weissenbacher-Zweymuller s.</i>	277610	AD
18	<i>COL4A3</i>	2q36.3	AD paveldėjimo <i>Alport s.</i>	104200	AD
			AR paveldėjimo <i>Alport s.</i>	203780	AR
			Hematurija, gerybinė šeiminė	141200	AD
19	<i>COL4A4</i>	2q36.3	AR paveldėjimo <i>Alport s.</i>	203780	AR
			Hematurija, gerybinė šeiminė		
20	<i>DCDC2</i>	6p22.3	?AR paveldėjimo KS 66	610212	AR
			Nefronoftizė 19	616217	AR
			Sklerozuojantis cholangitas, naujagimių	617394	AR
21	<i>ELMOD3</i>	2p11.2	?AR paveldėjimo KS 88	615429	AR
22	<i>EPS8</i>	12p12.3	?AR paveldėjimo KS 102	615974	AR
23	<i>ESPN</i>	1p36.31	AR paveldėjimo KS 36	609006	AR
			AD paveldėjimo KS		
24	<i>ESRRB</i>	14q24.3	AR paveldėjimo KS 35	608565	AR
25	<i>FAM65B</i>	6p22.3	?AR paveldėjimo KS 104	616515	AR

9 priedas (tęsinys). AR paveldėjimo KS genų, analizuotų LITGEN grupėje, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
26	<i>FGF3</i>	11q13.3	Įgimtas kurtumas su vidinės ausies agenize, mikrotija ir mikrodontija	610706	AR
27	<i>FOX11</i>	5q35.1	Prieangio latako išsiplėtimas	600791	AR
28	<i>GIPC3</i>	19p13.3	AR paveldėjimo KS 15	601869	AR
29	<i>GJB2</i>	13q12.1 1	<i>Bart–Pumphrey</i> s.	149200	AD
			AD paveldėjimo KS 3A	601544	AD
			AR paveldėjimo KS 1A	220290	AR, DD
			Žvyninė ichtiozė su kurtumu	602540	AD
			Keratito, ichtiozės ir kurtumo s.	148210	AD
			Palmopplantarinė keratoderma su kurtumu	148350	AD
			<i>Vohwinkel</i> s.	124500	AD
30	<i>GJB6</i>	13q12.1 1	AD paveldėjimo KS 3B	612643	AD
			AR paveldėjimo KS 1B	612645	AR
			Digeninio paveldėjimo kurtumas GJB2/GJB6	220290	AR, DD
			Ektoderminė displazija 2, <i>Clouston</i> tipas	129500	AD
31	<i>GPSM2</i>	1p13.3	<i>Chudley–McCullough</i> s.	604213	AR
32	<i>GRXCR1</i>	4p13	AR paveldėjimo KS 25	613285	AR
33	<i>GRXCR2</i>	5q32	?AR paveldėjimo KS 101	615837	AR
34	<i>HARS2</i>	5q31.3	? <i>Perrault</i> s. 2	614926	AR
35	<i>HGF</i>	7q21.11	AR paveldėjimo KS 39	608265	AR
36	<i>HSD17B4</i>	5q23.1	D-bifunkcinio baltymo stoka	261515	AR
			<i>Perrault</i> s. 1	233400	AR
37	<i>ILDR1</i>	3q13.33	AR paveldėjimo KS 42	609646	AR
38	<i>KARS</i>	16q23.1	? <i>Charcot–Marie–Tooth</i> liga, recesyvi tarpinė, B	613641	AR
			AR paveldėjimo KS 89	613916	AR
39	<i>KCNE1</i>	21q22.1 2	<i>Jervell</i> ir <i>Lange–Nielsen</i> s. 2	612347	AR
			Ilgo QT s. 5	613695	AD
40	<i>KCNJ10</i>	1q23.2	Prieangio latako išsiplėtimas, digeninis	600791	AR
			<i>SESAME</i> s.	612780	AR
41	<i>KCNQ1</i>	11p15.5 -p15.4	Prieširdžių virpėjimas, šeiminis, 3	607554	AD
			<i>Jervell</i> ir <i>Lange–Nielsen</i> s.	220400	AR
			Ilgo QT s. 1	192500	AD
			Trumpo QT s. 2	609621	AD
42	<i>LARS2</i>	3p21.31	?Vandenė, laktatinė acidozė ir sideroblastinė anemija	617021	AR
			<i>Perrault</i> s. 4	615300	AR
43	<i>LHFPL5</i>	6p21.31	AR paveldėjimo KS 67	610265	AR
44	<i>LOXHD1</i>	18q21.1	AR paveldėjimo KS 77	613079	AR
45	<i>LRTOMT</i>	11q13.4	AR paveldėjimo KS 63	611451	AR
46	<i>MARVELD2</i>	5q13.2	AR paveldėjimo KS 49	610153	AR
47	<i>MET</i>	7q31.2	? AR paveldėjimo KS 97	616705	AR
			Hepatoceliulinė karcinoma, vaikų, somatinė	114550	
			Inkstų papilinė karcinoma, 1, šeiminė ir somatinė	605074	
			{Osteofibrozinė displazija, polinkis}	607278	AD
48	<i>MYO3A</i>	10p12.1	AR paveldėjimo KS 30	607101	AR

