

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana J. Dobrić

**UČESTALOST VARIJANTI U GENIMA *GJB2* I  
*GJB6* I FENOTIPSKA VARIJABILNOST KOD  
OBOLELIH OD NESINDROMSKOG  
AUTOZOMNO-RECESIVNOG OŠTEĆENJA  
SLUHA U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana J. Dobrić

**FREQUENCY OF VARIANTS IN THE *GJB2*  
AND *GJB6* GENES  
AND PHENOTYPIC VARIABILITY IN  
PATIENTS FROM SERBIA WITH  
AUTOSOMAL-RECESSIVE NONSYNDROMIC  
HEARING LOSS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

## PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

### Mentori:

1. dr Danijela Radivojević, naučni saradnik, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić"
2. prof. dr Katarina Zeljić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

### Članovi komisije:

1. dr Jovana Ječmenica, naučni saradnik, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić"
2. prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet
3. prof. dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Doktorska disertacija je urađena na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" u okviru doktorskih studija smera Biologija, modul Genetika, na Katedri za genetiku i evoluciju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Jedan deo doktorske disertacije je urađen na Odeljenju molekularne genetike, funkcije i terapije, Instituta za neurologiju i genetiku Kipra, Nikozija, Kipar.

## Особа којој се дивим

Мој старији брат Никола носи слушни апарат који се залепи као магнет. Он каже да су то његове супер уши. Оне су његова супер моћ која му помаже да учи у школи и да чује све око себе. Он ми помаже у свему. Помаже ми око домаћег и брани ме ако ме неко дира. Он је мој супер брат. Нервира ме што се деца смеју ако неко не чује добро. Мислим да су они збуђени што он има супер моћи. И ја имам неке супер моћи али их још нисам открио.

*Doktorska disertacija je imala za cilj da pokuša da pomogne svim ljudima koji se bore sa oštećenjem sluha, kao i njihovim članovima porodice, u nadi da ćemo zajedno kreirati lepšu budućnost.*

## IZJAVE ZAHVALNOSTI

Za izradu doktorske disertacije najveću zahvalnost dugujem mentorki **dr Danijeli Radivojević** na izuzetnoj saradnji, uloženom trudu, istrajnosti, znanju, podršci i pronalaženju rešenja za svaki problem. Njen doprinos i pomoć su nemerljivi kako u eksperimentalnom delu, tako i u pisanju same teze.

Zahvaljujem se **prof. dr Katarini Zeljić**, svojoj drugoj mentorki, na velikoj pomoći, korisnim savetima, velikoj podršci i istrajnosti da sve dovedemo do kraja.

Zahvaljujem se članovima komisije:

- **dr Jovani Ječmenici**, koja je idejni tvorac i jako se uspešno bavi medicinskim aspektom ove problematike, na izuzetnoj saradnji, smernicama tokom izrade i pisanja disertacije i velikoj pomoći oko kliničkog aspekta tematike;
- **prof. dr Ivani Novaković** na korisnim savetima i rečima podrške tokom pisanja ovog rada;
- **prof. dr Mariji Savić Veselinović** na velikoj podršci i korisnim savetima koji su upotpunili disertaciju.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Vassos Neocleous-u**, **dr Pavlos Fanis-u**, **MSc Constantina Costi**, timu Odeljenja molekularne genetike, funkcije i terapije, Instituta za neurologiju i genetiku Kipra, na edukaciji, podršci, divnom gostoprimstvu i prilici da uradim jedan deo eksperimentalnog dela disertacije u njihovoj laboratoriji.

Posebno se zahvaljujem **BEC Mariji Dobrić** i **doc. dr Ivanu Soldatoviću** na nemerljivoj pomoći u statističkoj obradi podataka i prikazivanju rezultata, kao i **MA Sladani Milojević** na neizmernoj pomoći oko svih slika u radu.

Ovaj rad svakako ne bi bio moguć bez pomoći svih mojih **kolega iz Laboratorije za medicinsku genetiku**, kojima želim da uputim veliku zahvalnost kako na svakodnevnoj saradnji, tako i u radu na ovoj disertaciji.

Hvala mojoj **porodici i prijateljima** što su uvek uz mene, na velikoj podršci, vremenu i razumevanju na ovom dugom putu zvanom doktorat.

*Posvećeno mami...*

## Učestalost varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* i fenotipska varijabilnost kod obolelih od nesindromskog autozomno-recesivnog oštećenja sluha u Srbiji

Oštećenje sluha predstavlja najčešće senzorneuralno oboljenje kod ljudi i identifikovan je veliki broj gena koji uzrokuju ovo oboljenje. Mutacije u DFNB1 lokusu, koji sadži gene *GJB2* i *GJB6*, su detektovane kod 50% slučajeva.

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivano 119 pacijenata i 160 članova porodice obolelih od nesindromskog autozomno-recesivnog oštećenja sluha (NSAROS) iz Srbije, korišćenjem sledećih metoda: PCR-ARMS, PCR-RFLP i sekvenciranje gena *GJB2*; multipleks PCR gena *GJB6*; PCR-RFLP za ispitivanje varijante na mitohondrijskoj DNK.

Sve identifikovane varijante su detektovane jedino u genu *GJB2*, kod ukupno 57 pacijenata. Genotip sa bi-alelskim mutacijama je detektovan kod 31,09% (37/119) pacijenata. Heterozigotni genotip je identifikovan kod 20 pacijenata, dok kod 62 preostala pacijenta nije pronađena uzročna varijanta u testiranim genima. Ukupno je identifikovano 11 različitih varijanti, a varijanta c.35delG je najčešća sa ukupnom učestalošću od 26,47%. Svim pacijentima su pre genetičkog testiranja urađene audiološke analize koje su pokazale stepen oštećenja sluha od umerenog do dubokog.

Na osnovu rezultata analize povezanosti genotipa i fenotipa, tj. stepena oštećenja sluha, može se zaključiti da postoje određene veze između genotipa i fenotipa. Pacijenti sa homozigotnim i složenim heterozigotnim genotipom su imali veći stepen oštećenja sluha u odnosu na pacijente sa jednom identifikovanom varijantom. Takođe, genotipovi sa mutacijama usled kojih izostaje produkcija proteina ili je protein skraćen, su asocirani sa težom kliničkom slikom u odnosu na genotipove kod kojih je proteinski produkt izmenjen.

Molekularna osnova NSAROS kod pacijenata iz Srbije je prvi put sveobuhvatno obrađena u ovoj doktorskoj disertaciji. Dobijeni rezultati će imati veliku primenu u dijagnostici, genetičkom savetovalištu i pravovremenom lečenju ove bolesti u našoj zemlji. Dobijeni rezultati o tipovima i zastupljenosti mutacija u Srbiji značajno doprinose znanju o učestalostima i geografskoj distribuciji mutacija DFNB1 lokusa kod obolelih.

Ključne reči: DFNB1 lokus, gen *GJB2*, gen *GJB6*, stepen oštećenja sluha, koneksin 26, koneksin 30

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

**Frequency of variants in the *GJB2* and *GJB6* genes  
and phenotypic variability in patients from Serbia with autosomal-recessive nonsyndromic  
hearing loss**

Hearing impairment is the most common sensorineural disorder in humans with many identified causable genes. Despite genetic heterogeneity, a single locus, DFNB1, that contains genes *GJB2* and *GJB6*, accounts for up to 50% of all cases.

This study was carried out in 119 probands and 160 relatives from Serbia with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL). For analysis were used following methods: PCR-ARMS, PCR-RFLP and direct sequencing of the *GJB2* gene; multiplex PCR for *GJB6* gene; PCR-RFLP for detection of variant in mitochondrial DNA.

In 57 patients 11 variants have been identified only in the *GJB2* gene. Fully characterized genotype with bi-allelic mutations was observed in 31.09% of the probands (37/119). Heterozygote form was identified in 20 probands (20/119). The remaining 62 probands were with no causing variants for the tested genes (62/119). The most frequent mutation was c.35delG (26.47%). Audiological analysis performed in all probands showed moderate to profound range of hearing loss.

Association between genotype and the degree of hearing impairment in patients analyzed in this study demonstrated that patients with bi-allelic mutations associate with the more severe hearing loss when compared with those identified with only one affected allele. Also, patients with bi-allelic truncating mutations, associate with the more severe hearing loss when compared with those identified with one truncating and non-truncating mutations.

The molecular basis of ARNSHL in patients from Serbia was analyzed for the first time in this study. The results have significant influence for the genetic diagnosis of deafness, genetic counseling, and early treatment in our country. Also, our findings contribute to the knowledge of geographic distribution of DNB1 mutations.

Key words: DFNB1 locus, gene *GJB2*, gene *GJB6*, degree of hearing impairment, connexin 26, connexin 30

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics



## SADRŽAJ:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. FIZIOLOGIJA SLUHA.....  | 1         |
| 1.1.1. Anatomija uva.....  | 1         |
| 1.1.2. Transdukcija zvuka u nervni impuls.....   | 3         |
| 1.1.3. Endokohlearni potencijal i recikliranje jona K <sup>+</sup> .....   | 4         |
| 1.1.4. Pukotinaste veze u kohlearnom sistemu.....  | 5         |
| 1.2. OŠTEĆENJE SLUHA.....  | 6         |
| 1.3. GENETIČKA OSNOVA OŠTEĆENJA SLUHA.....   | 6         |
| 1.4. ULOGA GENA <i>GJB2</i> I <i>GJB6</i> KOD AUTOZOMNO RECESIVNOG NESINDROMSKOG OŠTEĆENJA SLUHA.....            | 8         |
| 1.4.1. Koneksini i pukotinaste veze.....   | 8         |
| 1.4.2. Geni <i>GJB2</i> i <i>GJB6</i> .....  | 9         |
| 1.4.3. Koneksini 26 i 30 u kohlei.....   | 11        |
| 1.4.4. Varijante u genu <i>GJB2</i> .....  | 13        |
| 1.4.5. Parcijalne delecije gena <i>GJB6</i> .....  | 14        |
| 1.4.6. Genotip-fenotip asocijacije.....  | 15        |
| 1.4.7. Prednost heterozigotnih nosioca varijanti u DFNB1 lokusu.....   | 15        |
| 1.5. STRATEGIJA GENETIČKOG TESTIRANJA KOD PACIJENATA SA KLINIČKI POSTAVLJENOM DIJAGNOZOM NSAROS.....             | 16        |
| <b>2. CILJEVI RADA</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....   | <b>19</b> |
| 3.1. PACIJENTI.....  | 19        |
| 3.2. METODE.....   | 20        |
| 3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi.....  | 20        |
| 3.2.2. Izolacija DNK iz uzorka horionskih resica.....  | 21        |
| 3.2.3. PCR-ARMS metoda.....  | 21        |
| 3.2.3.1. PCR-ARMS reakcija za direktnu detekciju varijante c.35delG u genu <i>GJB2</i> .....                     | 22        |
| 3.2.3.2. PCR-ARMS reakcija za direktnu detekciju varijante c.71G>A u genu <i>GJB2</i> .....                      | 22        |
| 3.2.3.3. Priprema agaroznog gela i horizontalna elektroforeza.....   | 23        |
| 3.2.3.4. Analiza PCR produkata.....  | 23        |
| 3.2.4. PCR-RFLP metoda.....  | 24        |
| 3.2.4.1. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju varijante c.101T>C u genu <i>GJB2</i> .....                       | 25        |
| 3.2.4.2. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju <i>splajs</i> mutacije c.-23+1G>A egzona 1 gena <i>GJB2</i> ..... | 26        |
| 3.2.4.3. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju mitohondrijske varijante m.1555A>G gena <i>MTRNR1</i> .....       | 27        |
| 3.2.5. Multipleks PCR metoda.....  | 29        |
| 3.2.5.1. Multipleks PCR reakcija za detekciju delecije del( <i>GJB6</i> -D13S1830) u genu <i>GJB6</i> .....      | 29        |
| 3.2.5.2. Multipleks PCR reakcija za detekciju delecije del( <i>GJB6</i> -D13S1854) u genu <i>GJB6</i> .....      | 30        |
| 3.2.6. Detekcija varijanti primenom metode sekvenciranja egzona 2 gena <i>GJB2</i> .....                         | 31        |
| 3.2.6.1. PCR umnožavanje egzona 2 gena <i>GJB2</i> .....   | 31        |
| 3.2.6.2. Sekvenciranje egzona 2 gena <i>GJB2</i> .....   | 32        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.6.3.  | Prečišćavanje reakcije sekvenciranja i analiza na automatskom DNK sekvenatoru   | 32        |
| 3.2.7.    | Fluorescentna multipleks STR-PCR analiza za određivanje eventualnog prisustva maternalne kontaminacije prilikom prenatalne dijagnostike ..... | 33        |
| 3.2.7.1.  | Detekcija dobijenih PCR produkata na kapilarnoj elektroforezi .....   | 34        |
| 3.2.7.2.  | Procena eventualnog prisustva maternalne kontaminacije u fetalnom uzorku .....  | 34        |
| 3.2.8.    | Audiometrijske analize .....  | 34        |
| 3.2.9.    | Statističke metode .....  | 36        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI .....</b>  | <b>37</b> |
| 4.1.      | IDENTIFIKACIJA VARIJANTI U GENIMA <i>GJB2</i> I <i>GJB6</i> I ODREĐIVANJE NJIHOVE UČESTALOSTI KOD OBOLELIH OD NSAROS U SRBIJI.....            | 37        |
| 4.1.1.    | Direktna detekcija varijante c.35delG u genu <i>GJB2</i> primenom PCR-ARMS metode ..  | 37        |
| 4.1.2.    | Direktna detekcija varijante c.71G>A u genu <i>GJB2</i> primenom PCR-ARMS metode ..   | 39        |
| 4.1.3.    | Direktna detekcija varijante c.101T>C u genu <i>GJB2</i> primenom PCR-RFLP metode..   | 40        |
| 4.1.4.    | Sekvenciranje egzona 2 gena <i>GJB2</i> metodom po Sangeru .....  | 42        |
| 4.1.5.    | Direktna detekcija varijante c.-23+1G>A gena <i>GJB2</i> primenom PCR-RFLP metode ..  | 47        |
| 4.1.6.    | Direktna detekcija delecija u genu <i>GJB6</i> primenom multipleks PCR metode .....   | 47        |
| 4.1.7.    | Direktna detekcija mitohondrijske varijante m.1555A>G primenom PCR-RFLP metode  | 49        |
| 4.2.      | ODREĐIVANJE DISTRIBUCIJE DETEKTOVANIH VARIJANTI I GENOTIPOVA U GENIMA <i>GJB2</i> I <i>GJB6</i> KOD OBOLELIH OD NSAROS U SRBIJI.....          | 49        |
| 4.3.      | ISPITIVANJE FENOTIPKE VARIJABILNOSTI IDENTIFIKOVANIH VARIJANTI - ASOCIJACIJA GENOTIPOVA SA STEPENOM OŠTEĆENJA SLUHA .....                     | 53        |
| 4.3.1.    | Rezultati audioloških ispitivanja .....   | 53        |
| 4.3.2.    | Ispitivanje asocijacije detektovanih genotipova varijante c.35delG sa stepenom oštećenja sluha .....  | 54        |
| 4.3.3.    | Ispitivanje asocijacije svih detektovanih genotipova sa stepenom oštećenja sluha.....   | 56        |
| 4.3.4.    | Ispitivanje asocijacije stepena oštećenja sluha i identifikovanih varijanti u odnosu na njihov efekat na koneksin 26 .....                    | 59        |
| 4.4.      | GENETIČKO SAVETOVANJE VISOKO RIZIČNIH PORODICA - IZBOR PRAVILNE STRATEGIJE GENETIČKOG TESTIRANJA.....   | 61        |
| 4.4.1.    | Određivanje statusa nosioca u visoko rizičnim porodicama .....  | 61        |
| 4.4.2.    | Prenatalna dijagnostika NSAROS .....  | 62        |
| <b>5.</b> | <b>DISKUSIJA .....</b>  | <b>66</b> |
| 5.1.      | IDENTIFIKACIJA VARIJANTI U GENIMA <i>GJB2</i> I <i>GJB6</i> I ODREĐIVANJE NJIHOVE UČESTALOSTI KOD OBOLELIH OD NSAROS U SRBIJI.....            | 66        |
| 5.1.1.    | Direktna detekcija varijante c.35delG u genu <i>GJB2</i> .....  | 66        |
| 5.1.2.    | Direktna detekcija varijante c.71G>A u genu <i>GJB2</i> .....   | 68        |
| 5.1.3.    | Direktna detekcija varijante c.101T>C u genu <i>GJB2</i> .....  | 70        |
| 5.1.4.    | Sekvenciranje egzona 2 gena <i>GJB2</i> .....   | 71        |
| 5.1.5.    | Direktna detekcija varijante c.-23+1G>A gena <i>GJB2</i> .....  | 76        |
| 5.1.6.    | Direktna detekcija delecija u genu <i>GJB6</i> .....  | 77        |
| 5.1.7.    | Direktna detekcija mitohondrijske varijante m.1555A>G.....  | 78        |
| 5.2.      | ODREĐIVANJE DISTRIBUCIJE DETEKTOVANIH VARIJANTI I GENOTIPOVA U GENIMA <i>GJB2</i> I <i>GJB6</i> KOD OBOLELIH OD NSAROS U SRBIJI.....          | 79        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 5.3.      | ISPITIVANJE FENOTIPSKU VARIJABILNOSTI IDENTIFIKOVANIH VARIJANTI - ASOCIJACIJA<br>GENOTIPOVA SA STEPENOM OŠTEĆENJA SLUHA ..... | 82        |
| 5.3.1.    | Rezultati audioloških ispitivanja.....  | 82        |
| 5.3.2.    | Ispitivanje asocijacije detektovanih genotipova varijante c.35delG sa stepenom<br>oštećenja sluha .....                       | 82        |
| 5.3.3.    | Ispitivanje asocijacije svih detektovanih genotipova sa stepenom oštećenja sluha.....   | 84        |
| 5.3.4.    | Ispitivanje asocijacije stepena oštećenja sluha i identifikovanih varijanti u odnosu na<br>njihov efekat na koneksin 26 ..... | 84        |
| 5.4.      | GENETIČKO SAVETOVANJE VISOKO RIZIČNIH PORODICA - IZBOR PRAVILNE STRATEGIJE<br>GENETIČKOG TESTIRANJA.....                      | 88        |
| 5.4.1.    | Određivanje statusa nosioca kod bliskih članova porodice obolelih od NSAROS.....  | 88        |
| 5.4.2.    | Prenatalna dijagnostika .....   | 89        |
| <b>6.</b> | <b>ZAKLJUČAK.....</b>   | <b>90</b> |
| <b>7.</b> | <b>LITERATURA.....</b>  | <b>92</b> |

# 1. UVOD

## 1.1. Fiziologija sluha

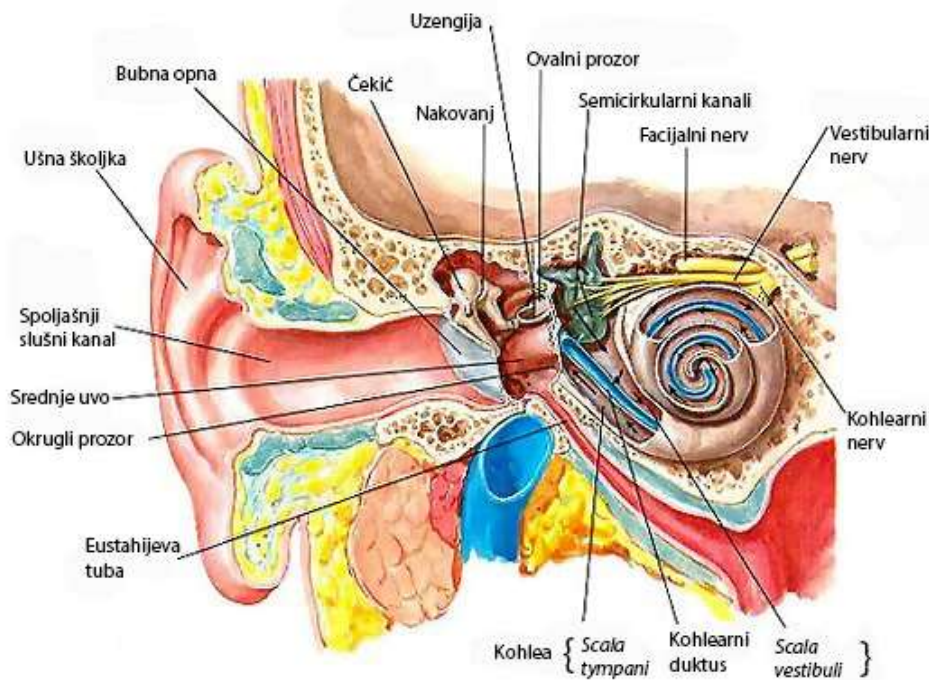
Sluh predstavlja jedno od pet čula, omogućava detekciju promene zvučnih vibracija, što ga svrstava u mehanoreceptore. Čulo sluha je filogenetski najmlađe, nastalo je od čula za ravnotežu u vreme pojave kopnenih kičmenjaka. Kod životinja, čulo sluha omogućava detekciju i najmanjih zvučnih vibracija u okolini. Kod ljudi, sluh ima primarnu funkciju u prilagođavanju spoljašnjoj sredini, komunikaciji i formiranju ličnosti. Veoma je važan za razvoj govora, mišljenja i komunikativnih sposobnosti čoveka (Ječmenica, 2016; Jovanović Simić i sar, 2018). Čulo sluha kod ljudi ima veliki raspon osetljivosti, otpornost prema velikim nadražajima kao i izrazitu selektivnost zvukova, sa sposobnošću analize koja je mnogo bolja od drugih analizatora (Davies, 2003).

### 1.1.1. Anatomija uva

Građa uva u anatomskom i funkcionalnom smislu je podeljena na tri celine (Slika 1):

1. Spoljašnje uvo (lat. *auris externa*)
2. Srednje uvo (lat. *auris media*)
3. Unutrašnje uvo (lat. *auris interna*)

Spoljašnje i srednje uvo predstavljaju konduktivni aparat (sprovode zvuk u mehaničkom obliku, vibracija), dok je unutrašnje uvo senzorni aparat (mehaničke vibracije se prenose u električne, akcioni potencijal) (Jovanović Simić i sar, 2018).



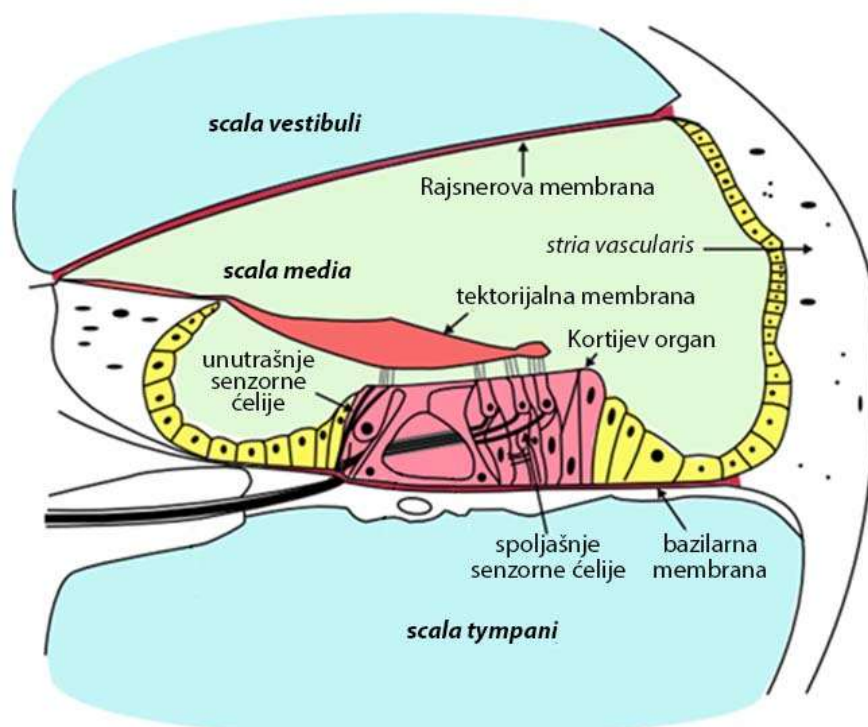
Slika 1. Anatomija ljudskog uva

(preuzeto sa: <https://conciiergeaudiologyfl.com/uncategorized/how-do-we-hear/>, modifikovano)

Spoljašnje uvo čine ušna školjka (lat. *auricula*) i spoljašnji slušni kanal (lat. *meatus acusticus externus*).

Srednje uvo je sistem šupljina ispunjenih vazduhom i sastoji se iz bubne opne (lat. *membrana tympani*) koja predstavlja završetak spoljašnjeg slušnog kanala, i tri slušne koščiće: čekić (lat. *malleus*), nakovanj (lat. *incus*) i uzengija (lat. *stapes*). Slušne koščiće su međusobno zglobljene i imaju funkciju u sprovođenju zvučnih talasa sa bubne opne do unutrašnjeg uva. Šupljina srednjeg uva je povezana sa ždrelom preko Eustahijeve tube i njome se omogućava vazдушna veza spoljne sredine i ovog dela uva koja može dovesti do izjednačavanja pritiska sa obe strane bubne opne.

Unutrašnje uvo je smešteno u koštanim kanalima i ispunjeno je tečnošću. Sastoji se od vestibularnog aparata koji predstavlja čulo ravnoteže i kohlee u kojoj se nalaze slušni receptori (Moller, 2006). Kohlea ima izgled puža, uvijena je u više od 2,5 navoja i podeljena je u tri cevi ili skale (Slika 2). Spoljašnje cevi (lat. *scala tympani* i *scala vestibuli*) čine koštani labirint i ispunjene su perilimfom koja je bogata jonima  $\text{Na}^+$ , a siromašna jonima  $\text{K}^+$ . Između ove dve cevi smešteno je kohlearno proširenje membranoznog labirinta tj. srednja cev (lat. *scala media*) koja je ispunjena endolimfom (bogata jonima  $\text{K}^+$ , a siromašna jonima  $\text{Na}^+$ ) (Wangemann, 2006; Jovanović Simić i sar, 2018). U bazi kohlee nalaze se dve membrane. Gornja (ovalni prozor), na koju se naslanja uzengija i donja (okrugli prozor). Svako pomeranje ovalnog prozora prilikom prenošenja zvuka sa uzengije, prati pomeranje okruglog prozora u suprotnom smeru, na taj način omogućavajući prenošenje zvuka ka unutrašnjosti kohlee. *Scala media* je ograničena sa donje strane bazilarnom membranom. Čitavom dužinom bazilarne membrane se nalaze receptorske ćelije (senzorne i potporne ćelije koje ulaze u sastav Kortijevog organa) koje reaguju na svaki njen pokret što rezultuje nervnom aktivnošću kojom se nadražaj prenosi do odgovarajućih centara u mozgu (Šumarac Pavlović i Mijić, 2017).