9 priedas (tęsinys). AR paveldėjimo KS genų, analizuotų LITGEN grupėje, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
49	MYO7A	11q13.5	AD paveldėjimo KS 11	601317	AD
			AR paveldėjimo KS 2	600060	AR
			<i>Usher s.</i> , 1B tipas	276900	AR
50	MYO15A	17p11.2	AR paveldėjimo KS 3	600316	AR
51	MYO6	6q14.1	AD paveldėjimo KS 22	606346	AD
			AD paveldėjimo KS 22, su hipertrofine kardiomiopatija	606346	AD
			AR paveldėjimo KS 37	607821	AR
52	MSRB3	12q14.3	AR paveldėjimo KS 74	613718	AR
53	NARS2	11q14.1	Kombinuota oksidacinio fosforilinimo stoka 24	616239	AR
54	NDP	Xp11.3	Eksudacinė vitreoretinopatija 2, XR paveld.	305390	XR
			<i>Norrie liga</i>	310600	
55	OTOA	16p12.2	AR paveldėjimo KS 22	607039	AR
56	OTOF	2p23.3	Klausos neuropatija, AR paveldėjimo, 1	601071	AR
			AR paveldėjimo KS 9	601071	AR
57	OTOG	11p15.1	AR paveldėjimo KS 18B	614945	AR
58	OTOGL	12q21.31	AR paveldėjimo KS 84B	614944	AR
59	PCDH15	2q36.1	AR paveldėjimo KS 23	609533	AR
			<i>Usher s.</i> , 1D/F tipas, digeninis	601067	AR, DR
			<i>Usher s.</i> , 1F tipas	602083	AR
60	PDZD7	10q24.31	<i>Usher s.</i> , IIC tipas, GPR98/PDZD7 digeninis	605472	AR, DD
			{Tinklainės ligos modifikatorius (<i>Usher s.</i> IIA t.)}	276901	AR
61	PEX6	6p21.1	<i>Heimler s. 2</i>	616617	AR
			Peroksisomų biogenezės sutrikimas 4A (<i>Zellweger</i>)	614862	AR
			Peroksisomų biogenezės sutrikimas 4B	614863	AR
62	PNPT1	2p16.1	Sudėtinė oksidacinio fosforilinimo stoka 13	614932	AR
			AR paveldėjimo KS 70	614934	AR
63	POLRIC	6p21.1	Leukodistrofija, hipomielinizuojanti, 11	616494	AR
			<i>Treacher Collins s. 3</i>	248390	AR
64	PTPRQ	12q21.31	AR paveldėjimo KS 84A	613391	AR
65	RDX	11q22.3	AR paveldėjimo KS 24	611022	AR
66	SIPR2	19p13.2	AR paveldėjimo KS 68	610419	AR
67	SERPINB6	6p25.2	?AR paveldėjimo KS 91	613453	AR
68	SLC26A4	7q22.3	AR paveldėjimo KS 4, su prieangio latako išsiplėtimu	600791	AR
			<i>Pendred s.</i>	274600	AR
70	SLC26A5	7q22.1	?AR paveldėjimo KS 61	613865	AR
71	SNAI2	8q11.21	Paibaldizmas	172800	AD
			<i>Waardenburg s.</i> , 2D tipas	608890	AR
72	STRC	15q15.3	AR paveldėjimo KS 16	603720	AR
73	SYNE4	19q13.12	AR paveldėjimo KS 76	615540	AR
74	TBC1D24	16p13.3	AR paveldėjimo KS 86	614617	AR
			AD paveldėjimo KS 65	616044	AD
			<i>DOOR s.</i>	220500	AR
			Epileptinė encefalopatija, kūdikių, 16	615338	AR
			Miokloninė epilepsija, kūdikių, šeiminė	605021	AR