**Slika 2.** Građa kohlearnog aparata unutrašnjeg uva

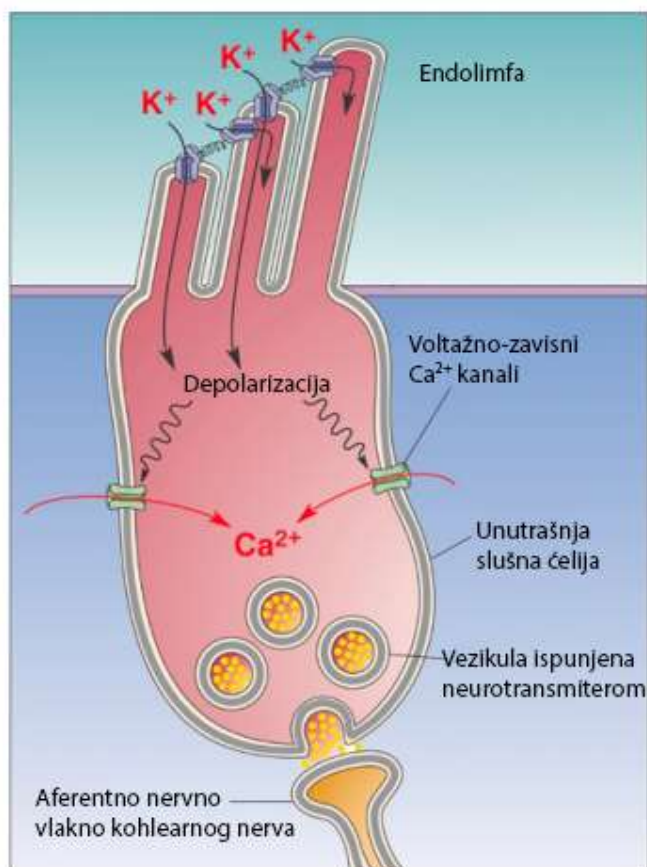
(prezeto sa: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cochlea>, modifikovano)

### 1.1.2. Transdukcija zvuka u nervni impuls

Zvuk je mehanički talas koji se periodičnim oscilovanjem izvora prostire u svim pravcima i dovodi do promene pritiska u nekoj materijalnoj sredini. Kroz gasove i tečnosti, zvuk se prostire kao longitudinalni talas. Percepcija zvuka je funkcija dve dimenzije: frekvencije i nivoa zvučne pobude. Frekvencija predstavlja broj oscilacija u sekundi (izražava se u hercima, Hz) i povezana je sa visinom zvuka, dok je nivo zvučne pobude, tj. glasnoća zvuka, povezan sa amplitudom. Ljudsko uvo reaguje na zvučne nadražaje u intervalu frekvencija od 20 Hz do 20 kHz (čujne frekvencije) (Šumarac Pavlović i Mijić, 2017; Jovanović Simić i sar, 2018).

Zvuk iz spoljašnje sredine do centra čula sluha prolazi kroz različite medijume. Iz spoljašnje sredine zvučni talas putuje kroz spoljašnje uvo do bubne opne. Ušna školjka i spoljašnji slušni kanal predstavljaju rezonator, jer dovode do povećanja zvučnog pritiska na bubnoj opni od 10 dB do 20 dB između 2 kHz i 6 kHz, što predstavlja važan frekventni opseg za komunikaciju. U srednjem uvu zvuk se prenosi preko bubne opne, zglobljenih slušnih košćica koje funkcionišu sistemom poluge do ovalnog prozora unutrašnjeg uva. Pošto zvuk prolazi kroz vazduh u srednjem uvu, a zatim se prenosi u unutrašnje uvo ispunjeno tečnošću, a akustična impendansa tečnosti unutrašnjeg uva je mnogo veća od impendanse vazduha, srednje uvo ima ulogu transformatora impendanse. Da nema srednjeg uva i ove njegove uloge, efikasnost transmisije zvučnih talasa iz vazduha u tečnost bi bila veoma slaba i dolazilo bi do velikih gubitaka. Funkcija transformatora je omogućena kako odnosom površine bubne opne (koja je 14 puta veća) i pločice uzengije koja se naslanja na ovalni prozor, tako i odnosom krakova košćica (Davies i sar, 2003; Gacek i sar, 2003).

Kada se zvučni talas prenese preko ovalnog prozora u unutrašnje uvo, *scala media* sa svojim sadržajima ima tendenciju da se pomeri, tzv. „kohlearna pregrada“. Bazilarna membrana, donja granica *scala media*-e, pri mehaničkom zvučnom stimulusu počinje da oscilira. Debljina bazilarne membrane se razlikuje njenom dužinom; najtanja je u zoni baze, a širi se ka vrhu. Ovakav izgled omogućava membrani da ima svoje rezonance. Najviša frekvencija rezonance bazilarne membrane je u bazi u blizini ovalnog prozora i iznosi 20 kHz, dok je 20 Hz najniža frekvencija koja se nalazi na samom kraju membrane, suprotno od ovalnog prozora. Oscilacije uzrokovane zvukom izazivaju pomeranje bazilarne membrane do mesta poklapanja pobudne frekvencije i frekvencije mehaničke rezonance membrane, što rezultuje maksimalnom amplitudom variranja. Nakon tog mesta bazilarna membrana ostaje u stanju mirovanja. Deo energije vibriranja membrane se prenosi na Kortijev organ. Mehaničke vibracije se pretvaraju u električne stimuluse, tj. akcioni potencijal u Kortijevom organu. On je ograničen retikularnom laminom i tektorijskom membranom i sadrži kako senzorne, tako i potporne ćelije (tzv. *Deitersove*, *Hensenove*, *Claudiusove*) koje se prostiru u redovima čitavom dužinom kohlee. Postoje dve vrste senzornih ćelija: spoljašnje slušne ćelije, koje imaju ulogu u povećanju osetljivosti na zvučne stimuluse niskog intenziteta i selektivnosti frekvencija, i unutrašnje slušne ćelije, poredane u jednom redu, okružene potpornim ćelijama, sa funkcijom prevođenja mehaničkih vibracija u nervni impuls (Moller, 2006). Slušne ćelije na apikalnoj površini imaju treplje, tzv. stereocilije. Pomeranje bazilarne membrane dovodi do pokretanja stereocilija (od najmanje ka najvećoj) na apikalnoj površini i spoljašnjih i unutrašnjih slušnih ćelija, rezultujući u otvaranju neselektivnih katjonskih kanala (za jone  $\text{Ca}^{2+}$  i jone  $\text{K}^{+}$ ) i depolarizaciji ćelijske membrane (LeMasurier i Gillespie, 2005; Ricci i sar, 2005; Beurg i sar, 2006; Stauffer i Holt, 2007). Inluks jona  $\text{K}^{+}$  dovodi do otvaranja kanala za jone  $\text{Ca}^{2+}$ . Efekat jona  $\text{Ca}^{2+}$  u jonskim transmembranskim kanalima unutrašnjih slušnih ćelija dovodi do egzocitoze i oslobađanja neurotransmitera (Moser i Beutner, 2000; Brandt i sar, 2003). Neurotransmitter difunduje kroz sinaptički prostor i generiše nervne impulse u aferentnim nervnim vlaknima kohlearnog nerva, koji se zatim transportuje do viših centara u mozgu (Slika 3) (Salvi i sar, 1991; Evans, 2003).

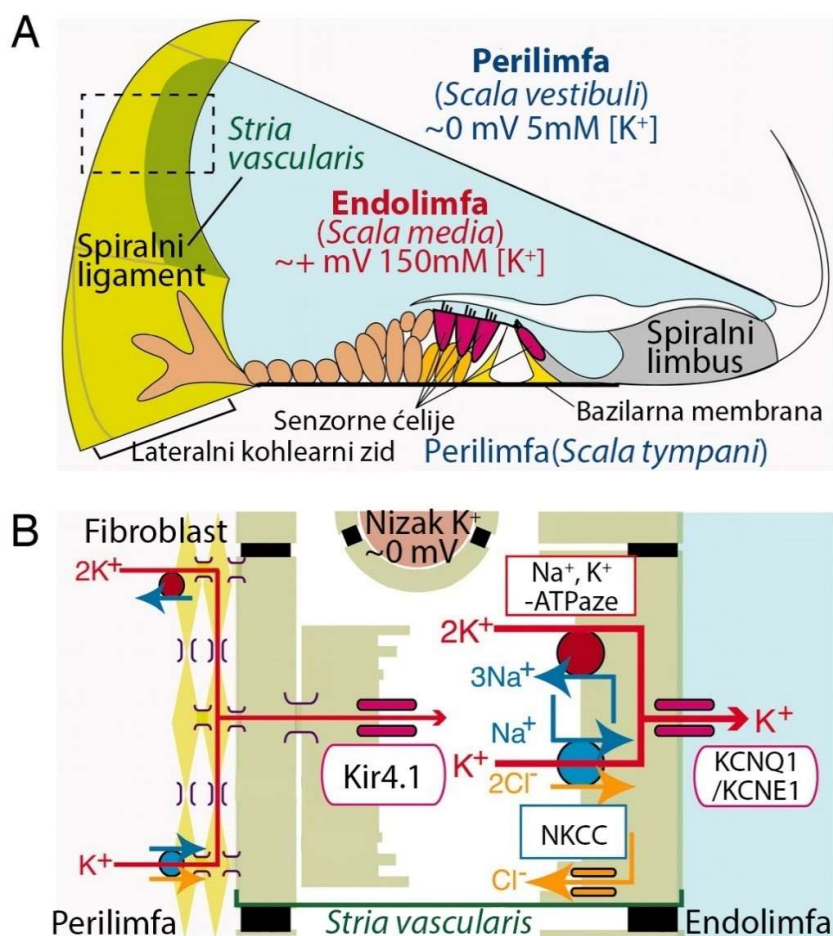


**Slika 3.** Transdukcija zvuka; depolarizacija membrane (prezeto sa: <https://quizlet.com/244350590/auditory-transduction-diagram/>, modifikovano)

### 1.1.3. Endokohlearni potencijal i recikliranje jona $K^+$

*Scala media* je ispunjena tečnošću, endolimfom, koja je bogata jonima  $K^+$  (Mistik i Ashmore, 2009). Električni potencijal endolimfe u prostoru između tektorijalne membrane i senzornih ćelija iznosi +80 mV. Međutim unutar senzornih ćelija električni potencijal je negativan (oko -45 mV kod unutrašnjih i -70 mV kod spoljašnjih slušnih ćelija). Ovakva razlika električnog potencijala je esencijalna za hemijske procese u senzornim ćelijama (Slika 4A). Ulazak jona  $K^+$  u ćeliju menja njen intracelularni potencijal i dovodi do depolarizacije membrane, ekscitacije i oslobađanja neurotransmitera, kao produkta prevođenja mehaničkog nadražaja u električni impuls (Babić, 2007). Suprotan proces (pomeranje stereocilija od najveće ka najmanjoj) dovodi do hiperpolarizacije i zatvaranja jonskih kanala, što rezultuje u nagomilavanju jona  $K^+$  u senzornim ćelijama. Recikliranje jona  $K^+$  je omogućeno aktivnim transportom preko potpornih ćelija do *striae vascularis* (lateralnog dela kohlee) kojom se vraćaju u endolimfu (Slika 4B) (Jovanović Simić i sar, 2018).

Smatra se da *stria vascularis* generiše endokohlearni potencijal. On je konstantan i iznosi +80 mV, esencijalan je za senzornu transdukciju i njegovo postojanje zavisi od procesa aktivnih metaboličkih jonskih pumpi u *stria vascularis* (Slika 4A i 4B) (Wangemann, 2002).



**Slika 4.** A. Razlika potencijala između perilimfe i endolimfe koja dovodi do transdukcije mehaničkog u nervni impuls u senzornim ćelijama Kortijevog organa; B. Recikliranje jona  $K^+$  iz perilimfe u endolimfu pomoću aktivnog transporta (preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/How-is-the-highly-positive-endocochlear-potential-Hibino-Nin/a2e5509bcaaf1bc76ad784ada71ba0e99d8cace1/figure/0>, modifikovano)

#### 1.1.4. Pukotinaste veze u kohlearnom sistemu

U kohlearnom sistemu postoje dve mreže pukotinastih veza (engl. *gap junction*): epitelijalna ćelijska mreža između potpornih (nesenzornih) ćelija i vezivno-tkivne mreže između ćelija vezivnog tkiva; smatra se da je njihova uloga u održavanju kohlearne jonske homeostaze, posebno u recikliranju jona  $K^+$  iz perilimfe u endolimfu (Kikuchi i sar, 1995; Santos-Sacchi, 2000; Zhao i sar, 2006). Prema ranijim studijama (Spicer i Schulte, 1998; Jagger i Forge, 2006) kojim se pokazuje različita permeabilnost membrana, smatra se da međućelijska komunikacija pukotinastim vezama ima dodatnu ulogu. Kasnije je pokazano da je za normalno funkcionisanje kohlearnog aparata jako bitan i transport metabolita inozitol-tri-fosfata (IP3) (Srinivas i sar, 2018).



## 1.2. Oštećenje sluha

Oštećenje sluha i gluvoća predstavljaju najčešće senzorneuralno oboljenje kod ljudi (detektovano kod ~70 miliona ljudi širom sveta). Učestalost ovog oboljenja je 1 prema 700/1 000 novorođenčadi (Zheng i sar, 2015). Može se klasifikovati prema tipu i prema vremenu pojavljivanja (Shearer i sar, 2017).