9 priedas (tęsinys). AR paveldėjimo KS genų, analizuotų LITGEN grupėje, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM	Paveldėjimas
75	<i>TECTA</i>	11q23.3	AD paveldėjimo KS 8/12	601543	AD
			AR paveldėjimo KS 21	603629	AR
76	<i>TMC1</i>	9q21.13	AD paveldėjimo KS 36	606705	AD
			AR paveldėjimo KS 7	600974	AR
77	<i>TMIE</i>	3p21.31	AR paveldėjimo KS 6	600971	AR
78	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	AR paveldėjimo KS 8/10	601072	AR
79	<i>TRIOBP</i>	22q13.1	AR paveldėjimo KS 28	609823	AR
80	<i>TSPEAR</i>	21q22.3	AR paveldėjimo KS 98	614861	AR
81	<i>USH1C</i>	11p15.1	AR paveldėjimo KS 18A	602092	AR
			<i>Usher s., 1C tipas</i>	276904	AR
82	<i>USH1G</i>	17q25.1	<i>Usher s., 1G tipas</i>	606943	AR
83	<i>USH2A</i>	1q41	Pigmentinis retinitas 39	613809	
			<i>Usher s., 2A tipas</i>	276901	AR

10 priedas. XR paveldėjimo KS genų, analizuotų LITGEN grupėje, sąrašas

N r.	Genas	Genetinė sritis	Fenotipas	MIM
1	<i>AIFM1</i>	Xq26.1	Sudėtinė oksidacinio fosforilinimo stoka 6	300816
			<i>Cowchock</i> s.	310490
			XR paveldėjimo KS 5	300614
2	<i>POU3F4</i>	Xq21.1	XR paveldėjimo KS 2	304400
3	<i>PRPS1</i>	Xq22.3	<i>Arts</i> s.	301835
			<i>Charcot–Marie–Tooth</i> liga, XR paveldėjimo, 5	311070
			XR paveldėjimo KS 1	304500
			Su PRPS susijusi podagra	300661
			Fosforibozilpirofosfato sintetazės hiperaktyvumas	300661
4	<i>TIMM8A</i>	Xq22.1	<i>Mohr–Tranebjaerg</i> s.	304700

PADĖKA

Nuoširdžiausius padėkos žodžius tariau:

moksliniam vadovui **prof. dr. Algirdui Utkui** už suteiktą galimybę įsigilinti į klausos sutrikimo genomiką, mokslinei konsultantei **prof. dr. Loretai Cimbalistienei** už patarimus vertinant pacientų fenotipą ir rašant disertaciją;

visiems tiriamiesiems, jų šeimos nariams, sutikusiems dalyvauti šiame tyrime ir leidusiems analizuoti jų klinikinius ir genetinius duomenis;

disertacijos Gynimo tarybos pirmininkei **prof. dr. Janinai Tutkuvienei** bei nariams **prof. dr. Virginijui Šapokai**, **prof. habil. dr. Juozui Lazutkai**, **doc. dr. Rasai Ugenskienei**, **dr. Daliai Kasperavičiūtei** už įdomius klausimus diskusijai;

recenzentams **prof. dr. Vytautui Kasiulevičiui**, **dr. Aušrai Morkūnienei**, **dr. Valentinai Ginevičienei** už pastabas, padėjusias patobulinti šį darbą;