Prema tipu, oštećenje sluha se deli na:

1. Konduktivno - nastaje kao posledica oštećenja spoljašnjeg uva i/ili slušnih košćica
2. Senzorneuralno - nastaje kao posledica oštećenja unutrašnjeg uha (kohlee)
3. Mešovito - predstavlja kombinaciju prvih dva tipa oštećenja
4. Centralna disfunkcija sluha - nastaje kao posledica oštećenja ili disfunkcije osmog kranijalnog nerva, slušnog moždanog stuba (engl. *auditory brain stem*) ili cerebralnog korteksa

Prema vremenu pojavljivanja, oštećenje sluha može biti:

1. Prelingvalno - pre razvoja govora
2. Postlingvalno - nakon razvoja govora

Sluh se meri decibelima (dB). Prag ili 0 dB za svaku frekvenciju se odnosi na nivo na kojem mlade osobe sa neoštećenim sluhom percipiraju ton. Sluh se smatra normalnim, ukoliko su pragovi pojedinca unutar 15 dB od normalnog praga. Težina oštećenja sluha se klasifikuje na osnovu slušnog praga izraženim u dB (Tabela 1) (Hoefsloot i sar, 2013). Frekvencija oštećenja sluha može biti: niska (<500 Hz), srednja (500 Hz – 2 000 Hz) ili visoka (>2 000 Hz) (Hoefsloot i sar, 2013).

Tabela 1. Klasifikacija oštećenja sluha prema stepenu oštećenja

| Težina oštećenja sluha | Prag sluha izražen u dB |
|------------------------|-------------------------|
| <b>Umereno</b>         | 20-40                   |
| <b>Srednje</b>         | 41-55                   |
| <b>Srednje teško</b>   | 56-70                   |
| <b>Teško</b>           | 71-95                   |
| <b>Duboko</b>          | >95                     |

U 50% slučajeva oštećenje sluha ima genetičku osnovu, dok je uticaj sredinskih faktora uzrok nastanka bolesti kod preostalih slučajeva. U sredinske faktore se ubrajaju: rubeola ili druge ne bakterijske infekcije u trudnoći (citomegalovirus, toksoplazmoza, *Herpes simplex*), postnatalne infekcije koje izazivaju bakterijski meningitis, faktori povezani sa ototoksičnim medikamentima itd. (Hoefsloot i sar, 2013; Shearer i sar, 2017).

Oštećenje sluha ne podleže obavezi prijavljivanja u našoj zemlji i to dovodi do nedostatka podataka o prevalenci, odnosno pravom broju obolelih osoba. Na to značajno utiče i nesprovođenje sistematskog, organizovanog neonatalnog skrininga oštećenja sluha. Za sada, svi podaci o broju dece sa kongenitalnim oštećenjem sluha rezultat su proizvoljne procene ili proračuna na osnovu učestalosti u drugim zemljama i ukupnog broja živorođene dece. Prema zvaničnim podacima, u Srbiji se godišnje rađa 65 000 beba, dakle, okvirno bi incidenca bila od 65 do 195 beba godišnje sa senzorneuralnim oštećenjem sluha (Mikić, 1995; Jecmenica, 2016).

## 1.3. Genetička osnova oštećenja sluha

Nasledni oblici oštećenja sluha se u 30% slučajeva javljaju u formi sindroma (povezani sa malformacijama spoljašnjeg uha i drugih organa ili sa problemima drugih organskih sistema), dok su

izolovano oboljenje kod 70% obolelih (Hilgert i sar, 2009; Essammak i sar, 2014). Na osnovu toga, nasledno oštećenje sluha se klasifikuje kao sindromsko i nesindromsko (Shearer i sar, 2017).

Nasledna oštećenja sluha sindromskog tipa se dele na osnovu načina nasleđivanja, i mogu biti (Shearer i sar, 2017):

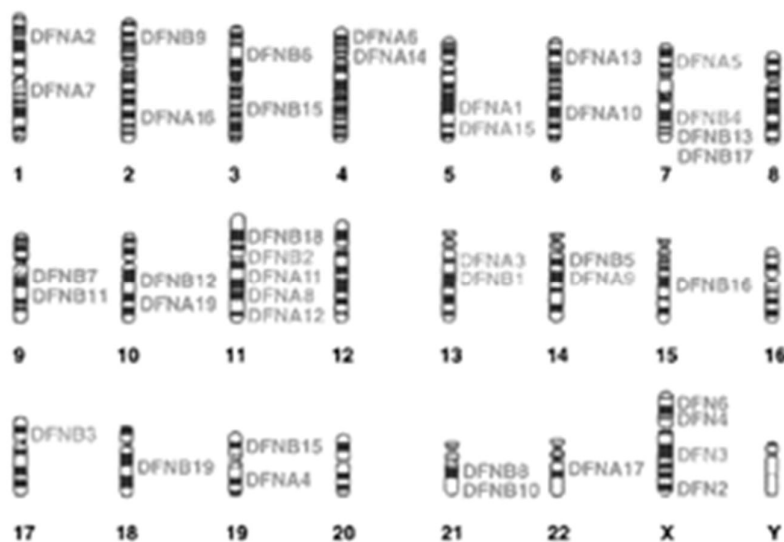
- Autozomno dominantni: Vardenburgov sindrom (engl. *Waardenburg syndrome*), Branhiotorenalni sindrom (BOR), Stiklerov sindrom (engl. *Stickler syndrome*), Neurofibromatoza 2 (NF2);
- Autozomno recesivni: Ašerov sindrom (engl. *Usher syndrome*), Pendredov sindrom, Jervellov i Lange-Nielsenov sindrom, biotinidazna deficijencija, Refsumova bolest;
- X-vezani: Alportov sindrom, Mohr-Tranebjaergov sindrom (sindrom gluvoće-distonije-optičke atrofije);
- Mitohondrijski.

Nesindromsko oštećenje sluha (NSOS) se takođe može klasifikovati na osnovu načina nasleđivanja (Hoefsloot i sar, 2013):

1. Autozomno recesivno - javlja se u 80% slučajeva i vezano je za lokuse obeležene kao DFNB (DFN - engl. *deafness*);
2. Autozomno dominantno - u 17% slučajeva, lokusi obeleženi kao DFNA;
3. X-vezano - kod 2-3% obolelih, lokusi DFNX;
4. Mitohondrijsko - javlja se u <1% slučajeva.

Lokusi su dobili ime na osnovu načina nasleđivanja, a broj nakon imena lokusa označava redosled mapiranja gena i/ili njihovo otkriće.

Genetički uzrokovano NSOS je veoma heterogeno. Mapirano je preko 150 lokusa i identifikovano ~250 gena uzročnika (Hereditary Hearing loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>) (Slika 5).



**Slika 5.** Genetički uzrokovano nesindromsko oštećenje sluha (NSOS): imena identifikovanih lokusa i njihova lokacija (preuzeto sa: [https://www.nature.com/articles/nm1198\\_1238](https://www.nature.com/articles/nm1198_1238))

Iako je identifikovan veliki broj lokusa koji se povezuju sa oštećenjem sluha, pokazano je da su mutacije u lokusu DFNB1 (OMIM\* 220290) detektovane kod više od 50% pacijenata sa autozomno recesivnim nesindromskim oštećenjem sluha (NSAROS) (Hoefsloot i sar, 2013). DFNB1 lokus sadrži gene *GJB2* (engl. *Gap junction protein,  $\beta$ 2*, OMIM\*121011) i *GJB6* (engl. *Gap junction protein,  $\beta$ 6*, OMIM\*604418). Ovi geni kodiraju proteine, koneksine (gen *GJB2* - koneksin 26, gen

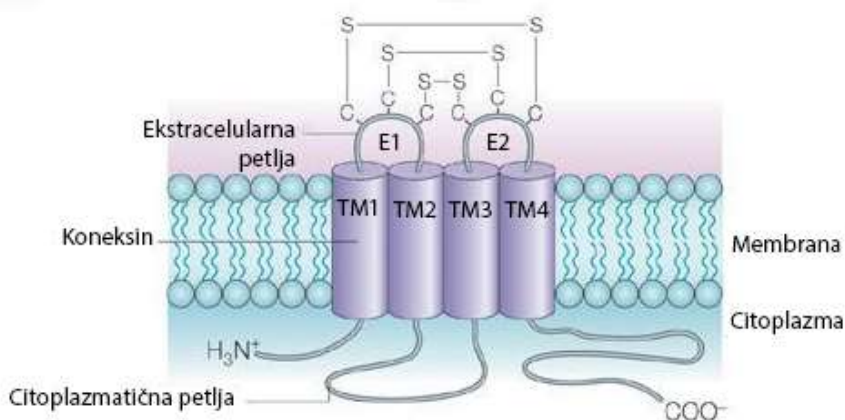
*GJB6* - koneksin 30) koji se eksprimiraju u unutrašnjem uvu i imaju ulogu u međucelijskoj komunikaciji posredstvom koneksojskih kanala i pukotinastih veza.

#### 1.4. Uloga gena *GJB2* i *GJB6* kod autozomno recesivnog nesindromskog oštećenja sluha

##### 1.4.1. Koneksini i pukotinaste veze

Pukotinaste veze (engl. *gap junction*) su međucelijski kanali koji omogućavaju metaboličku i električnu komunikaciju ćelija (Vinken, 2015; Srinivas i sar, 2018). Prisutne su i kod beskičmenjaka i kod kičmenjaka. Kod beskičmenjaka, pukotinaste veze se formiraju pomoću proteina ineksina, dok su kod kičmenjaka izgrađeni od familije proteina koneksina (Wingard i Zhao, 2015).

Koneksini imaju četiri transmembranska domena (TM1-TM4) povezana dvema ekstracelularnim petljama (E1 i E2). Terminusi N i C, kao i petlja koja povezuje TM2 i TM3 domene, su lokalizovani u citoplazmi (Slika 6) (Srinivas i sar, 2018).



**Slika 6.** Građa koneksina lokalizovanog na plazma membrani ćelije  
(preuzeto iz: Willecke i sar, 2002, modifikovano)

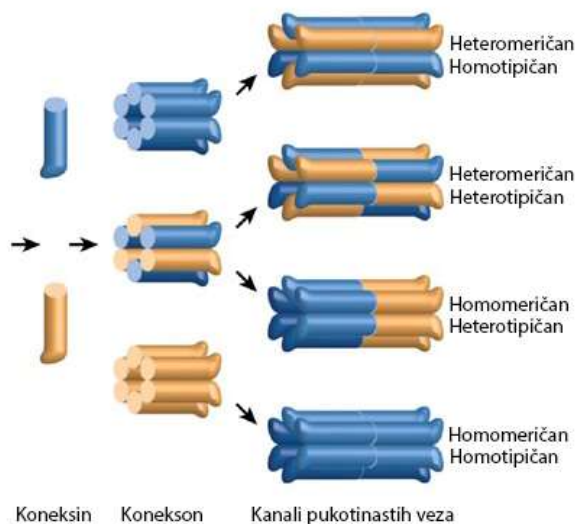
Koneksini oligomerizuju unutar ćelije, u endoplazmatskom retikulumu, formirajući konekson. Konekson ili hemikanal je izgrađen od šest koneksina (heksameri) koji se pozicionira na plazma membrani ćelije. Ovako formiran i pozicioniran hemikanal se može spojiti sa drugim nezavisnim hemikanalom iste ćelije ili sa hemikanalom susedne ćelije stvarajući „poru“ tj. koneksojski kanal, koja omogućava međucelijsku komunikaciju (Srinivas i sar, 2018). Kroz kanale je omogućen transport jona (transport jona  $K^+$ , kao najznačajniji u unutrašnjem uvu), malih molekula kao što su sekundarni glasnici (cAMP<sup>1</sup>, cGMP<sup>2</sup>, ATP<sup>3</sup>) i različitih metabolita (glukoza, IP3). Hemikanali mogu biti formirani od jedne izoforme koneksina (homomerni) ili od više različitih (heteromerni) (Slika 7). Ipak, ne mogu sve izoforme koneksina da oligomerizuju (Bai i Wang, 2014; Koval i Molina, 2014; Srinivas et al, 2018). Pukotinaste veze mogu biti formirane od dva istovetna

<sup>1</sup> cAMP- ciklični adozin-monofosfat

<sup>2</sup> cGMP- ciklični guanozin-monofosfat

<sup>3</sup> ATP- adozin trifosfat

hemikanala (homotipični) ili dva različita (heterotipični kanali) (Slika 7). Smatra se da je kompatibilnost za formiranje pukotinastih veza određena sekvencama u E2 domenu koneksina (White i sar, 1994; Koval i Molina, 2014; Karademir i sar, 2016; Srinivas i sar, 2018).



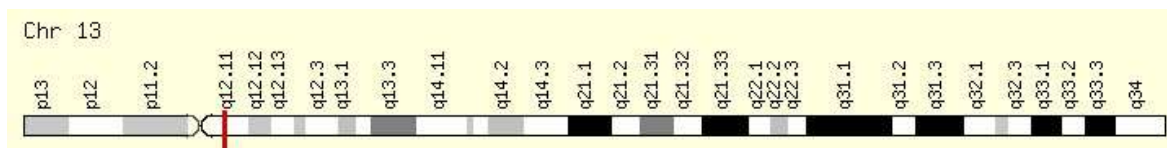
**Slika 7.** Koneksini; njihova oligomerizacija u koneksone i formiranje različitih tipova kanala pukotinastih veza (preuzeto sa: <https://doi.org/10.12968/jowc.2011.20.8.386>, modifikovano)

Intraćelijska komunikacija posredovana pukotinastim vezama ima veliku ulogu u embrionskom i postembrionskom razvoju, suzbijanju kancera, kao i velikom broju fizioloških i patoloških procesa (Wingard i Zhao, 2015).

Humani koneksini su kodirani genima koji su homologni i ima ih 20. Od ovih dvadeset, koneksini 26, 30, 31, 32 i 43 su asocirani sa sindromskim i/ili nesindromskim oštećenjem sluha (Martínez i sar, 2009). Postojanje velikog broja koneksina i različite mogućnosti njihovog kombinovanja, dovodi do formiranja velikog broja različitih kanala sa različitim nivoom propustljivosti među ćelijama. Shodno tome, mutacija u jednom genu koneksina, može uticati na formiranje različitih tipova koneksoških kanala, a samim tim može rezultirati i u varijetetu fenotipova (Martinez i sar, 2009; Srinivas i sar, 2018).

#### 1.4.2. Geni *GJB2* i *GJB6*

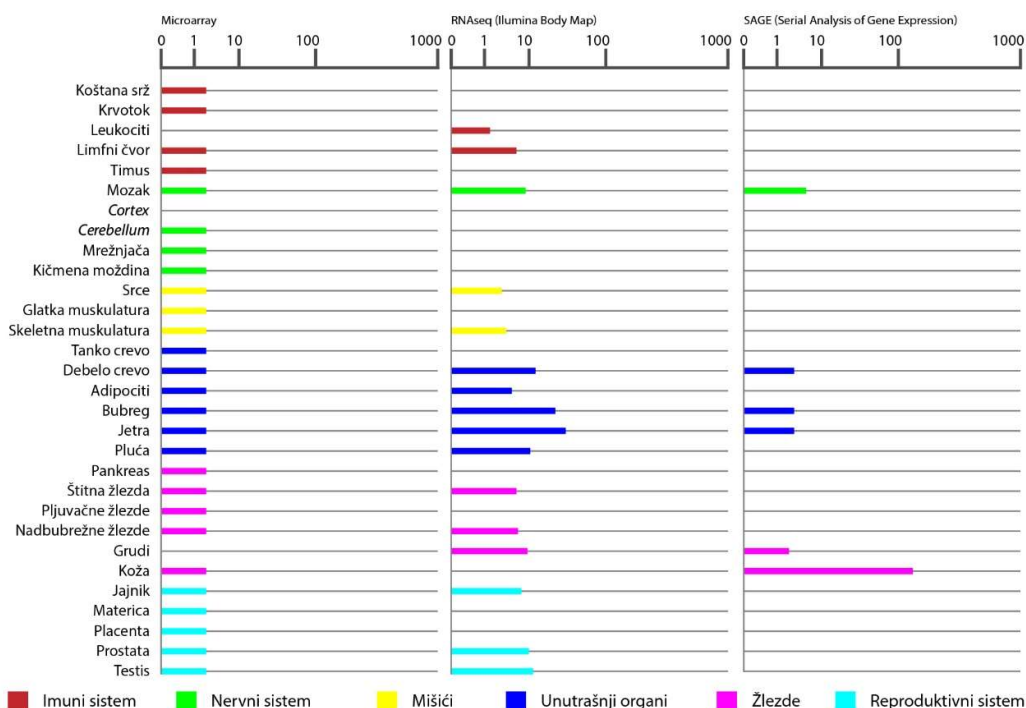
Geni *GJB2* i *GJB6* pripadaju DFNB1 lokusu i locirani su na dugom kraku hromozoma 13 u regionu 13q12.11 (Slika 8).



**Slika 8.** Lokalizacija gena *GJB2* i *GJB6*, lokusa DFNB1, na dugom kraku hromozoma 13 (crveno obeleženo) (preuzeto sa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GJB6>)

Gen *GJB2* (OMIM\*121011) ima genomsku lokaciju (*GRCh38*): 13:20,187,462-20,192,974 bp i njegova sekvenca je identifikovana iz 190 klonova cirkularnih DNK (cDNK). Ovaj gen sadrži dva egzona (egzon 1 i 2) i jedan intron (intron 1, veličine 3 179 kb). Egzon 1 je nekodirajući (veličine 160 bp), dok se u egzonu 2 nalazi kompletna kodirajuća sekvenca. Egzon 2 je veličine 2 134 bp i sadrži 22 bp 5'UTR netranslirajućeg regiona (UTR, engl. *untranslated region*), 678 bp kodirajuće sekvence i 3'UTR region (Kiang i sar, 1997). Gen *GJB2* ima tri transkripta, dva splajsovana i jedan nesplajsovano, dva alternativna promotora i četiri mesta poliadenilacije (Thierry-Mieg i Thierry-Mieg, 2010). Od kodirajućeg dela gena, egzona 2, nastaje protein veličine 226 aminokiselina (ak) molekulske mase 26 kilodaltona (kD) i naziva se koneksin 26 (Cx26). Gen *GJB2* je evoluciono očuvan gen na šta ukazuje podatak o postojanju 79 ortologa. Takođe, ovaj gen je sličan ostalim genima koji kodiraju koneksine; ima 8 paraloga od kojih mu je najbliži gen *GJB3*.

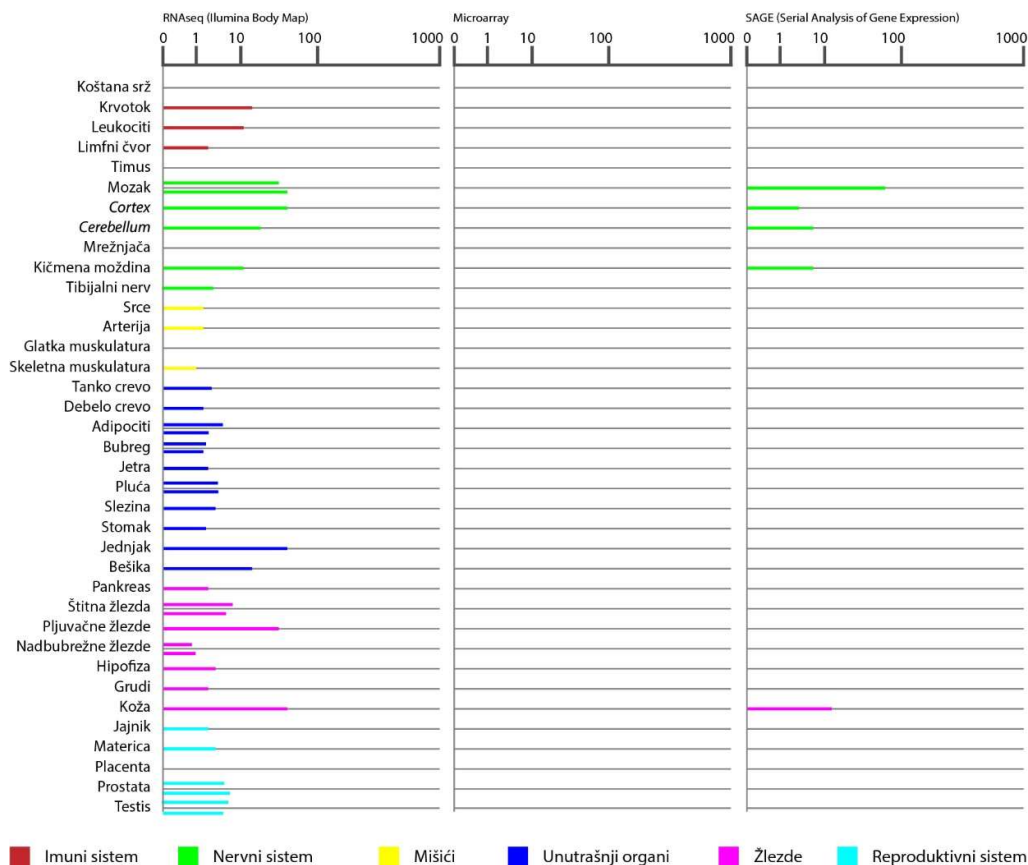
Gen *GJB2* ima visok nivo ekspresije (Slika 9). Njegov proteinski produkt ima ulogu u srčanim mišićnim kontrakcijama, regulaciji ekscitabilnosti neurona, diferencijaciji keratinocita, transportu elektrolita u epitelijanim ćelijama. U kohlei, Cx26 ima ulogu u održavanju homeostaze jona  $K^+$  i transportu IP3.



**Slika 9.** Ekspresija proteinskog produkta gena *GJB2*, koneksina 26 u različitim humanim tkivima. Ekspresija je proučavana pomoću tri različite metode: *Microarray*, *RNASeq* i *SAGE*. X skala se odnosi na to koliko je puta eksprimiran protein u ispitivanim tkivima (*preuzeto sa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GJB2>, modifikovano*)

Gen *GJB6* (OMIM\*604418) je lociran na istoj poziciji na hromozomu kao i gen *GJB2* i veličine je 10 434 bp, sa genomskom lokacijom (*GRCh38*): 13:20,221,961-20,232,318 bp. Sekvenca je identifikovana iz 131 klona cDNK. Sadrži 6 egzona od kojih je samo poslednji translirajući (Essenfelder i sar, 2005). Pokazana je homologija ovog gena kod čoveka i miša u 93%, a identičnost u 77% sa humanim genom *GJB2* (<http://omim.org/entry/604418>). Njegov proteinski produkt je koneksin 30 (Cx30), koji sadrži 261 aminokiselinu i molekulska masu od 30 kD.

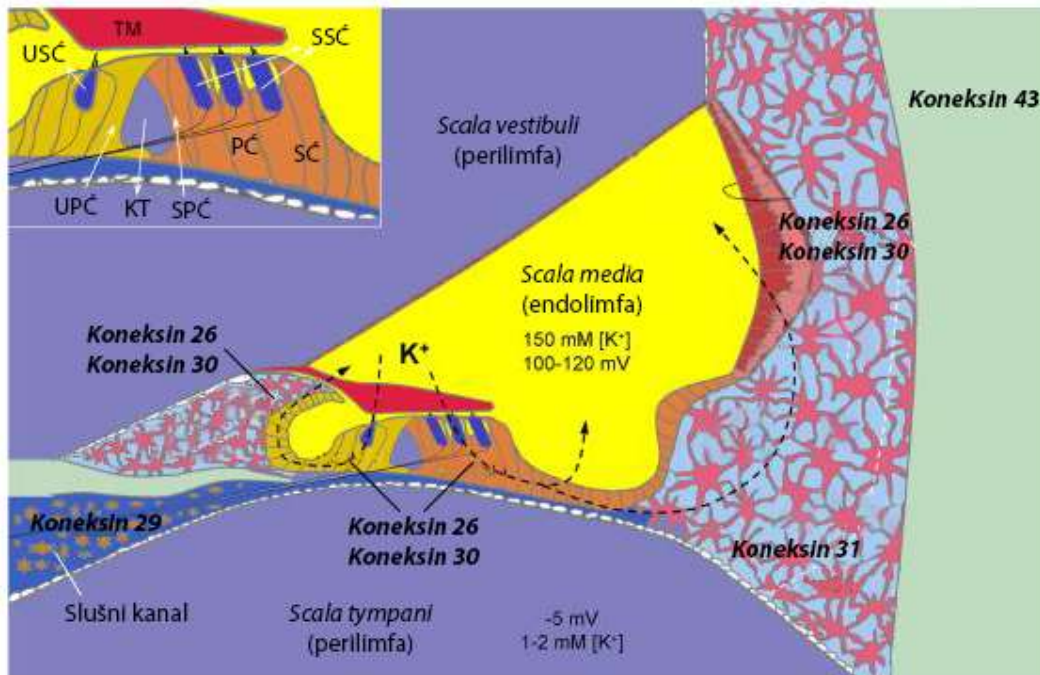
Nivo ekspresije gena *GJB6* prikazan je na Slici 10. Njegov proteinski produkt, Cx30, ima ulogu u procesima apoptoze, ćelijske komunikacije, morfogenezi uva, razvoju unutrašnjeg uva, negativne regulacije ćelijske proliferacije i u senzornoj percepciji zvuka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&term=GJB6>).



**Slika 10.** Ekspresija proteinskog produkta gena *GJB6*, koneksina 30 u različitim humanim tkivima. Ekspresija je proučavana pomoću tri različite metode: *Microarray*, *RNAseq* i *SAGE*. X skala se odnosi na to koliko je puta eksprimiran protein u ispitivanim tkivima (*preuzeto sa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GJB6>, modifikovano*)

### 1.4.3. Koneksini 26 i 30 u kohlei

Kao što je već napomenuto, u kohlearnom sistemu postoje dve mreže pukotinastih veza - epitelijalna ćelijska mreža između potpornih (nesenzornih) ćelija u potpornom epitelu Kortijevog organa i vezivno-tkivne mreže između ćelija vezivnog tkiva u kohlearnom lateralnom zidu (Kikuchi i sar, 1995). Nekoliko gena koji kodiraju koneksine 26, 29, 30, 31 i 43 se eksprimiraju u kohlei (Wingard i Zhao, 2015). Koneksini 26 i 30 su dominantne izoforme, eksprimiraju se i u epitelijalnom i vezivnom tkivu i mogu formirati homotipične i heterotipične/heteromerične kanale među potpornim ćelijama, omogućavajući jednosmerni prolaz (Slika 11) (Zhao, 2000; Zhao i Santos-Sacchi, 2000; Forge i sar, 2003; Zhao i Yu, 2006; Liu i Zhao, 2008). Uloga koneksoških kanala u kohlei je višestruka: recikliranje jona  $K^+$ , snabdevanje energijom i nutrijentima, stvaranje endokohlearnog potencijala, održavanje elektrohemijskih sredina perilimfe i endolimfe, reparacija epitela kohlee (Kikuchi i sar, 1995; Zhao i sar, 2005; Forge i sar, 2013; Chen i sar, 2014; Jagger i sar, 2014; Wingard i Zhao, 2015).