VU Medicinos fakulteto Mokslo ir doktorantūros reikalų prodekanei **prof. dr. Janinai Tutkuvienei** ir vyriausiajai specialistei **Samantai Grubytei** už konsultacijas ir pagalbą visais doktorantūros studijų metu iškilusiais klausimais;

prof. dr. Eugenijui Lesinskui, VšĮ VUL SK Ausų, nosies ir gerklės ligų skyriaus ir VšĮ VUL SKF Vaikų ligoninės Ausų, nosies ir gerklės ligų skyriaus ir Vaikų klausos tyrimų poskyrio kolektyvams, ypač gydytojai vaikų otorinolaringologei **Jekaterinai Byčkovai** už nuoširdų bendradarbiavimą, išsamų audiologinį sergančių asmenų ištyrimą;

VšĮ VUL SK MGC gydytojams genetikams **prof. dr. Loretai Cimbalistienei**, **dr. Eglei Preikšaitienei**, **dr. Aušrai Matulevičienei**, **Birutei Tumienei**, **Birutei Burnytei** už pagalbą sudarant tiriamųjų grupę, išsamius fenotipo ir genealogijos duomenis;

VšĮ VUL SK MGC MGCL laboratorijos kolegoms **dr. Laimai Ambrozaitytei**, **dr. Aušrai Morkūnienei**, **dr. Živilei Maldžienei**, **dr. Vytautui Šliužui**, **Kristinai Grigalionienei**, **Beatai Aleksionienei**, **Evelinai Dagytei**, **Raimondai Meškienei**,

Daivai Kazlauskaitei, Dalytei Pliaugo už bendrą darbą laboratorijoje ir pacientų genetinių tyrimų duomenis;

akad. prof. habil. dr. Vaidučiui Kučinskui ir VU MF ŽMGK mokslininkams, vykdžiusiems LITGEN projektą (**dr. Laimai Ambrozaitytei, dr. Ingridai Kavaliauskienei, dr. Ingridai Domarkienei, Raimondai Meškienei, Aidui Pranculiui**) už galimybę analizuoti lietuvių populiacijos sveikų asmenų egzomo sekoskaitos rezultatus;

LSMUL Kauno klinikų gydytojoms **prof. dr. Rasai Verkauskienei, dr. Editai Jašinskienei, dr. Giedrei Rutkauskienei** už išsamius paciento, sergančio *Rogers* sindromu, klinikinius duomenis;

gydytojoms rezidentėms **Rūtai Marcinkutei ir Deimantei Brazdžiūnaitei** už pagalbą renkant DEAFGEN tiriamųjų asmenų duomenis;

visam VU MF Biomedicininio tyrimo instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros kolektyvui už bendrą darbą;

UAB *ThermoFisher Scientific Baltics* kolektyvui, ypač **prof. habil. dr. Arvydui Lubiui, dr. Violetai Pependikytei, dr. Gediminui Alzbutui, dr. Vaidai Šeputienei, Ievai Vėbraitei** už galimybę atlikti dalį šio darbo eksperimentų, pagalbą vykdant mokslinius tyrimus ir duomenis, naudotus šiame tyrime;

prof. dr. Audronei Jakaitienei už kompetetingus patarimus ir pagalbą biostatistinės analizės klausimais;

dr. Tautvydui Rančeliui už pagalbą ir ypač išsamius paaiškinimus atliekant bioinformacinę LITGEN ir DEAFGEN duomenų analizę;

studentėms, su kuriomis kartu atlikome dalį eksperimentinių darbų ir kurių gauti duomenys analizuoti šiame darbe, – **Ievai Savickytei** (*GJB2* geno reguliacinių sekų tyrimas), **Gundai Petraitytei** (*MYO15A* geno egzonų tyrimas), **Marijai Šalčiūtei** (*TRIOBP* geno egzonų tyrimas), **Danutei Vansevičiūtei** (įvairių genų egzonų tyrimas), **Laurai Pakeltytei** (*GJB6* geno iškritų tyrimas).

dr. Eglei Preikšaitienei už šio darbo iliustracijas, profesinius patarimus, draugišką palaikymą, nuoširdumą ir supratimą;

dr. Jurgitai Songailienei už išmintį ir tvirtą nuomonę;

Už kantrybę, supratimą, entuziazmą ir visokeriopą paramą noriu ypač padėkoti savo artimiausiems žmonėms – vyrui Robertui, dukrai Aistei, sūnui Albertui ir tėčiui.