**Slika 11.** Ekspresija konexina u kohlei unutrašnjeg uha i recikliranje jona  $K^+$ . Konexini 26 i 30 su lokalizovani u pomoćnim slušnim ćelijama (PC) Kortijevog organa, spiralnog limusa i *stiae vascularis*. Konexin 29 je lokalizovan u Švanovim ćelijama slušnog nerva. Konexin 31 je lokalizovan u fibroblastima, a konexin 43 u kosti koja naleže na kohleu. Građa Kortijevog organa (gore levo): kortijev tunel (KT), tektorijska membrana (TM), slušne senzorne ćelije (SC) i lokalizacija unutrašnjih (USC) i spoljašnjih senzornih ćelija (SSC), potporna senzorna ćelija (PC) i lokalizacija unutrašnjih (UPC) i spoljašnjih potpornih ćelija (SPC). (preuzeto iz: Wingard i Zhao, 2015, modifikovano)

Brojnim funkcionalnim studijama je pokazano da pukotinaste veze u unutrašnjem uvu pokazuju veliku selektivnost. Konexin 26 je permeabilan i za katjonske i za anjonske molekule, ali pošto je konexin 30 nepropustljiv za anjonske molekule, osnovna funkcija konexina 26 je propustljivost anjona (Elfgang i sar, 1995; Manthey i sar, 2001; Beltramello i sar, 2003). Većina ćelijskih signalnih molekula (IP3, ATP, cAMP, cGMP) su anjoni, tako da konexin 26 ima najveću ulogu u međućelijskoj komunikaciji. To može biti objašnjenje zašto mutacije u konexinu 26 izazivaju oštećenje sluha sa tako velikom učestalošću u odnosu na druge gene.

Studijama na tzv. „knock-out“ miševima je pokazano da deficijencija konexina 26 izaziva patološke promene na kohlei koje uključuju: poremećaje razvoja kohlee, degeneraciju senzornih i neuronskih ćelija, redukciju endokohlearnog potencijala i oštećenje aktivne kohlearne amplifikacije (Cohen-Salmon i sar, 2002; Sun i sar, 2009; Wang i sar, 2009; Liang i sar, 2012; Chen i sar, 2014).

Studije na „knock-out“ miševima kojima je ispitivana deficijencija konexina 30 pokazale su da ako je očuvano ekspimiranje konexina 26 neće doći do gubitka sluha, već samo u kombinaciji neekspimiranja oba konexina (Boulay i sar, 2013; Wingard i Zhao, 2015). Još uvek nije razjašnjeno da li deficijencija samo konexina 30 može izazvati gubitak ili oštećenje sluha (Wingard i Zhao, 2015).

#### 1.4.4. Varijante u genu *GJB2*

Gen *GJB2* je prvi gen koji je povezan sa nesindromskim senzorneuralnim oštećenjem sluha i mutacije u ovom genu su najčešći uzrok ovog oboljenja u mnogim populacijama širom sveta (Kelsell i sar, 1997; Hall i sar, 2012; Tsukada i sar, 2015; Zheng i sar, 2015). Do sada je detektovano preko 200 različitih varijanti u ovom genu (<http://davinci.org.es/deafness>; [https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select\\_db=GJB2](https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select_db=GJB2)). Najveći broj identifikovanih varijanti predstavljaju uzročnike nesindromskog autozomno recisivnog oštećenja sluha (NSAROS), dok je mali broj odgovoran za nastanak autozomno dominantnog NSOS ili oštećenja sluha sa dermatološkim poremećajima (sindromsko oštećenje sluha). Zbog velikog broja identifikovanih varijanti u genu *GJB2*, njihova učestalost i distribucija variraju između populacija, čak i u okviru iste zemlje (Snoeckx i sar, 2005; Tekin i sar, 2010; Essammak i sar, 2014).

U Tabeli 2. su prikazane najčešće identifikovane varijante u različitim populacijama. Sve četiri navedene varijante prema svom efektu spadaju u patogene mutacije i njihova učestalost se povećala kao posledica efekta osnivača (Morell i sar, 1998; Van Laer i sar, 2001; RamShankar i sar, 2003; Yan i sar, 2003).

Tabela 2. Najčešće identifikovane varijante gena *GJB2* u različitim populacijama

| Varijanta         | Promena na nivou DNK | Efekat na nivou DNK                       | Populacija            | Učestalost alela među obolelima (%) | Učestalost nosioca u opštoj populaciji (%) |
|-------------------|----------------------|---|-----------------------|-------------------------------------|--|
| <b>c.35delG</b>   | delecija             | menja okvir čitanja ( <i>frameshift</i> ) | Kavkazijanci          | 70%                                 | 1%-3%                                      |
| <b>c.167delT</b>  | delecija             | menja okvir čitanja ( <i>frameshift</i> ) | Aškenazi Jevreji      | 40% (Izrael)                        | 4%   |
| <b>c.235delC</b>  | delecija             | menja okvir čitanja ( <i>frameshift</i> ) | Istočna Azija, Japan  | 51,9%-66% (Istočna Azija)           | 1%-2% (Japan)                              |
| <b>c.71G&gt;A</b> | supstitucija         | bez smisla ( <i>nonsense</i> )            | Indija, evropski Romi | 40%-67,2%                           | 2,4% (Indija); 4%-5% (populacija Roma)     |

Navedene mutacije, kao i veliki broj drugih identifikovanih patogenih varijanti se nalaze u kodirajućem regionu (egzon 2) gena *GJB2*. Kod velikog broja pacijenata detektovana je samo jedna patogena varijanta u kodirajućem regionu gena *GJB2*. Ovakvi rezultati su inicirali veliki broj studija, koje su se bavile detekcijom mutacija u nekodirajućim regionima gena (egzon 1, intron 1 i bazalni promotor) (Denoyelle i sar, 1999; Janecke i sar, 2002; Seeman i Sakmaryova, 2006; Sirmaci i sar, 2006; Yuan i sar, 2009; del Castillo FJ i del Castillo I, 2011). Kao rezultat mnogobrojnih studija, danas je poznato postojanje sedam patogenih varijanti van kodirajuće sekvence gena *GJB2*. Tri mutacije su tačkaste mutacije: c-23+1G>A (originalno nazvana IVS1+1G>A), *splajs* mutacija



nekodirajućeg egzona 1, g.-77C>T (originalno nazvana -3438C>T), koja onemogućava aktivnost bazalnog promotora gena i c.-22-2A>C, *splajs* mutacija introna 1 (Denoyelle i sar, 1999; Matos i sar, 2007; Gandía i sar, 2013).

Preostale četiri mutacije su velike delecije. Jedna delecija (veličine 920 kb) obuhvata čitav gen *GJB2* (Feldmann i sar, 2009), dok su ostale delecije detektovane u genu *GJB6* (dve parcijalne delecije i del(131-kb)) koje eliminišu *cis*-regulatorni element lociran dosta uzvodno od gena *GJB2* (del Castillo I i sar, 2002; del Castillo FJ i sar, 2005; Wilch i sar, 2010). Svih sedam mutacija je identifikovano kao druga patogena mutacija kod pacijenata obolelih od NSAROS sa već jednom utvrđenom mutacijom u kodirajućem regionu gena *GJB2*. Od svih detektovanih patogenih varijanti van egzona 2 gena *GJB2*, c.-23+1G>A i dve parcijalne delecije gena *GJB6* se javljaju sa većom učestalosti u nekim populacijama, dok se preostale smatraju izolovanim slučajevima.

*Splajs* mutacija nekodirajućeg egzona 1, c.-23+1G>A je identifikovana u populaciji Kavkazijanaca, kao i ljudi iz Alžira, Mongolije i Kine (Snoeckx i sar, 2005; Tekin i sar, 2010; Gandía i sar, 2013; Hoefsloot i sar, 2013).

Prema podacima iz literature, pored pomenutih, identifikovane su i dve mitohondrijske varijante (A1555G i A7445G) kod obolelih od NSOS u kombinaciji sa mutacijama u genu *GJB2* (Hutchin i Cortopassi, 2000; Kenneson i sar, 2002).

#### 1.4.5. Parcijalne delecije gena *GJB6*

Patogene varijante u genu *GJB6* kod obolelih od NSOS se javljaju u mnogo manjem procentu nego u genu *GJB2*. Identifikovano je svega nekoliko tačkastih mutacija u ovom genu i to u pojedinačnim slučajevima, od kojih su neke povezane sa NSAROS, a neke sa autozomno dominantnim NSOS (Grifa i sar, 1999; Azaiez i sar, 2004; Putcha i sar, 2007). Međutim, za razliku od retkih tačkastih mutacija, kod obolelih od NSAROS dve delecije ovog gena se javljaju sa većom učestalošću. To su dve veće parcijalne delecije, del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854), veličine 309 kb i 232 kb redom, lokalizovane uzvodno od gena *GJB2*, uključujući region između gena *GJB6* i *CRYL1* (Slika 12). Identifikovane su kao druga patogena mutacija kod pacijenata sa već poznatom patogenom varijantom u egzonu 2 gena *GJB2* u sledećim populacijama: Španija, Francuska, Italija, Izrael, Velika Britanija i Brazil (del Castillo I i sar, 2002; Dalamon i sar, 2005; del Castillo FJ i sar, 2005; Battellino i sar, 2011).



**Slika 12.** Region hromozoma 13q11-12 u kom se detektuju delecije; šematski prikaz gena *GJB2*, *GJB6* i *CRYL1*, veličina delecija koje se mogu javiti u ovom regionu; strelicama su prikazane tačke prekida, a isprekidane linije pokazuju veličinu svake delecije. (preuzeto i modifikovano sa: <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0021665.g001>)

Kod osoba sa oštećenjem sluha, sa mnogo manjom učestalošću, detektovana je del(*GJB6*-D13S1830) u homozigotnom obliku, kao i u nekim slučajevima složeni heterozigoti za del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854) (del Castillo I i sar, 2003; Pandya i sar, 2003; Roux i sar, 2004; del Castillo FJ i sar, 2005; Angeli, 2008). Evidentno je da mutacije u genu *GJB6* mogu uzrokovati NSAROS ili same, ili zajedno sa mutacijama u genu *GJB2* prema digenskom načinu nasleđivanja (Pallares-Ruiz i sar, 2002; del Castillo I i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005).

#### 1.4.6. Genotip-fenotip asocijacije

Mutacije u lokusu *DFNB1* su identifikovane kod više od 50% pacijenata sa NSAROS, kod kojih je oštećenje sluha generalno neprogresivno, a težina oštećenje varira od umerenog do dubokog (Snoeckx i sar, 2005; Hoefsloot i sar, 2013). Pokazano je da pacijenti sa bi-alelskim mutacijama u genu *GJB2*, bilo u homozigotnom stanju ili kao složeni heterozigoti, imaju veći stepen oštećenja sluha (Liu i sar, 2005). Bi-alelske mutacije koje za posledicu imaju izostanak translacije ili dovode do translacije skraćenog proteina (engl. *truncating mutations*) su asociirane sa znatno težim stepenom oštećenja sluha u odnosu na bi-alelske mutacije koje dovode do translacije proteina (engl. *non-truncating mutations*) (Snoeckx i sar, 2005). U tzv. *truncating* mutacije spadaju mutacije bez smisla (engl. *nonsense*), kao i delecije i insercije koje dovode do pomeranja okvira čitanja i nemogućnosti ekspresije koneksina 26. Mutacije koje dovode do aminokiselinske supstitucije, odnosno mutacije promenjenog smisla (engl. „*missense*“) i delecije koje ne dovode do pomeranja okvira čitanja spadaju u tzv. *non-truncating* mutacije. Ove varijante za posledicu imaju sintezu koneksina koji ne može stvoriti funkcionalne koneksonske kanale, ili formira delimično funkcionalne kanale sa izmenjenom propustljivošću (Apps i sar, 2007). Shodno tome, najveći broj mutacija u genu *GJB2* su mutacije koje dovode do gubitka funkcije koneksina 26 i to na različitim nivoima stvaranja koneksiona, koneksonskih kanala i pukotinastih veza (Martinez i sar, 2009; Srinivas i sar, 2018).

Mutacija u jednom genu koneksina, može uticati na formiranje različitih tipova koneksonskih kanala (jer postoji veliki broj koneksina i različite mogućnosti njihovog kombinovanja u koneksonski kanal), pa samim tim postojanje jedne mutacije može biti asociirano i sa varijetom fenotipova (Martinez i sar, 2009; Srinivas i sar, 2018).

#### 1.4.7. Prednost heterozigotnih nosioca varijanti u *DFNB1* lokusu

Pretpostavlja se da je visoka učestalost oštećenja sluha vezanih za *DFNB1* lokus u nekim populacijama posledica delovanja prirodne selekcije i asortativnog ukrštanja. Na primer, za patogenu varijantu c.35delG se smatra da je njena učestalost visoka kao posledica efekta osnivača i da heterozigotni nosioci imaju određene prednosti, pa je tako ova promena evoluciono očuvana (Gasparini i sar, 2000; Vuckovic i sar, 2015). Prednosti nosioca c.35delG su povećano zadebljanje epidermisa koje ima ulogu u zaštiti od infekcija i gastrointestinalnih bakterijskih patogena (poput enteropatogena *Escherichia coli* i *Shigella flexneri*) (Man i sar, 2007; D'Adamo i sar, 2009; Simpson i sar, 2013; Vuckovic i sar, 2015). Slične prednosti u zaštiti od infekcija pokazane su i kod heterozigotnih nosioca c.427C>T (p.Arg143Trp) varijante gena *GJB2* (Man i sar, 2007).

## 1.5. Strategija genetičkog testiranja kod pacijenata sa klinički postavljenom dijagnozom NSAROS

S obzirom na već opisanu veliku genetičku heterogenost i etnički diverzitet, a u cilju boljeg razumevanja molekularne osnove NSAROS, za svaku populaciju je esencijalno da se odredi učestalost patogenih varijanti kod obolelih. Određivanje patogenih varijanti u ranom uzrastu je od veoma velikog značaja i zbog pravovremene i odgovarajuće medicinske intervencije u cilju poboljšanja veština komunikacije i lakšeg uključivanja pacijenta u normalne životne tokove.

Prema vodiču dobre prakse evropskog udruženja za kontrolu kvaliteta molekularno-genetičkih analiza (EMQN, engl. *European Molecular Genetics Quality Network*) genetičko testiranje za NSAROS je indicirano u sledećim slučajevima (Hoefsloot i sar, 2013):

- Kod osoba sa bilateralnim nesindromskim senzorineuralnim poremećajem sluha nepoznate etiologije - dijagnostičko testiranje. Za svakog pacijenta kod koga je indicirano genetičko testiranje potrebne su i informacije o porodičnoj anamnezi, porodičnom stablu, srodstvu, nacionalnosti, audiogrami ili ABR (engl. *Auditory Brain Response*) kod male dece, kao i rezultati skenera (CT) ili magnetne rezonance (MRI) (Hoefsloot i sar, 2013);
- Kod roditelja i rođaka ukoliko je identifikovana jedna ili dve mutacije u DFNB1 lokusu kod indeks pacijenta - skrining na nosioce;
- Kod partnera ukoliko je drugi indeks pacijent ili samo nosilac mutacije - skrining na nosioce. Pored toga, procenjuje se i rekurentni rizik, tj. verovatnoća da osoba bude nosilac i dobije obolelo potomstvo;
- U svakoj sledećoj trudnoći u visokorizičnim porodicama gde su oba partnera dokazani nosioci patogenih varijanti - prenatalna dijagnostika.

Pristupi i protokoli u molekularno-genetičkom testiranju lokusa DFNB1 lokusa su takođe preporučeni od strane EMQN vodiča dobre prakse (Hoefsloot i sar, 2013). Genetičke analize se sprovode po sledećem redosledu:

1. Skrining na najčešću mutaciju ili najčešću kombinaciju tačkastih mutacija. Ukoliko se ne identifikuje bialelska mutacija, preporučeno je dalji skrining gena u lokusu DFNB1;
2. Sekvenciranje kodirajućeg regiona gena *GJB2*;
3. Analiza „splajs“ mesta (5' i 3' krajeva introna 1) gena *GJB2* (najučestalija mutacija c.-23+1G>A);
4. Detekcija najčešćih delecija u genu *GJB6*: del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854).

Zbog niske kliničke senzitivnosti, ne preporučuje se primena MLPA tehnike (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) (komercijalni kit za oštećenje sluha P163-D1GJB-WFS1, *MRC Holland, Amsterdam, Netherlands*), kao ni sekvenciranje *GJB6* gena (Hoefsloot i sar, 2013). Naime, kit P163-D1GJB-WFS1 sadrži probe za nekoliko tačkastih mutacija u genu *GJB2* (c.35delG, c.-23+1>A, c.167delT, c.235delC i c.313\_326del) i probe za detekciju većih delecija gena *GJB6*, ali ne može pouzdano detektovati del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854) već se moraju potvrditi drugom metodom. Takođe, ovaj kit sadrži i probe za druge gene koji nisu vezani za lokus DFNB1, uključujući progresivne sindromske forme poremećaja sluha. Interpretacija rezultata dobijena ovom metodom je u većini slučajeva nejasna i postoji rizik od tzv. pretestiranja (engl. *overtesting*). Sekvenciranje gena *GJB6* takođe nije preporučeno, jer su tačkaste mutacije ovog gena češće asociirane sa sindromskim progresivnim oštećenjem sluha i kožnim oboljenjima nego sa NSOS.

Značaj genetičkog testiranja kod osoba obolelih od NSAROS je veliki. Rezultati genetičkog testiranja, na prvom mestu, mogu objasniti razlog i uzrok oštećenja sluha. Poznavanje etiologije oštećenja sluha omogućava pravovremeno planiranje medicinskog tretmana obolelih, a genetičko testiranje može pružiti specifične informacije o prognozi i kliničkom toku ovog oboljenja (Arnos, 2003). Genetička informacija može odrediti i medicinski tretman obolelih, da li su pacijentu potrebna određena slušna pomagala (poput slušnih aparata), ili su kandidati za ugradnju kohlearnih implanta.

Sa poznavanjem etiologije oštećenja sluha, utvrđivanjem genetičkih uzroka, u ranom životnom dobu se može planirati i edukacija obolelih. Pacijenti i članovi njihove porodice mogu da se pravovremeno upoznaju sa dostupnim obrazovnim ustanovama i programima podrške. Pošto se socijalne mogućnosti i mogućnosti zapošljavanja osoba sa oštećenjem sluha razlikuju, kako među zemljama tako i u okviru jedne zemlje, neke porodice sa ovakvom anamnezom se čak sele u područja koja im pružaju odgovarajuće socijalne i obrazovne mogućnosti (Arnos i sar, 1992). Veliki značaj genetičkog testiranja je i u određivanju statusa nosioca kod članova porodice obolelih, čija informacija omogućava davanje adekvatnog genetičkog saveta pri planiranju narednih trudnoća.

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su bili:

1. Validacija i verifikacija odgovarajućih molekularno genetičkih metoda za detekciju varijanti u genima *GJB2* i *GJB6*.
2. Određivanje učestalosti varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* kod obolelih od NSAROS u Srbiji.
3. Određivanje distribucije detektovanih varijanti i genotipova u genima *GJB2* i *GJB6* kod obolelih od NSAROS u Srbiji.
4. Ispitivanje fenotipske varijabilnosti detektovanih varijanti – asocijacija detektovanih genotipova sa stepenom oštećenja sluha.
5. Izbor pravilne strategije genetičkog testiranja (određivanje statusa nosioca i prenatalna dijagnostika) radi genetičkog savetovanja visoko rizičnih porodica.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Pacijenti

Studija je obuhvatala dve grupe ispitanika.

U periodu od aprila 2016. godine do januara 2019. godine na molekularno-genetička ispitivanja je upućeno 119 pacijenata sa dijagnozom nesindromskog autozomno-recesivnog oštećenja sluha, i ovi pacijenti su uključeni u prvu grupu ispitanika. Ispitanici su bili pacijenti Odseka za audiologiju i neurootologiju, Službe za otorinolaringologiju, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ (IMD). Na osnovu porodične anamneze, kliničkih analiza, otorinolaringoloških analiza i analiza audiograma, postavljena im je dijagnoza obostranog sensorineuralnog oštećenja sluha, koja odgovara NSAROS. Od 119 pacijenata, 56 je bilo ženskog pola, a 63 muškog pola sa prosečnom starošću od 10,45 godina (Tabela 3). Audiometrijski testovi su prvi put sprovedeni kod 103 obolela (pedijatrijski pacijenti) u trenutku postavljanja dijagnoze. Kod starijih pacijenata (ukupno 16) je već ranije postavljena dijagnoza NSAROS, ali je audiološkim ispitivanjima ponovo određen stepen oštećenja sluha u trenutku kada su poslani na genetičke analize. Najmlađi pacijent je imao tri meseca u trenutku postavljanja dijagnoze, dok je najstariji imao 68 godina kada je upućen na genetičke analize.

Druga grupa ispitanika je sačinjena od 160 zdravih osoba, koji su članovi porodice obolelih. Status nosioca urađen je kod ukupno 76 majki, 76 očeva, jednog rođenog brata i jedne rođene sestre, kao i kod tri bliska rođaka i njihovih partnera. Od ukupnog broja osoba članova porodice 79 je bilo ženskog pola, a 81 muškog pola, sa prosečnom starošću od 35,83 godine (Tabela 3). Parovima koji su planirali potomstvo data je precizna procena rizika za status nosioca i dobijanje obolelog deteta, u cilju donošenja adekvatne odluke za prenatalnu dijagnozu.

Tabela 3. Pol, broj i uzrast ispitivanih pacijenata obolelih od NSAROS i njihovih članova porodice

|  | Pol    | Broj pacijenata (N <sup>o</sup> ) | Uzrast (prosečna vrednost) izražen u godinama |
|--|--------|-----------------------------------|---|
| <b>Pacijenti</b>                         | Ženski | 56                                | 12,96   |
|  | Muški  | 63                                | 8,22  |
|  | Ukupno | <b>119</b>                        | <b>10,45</b>                                  |
| <b>Članovi porodice (status nosioca)</b> | Ženski | 79                                | 34,62   |
|  | Muški  | 81                                | 37,06   |
|  | Ukupno | 160                               | 35,83   |
| <b>Ukupno</b>                            |        | <b>279</b>                        | <b>24,89</b>                                  |

Molekularno genetičke analize su urađene na uzorcima DNK izolovane iz periferne krvi obolelih i njihovih članova porodice u Laboratoriji za medicinsku genetiku, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ i na Odeljenju molekularne genetike, funkcije i terapije, Instituta za neurologiju i genetiku Kipra, Nikozija, Kipar.

Prenatalna dijagnostika je urađena kod jedne visoko-rizične porodice, u kojoj je obolelo dete imalo identifikovan genotip, a oba roditelja su bili potvrđeni nosioci patogenih varijanti. Pre i nakon izvođenja genetičkih analiza, porodici je dat adekvatan genetički savet u službi Genetičkog savetovališta IMD-a.

Studija je odobrena od strane Medicinskog etičkog komiteta (broj 8/20, 29.06.2018. godine). Genetičko testiranje je sprovedeno kod svih ispitanika nakon dobijanja pisane saglasnosti za DNK analizu, potpisane od strane pacijenta/roditelja/staratelja.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi

Izolacija DNK iz uzoraka periferne krvi svih ispitanika je urađena u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMD. *GeneJET™ Genomic DNA Purification kit* (ThermoFisher Scientific Inc, SAD) dizajniran je za izolaciju DNK iz različitih uzoraka. Princip rada zasniva se na tehnologiji silikatnih membrana u formi okretajućih kolona. Standardna procedura praćena je izolacijom visoko prečišćene DNK. U zavisnosti od početnog materijala, vrši se digestija uzoraka sa proteinazom K u litičkom rastvoru, uz dodavanje RNA-ze A za uklanjanje RNK. Potom, lizat se meša sa etanolom i nanosi na kolonu za prečišćavanje, gde dolazi do vezivanja DNK za silikatnu membranu. Nečistoće se uklanjaju ispiranjem kolone sa pripremljenim puferima za ispiranje. Izdvajanje genomske DNK vrši se pomoću tzv. elucionog pufera.

Postupak izolacije iz periferne krvi je podrazumevao sledeće korake (po uputstvu proizvođača):

- Pomešati 200µl uzorka krvi sa 400µl litičkog rastvora i 20µl proteinaze K, snažno vorteksovati do postizanja uniformne suspenzije;
- Inkubirati uzorak na temperaturi od 56°C 10 minuta, uz povremeno vorteksovanje uzorka;
- Dodati 200µl 96% etanola i promešati pipetom ili vorteksovati;
- Prebaciti suspenziju u *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu, smeštenu u kolekcionu epruvetu;
- Centrifugirati 1 minut na 6 000rpm;
- Baciti kolekcionu tubu u kojoj se nalazi rastvor koji je prošao kroz membranu;
- *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu prebaciti u novu epruvetu od 2ml;
- Dodati 500µl *Wash buffer I* (pravi se svež: 125µl koncentrovanog *Wash buffer I* + 375 µl 96% etanola);
- Centrifugirati 1 minut na 8 000 rpm;
- Izbaciti tečnost koja je prošla kroz membranu i vratiti kolonu nazad na kolekcionu tubu;
- Dodati 500µl *Wash buffer II* (125 µl koncentrovanog *Wash buffer II* + 375 µl 96% etanola);
- Centrifugirati 3 minuta na 13 000 rpm;
- Baciti kolekcionu tubu sa rastvorom koji je prošao kroz membranu;
- Prebaciti *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu na novu sterilnu epruvetu od 1,5ml;
- Dodati 200 µl *elucionog pufera* na centar membrane, kako bi se izvršilo izdvajanje genomske DNK;
- Inkubirati 2 do 5 minuta na sobnoj temperaturi;
- Centrifugirati 1 minut na 8 000 rpm;
- Odbaciti kolonu, pravilno obeležiti uzorak;
- Izolovanu DNK koristiti odmah ili čuvati na +4°C ili -20°C.

### 3.2.2. Izolacija DNK iz uzorka horionskih resica

Izolacija fetalne DNK urađena je iz dobijenog uzorka biopsije horionskih resica, takođe upotrebom standardizovanog komercijalnog kita *GeneJET™ Genomic DNA Purification* kit (*ThermoFisher Scientific Inc, SAD*).

Postupak je bio sledeći (po uputstvu proizvođača):

- Iseckati tkivo u podlozi HAM (*F-10 Nutrient Mixture (HAM), Ixliquid W L Glutamine*) (*Gibco, ThermoFisher Scientific Inc, SAD*) i prebaciti u epruvetu od 1,5ml. Centrifugirati 5 min na 6 000 rpm i pipetom izvući supernatant;
- Dodati 180µl rastvora za digestiju i 20µl proteinaze K, snažno vorteksovati do postizanja uniformne suspenzije;
- Inkubirati uzorak na temperaturi od 56°C dok se ne lizira (1-2h), uz povremeno vorteksovanje uzorka;
- Dodati 20µl RNA-ze A, pa zatim vorteksovati;
- Ostaviti na sobnoj temperaturi 10 min;
- Dodati 200µl litičkog rastvora i vorteksovati 15 sec;
- Dodati 400 µl 50% etanola i ponovo vorteksovati;
- Prebaciti suspenziju u *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu, smeštenu u kolekcionu epruvetu.

Svi naredni koraci u izolaciji su isti kao i kod prethodno opisane metode izolacije DNK iz uzorka periferne krvi.

### 3.2.3. PCR-ARMS metoda

Direktna detekcija varijanti c.35delG i c.71G>A u genu *GJB2* urađena je primenom molekularno genetičkih metoda za simultano umnožavanje nasumičnih mutacija (engl. *Polymerase Chain Reaction Amplification Refractory Mutation System* - PCR-ARMS). Tehnika ARMS predstavlja modifikaciju klasične PCR metode, koja koristi prajmere (oligonukleotide) dizajnirane tako da se razlikuju na poziciji 3' terminalnog nukleotida - jedan prajmer je specifičan za neizmenjeni normalan, a drugi za mutirani alel, sa razlikom u jednom nukleotidu. U zavisnosti od toga da li uzorak DNK ima određenu mutaciju ili ne, doći će do amplifikacije, odnosno do njenog izostanka. Na taj način omogućena je detekcija tačkastih mutacija i manjih delecija u DNK molekulu (Bottema i sar, 1993).

Koncentracije sastojaka smeše i uslovi PCR reakcija su delimično modifikovani prema protokolu rada Laboratorije za medicinsku genetiku IMD. Modifikacija je omogućila dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata, radi postizanja jasno razdvojenih traka na gelu, bez nespecifičnih produkata.

Tehnika PCR-ARMS se zasniva na korišćenju jednog zajedničkog nizvodnog prajmera (engl. *Reverse Common- R-Com*) za obe reakcije, uzvodnog prajmera za detekciju normalnog alela (engl. *Forward Normal- F-Nor*) i uzvodnog prajmera za detekciju mutiranog alela (engl. *Forward Mutant- F-Mut*). Kao interna kontrola za obe reakcije, korišćen je kontrolni fragment amelogenin (dužina produkta 360 bp) (Grillo i sar, 2015) (Tabela 4).



Tabela 4. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida kontrolnih fragmenata amelogenina

| Oznaka prajmera | Sekvenca (5'-3')               | Dužina produkta (bp) |
|-----------------|--------------------------------|----------------------|
| <b>CTLA</b>     | CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG | 360                  |
| <b>CTLB</b>     | GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG |                      |

### 3.2.3.1. PCR-ARMS reakcija za direktnu detekciju varijante c.35delG u genu GJB2

Za direktnu detekciju mutacije c.35delG gena *GJB2* korišćena je delimično modifikovana PCR-ARMS metoda opisana ranije (Lucotte i sar, 2001; Scott i sar, 1998).

U dve odvojene PCR reakcije se vrši umnožavanje normalnog i mutiranog alela. Reakcione smeše ove dve reakcije, kao i PCR uslovi su identični. Jedina razlika je u primeni odgovarajućeg seta prajmera: Gdel35Nor za detekciju normalnog alela i Gdel35Mut za detekciju mutiranog alela. Zajednički nizvodni prajmer je Gdel35Com. Uzorak genomske DNK koncentracije 100ng je inicijalno denaturisan 5 min na 95°C i amplifikovan u 30 ciklusa (95°C 40 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec). Reakciona smeša (25µl) je sadržala sledeće komponente: 0,2 pmol/µl pojedinačnih prajmera (Tabela 5), 0,2mM dNTPs (*EurX*, Poljska), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (*Solis BioDyne*, Estonija), 5U Taq polimeraze (*Solis BioDyne*, Estonija), 10x koncentrovanog reakcionog pufera (Tris, NH<sub>4</sub>-sulfat, BSA) (*Solis BioDyne*, Estonija) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Reakcija je izvođena u aparatu 2720 Thermal cycler (*Applied Biosystems*, SAD).

Tabela 5. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju varijante c.35delG gena *GJB2*

| Oznaka prajmera      | Sekvenca (5'-3')                | Dužina produkta (bp) |
|----------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>Gdel35 Nor*</b>   | TTGGGGCACGCTGCAGACGAT CCTGGGGAG | 202                  |
| <b>Gdel35 Mut**</b>  | TTGGGGCACGCTGCAGACGAT CCTGGGGAT |                      |
| <b>Gdel35 Com***</b> | GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTT CTTGCA |                      |

\*Gdel35 Nor- uzvodni prajmer za neizmenjeni normalan alel

\*\*Gdel35 Mut- uzvodni prajmer mutirani alel

\*\*\*Gdel35 Com- zajednički nizvodni prajmer

### 3.2.3.2. PCR-ARMS reakcija za direktnu detekciju varijante c.71G>A u genu GJB2

Detekcija patogene varijante c.71G>A omogućena je primenom PCR-ARMS metode prema delimično modifikovanoj metodi Scotta i saradnika (1998).

Dve odvojene PCR reakcije za detekciju normalnog i mutiranog alela se razlikuju po setu korišćenih prajmera i broju PCR ciklusa amplifikacije (za normalan alel 32, a za mutiran alel 35 ciklusa). Uslovi za PCR reakcije amplifikacije 100ng genomske DNK su bili sledeći: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C i amplifikacija u 32/35 ciklusa (95°C 40 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec). Reakciona smeša (25µl) se sastojala od: 0,2pmol/µl pojedinačnih prajmera (Tabela 6), 0,2mM dNTPs (*EurX*, Poljska), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (*Solis BioDyne*, Estonija), 5U Taq polimeraze (*Solis BioDyne*, Estonija), 10x koncentrovanog reakcionog pufera (Tris, NH<sub>4</sub>-sulfat, BSA) (*Solis BioDyne*, Estonija) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Reakcija PCR je izvođena u aparatu 2720 Thermal cycler (*Applied Biosystems*, SAD).

Tabela 6. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju varijante c.71G>A gena *GJB2*

| Oznaka prajmera    | Sekvenca (5'-3')                | Dužina produkta (bp) |
|--------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>W24X Nor*</b>   | CAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCGG  | 169                  |
| <b>W24X Mut**</b>  | CAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCGA  |                      |
| <b>W24X Com***</b> | GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTT CTTGCA |                      |

\*W24X Nor- uzvodni prajmer za neizmenjeni normalan alel

\*\*W24X Mut- uzvodni prajmer mutirani alel

\*\*\*W24X Com- zajednički nizvodni prajmer

U PCR reakcionu smešu, nakon razlivanja u odgovarajuće PCR tubice, dodaju se uzorci DNK pacijenata, kontrolni uzorci i ddH<sub>2</sub>O (negativna kontrola - tzv. blank). Kontrolni uzorci su poznati DNK uzorci sa detektovanom varijantom c.35delG ili c.71G>A u homozigotnom i heterozigotnom stanju, kao i uzorak DNK bez detektovanih mutacija. Kontrole služe za proveru uspešnosti PCR reakcije, kao i za isključenje prisustva eventualne kontaminacije uzorka/smeše.

### 3.2.3.3. Priprema agaroznog gela i horizontalna elektroforeza

Produkti PCR-ARMS reakcije se razdvajaju na 2% agaroznom gelu, na horizontalnom sistemu za elektroforezu. Postupak je bio sledeći:

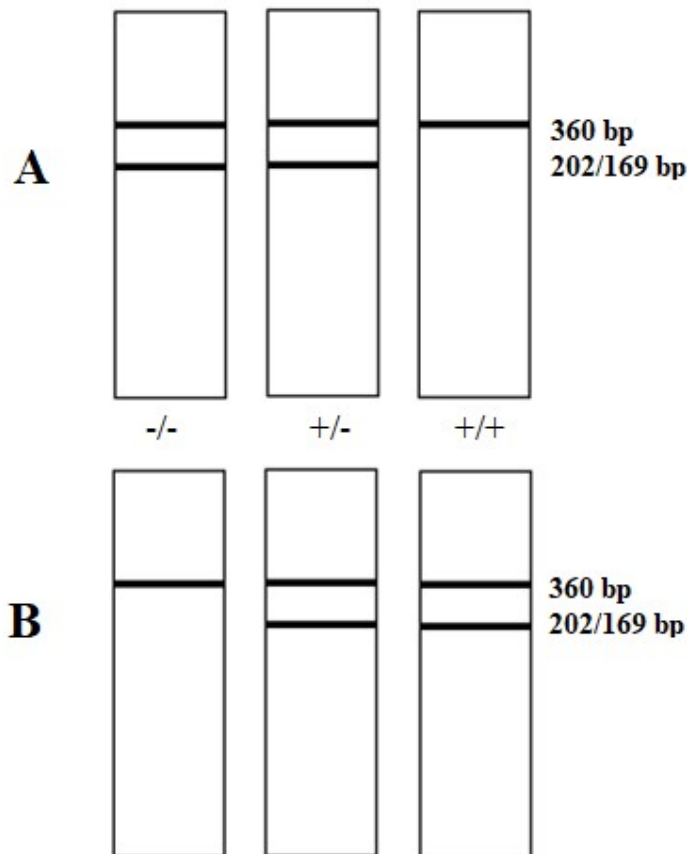
- 2% rastvor agaroze (w/v) u 1xTBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) zagrejan je do ključanja;
- U gel je dodat EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5µg/ml. Zagrejani gel je potom ohlađen do temperature od oko 60°C;
- Ohlađeni gel je naliven u kadicu za gel i ostavljen je da polimeriše;
- Dobijeni PCR produkti su pomešani sa bojom (2% Orange G (*Sigma-Aldrich*, SAD) (w/v), 87% glicerol (v/v), 50xTAE (engl. *Tris-acetate-EDTA*), ddH<sub>2</sub>O): 10µl produkta sa 5µl boje Orange G;
- U prvo i poslednje ležište na gelu je sipano 10ml DNK standarda za veličinu (DNK markeri: *GeneRuler 1kb DNA ladder* i  $\Phi$ X174 (*ThermoFisher Scientific Inc*, USA), *DNA-Hae III Digest DNA ladder* (*Fermentas*, Nemačka)) radi određivanja dužine produkata;
- Elektroforeza je vršena 45 min u 1xTBE puferu pri konstantnom naponu od 85V u sistemu za elektroforezu Wide Mini-sub Cell GT (*BioRad*, SAD);
- Gel je izlagan UV svetlu ( $\lambda=254$  nm) na transiluminatoru *ETX-F20.M transilluminator* (*Vilder Lourmat*, Francuska) i određivan je kvalitet i veličina PCR produkata.

### 3.2.3.4. Analiza PCR produkata

Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba sa heterozigotnom i homozigotnom varijantom c.35delG i c.71G>A, na sledeći način (Slika 13):

- Gornje trake predstavljaju umnožene kontrolne fragmente amelogenina (360 bp);
- Trake koje se nalaze na nižim pozicijama u odnosu na kontrolne fragmente amelogenina su umnoženi fragmenti poreklom od ispitivanih varijanti; c.35delG (202 bp) i c.71G>A (169 bp);
- oznake + i – se odnose na prisustvo, odnosno odsustvo ispitivane varijante;

- Pošto postoje dve reakcione smeše, za detekciju normalnog i mutiranog alela, moguće je odrediti prisustvo/odsustvo varijante na svakom alelu.



**Slika 13.** Šematski prikaz očekivanih PCR-ARMS produkata direktne detekcije varijante c.35delG (dužine 202 bp), odnosno c.71G>A (dužine 169 bp) sa internom kontrolom (amelogenin, 360 bp); A. PCR reakcija za detekciju normalnog alela, B. PCR reakcija za detekciju mutiranog alela; -/- predstavlja uzorak bez identifikovane ispitivane varijante; +/- predstavlja uzorak heterozigot za c.35delG ili c.71G>A; +/+ je uzorak homozigota za varijantu c.35delG ili c.71G>A.

### 3.2.4. PCR-RFLP metoda

Princip metoda reakcije lančanog umnožavanja za ispitivanje polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Polymerase Chain Reaction- Restriction Length Fragment Polymorphism* - PCR-RFLP) se zasniva na amplifikaciji željenog regiona DNK molekula, koji se potom tretira odgovarajućim restrikcionim enzimima (endonukleazama). U zavisnosti od toga da li je mutacija prisutna ili ne, restrikciono mesto za endonukleazu će postojati ili će biti odsutno. Kao rezultat sečenja enzimom, dobijaju se fragmenti DNK različite dužine (diferencijacija alela) koji se razdvajaju elektroforezom.

### 3.2.4.1. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju varijante c.101T>C u genu *GJB2*

Za direktnu detekciju varijante c.101T>C gena *GJB2* kod NSAROS pacijenata korišćena je delimično modifikovana PCR-RFLP metoda opisana ranije (Perea i sar, 2007; Al Achkar i sar, 2011). Modifikacija se zasnivala na promeni koncentracija pojedinih sastojaka PCR smeše, koja je omogućila dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata, kao i njihovu potpunu digestiju radi postizanja jasno razdvojenih traka na gelu, bez nespecifičnih produkata.

Uzorak genomske DNK koncentracije 60ng je inicijalno denaturisan 5 min na 94°C i amplifikovan u 40 ciklusa (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min), sa finalnom ekstenzijom od 5 min na 72°C. Reakciona smeša (25µl) je sadržala sledeće komponente: 0,2pmol/µl pojedinačnih prajmera (Tabela 7), 0,5mM dNTPs (*EurX*, Poljska), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (*Solis BioDyne*, Estonija), 5U Taq polimeraze (*Solis BioDyne*, Estonija), 10x koncentrovanog reakcionog pufera (Tris, NH<sub>4</sub>-sulfat, BSA) (*Solis BioDyne*, Estonija) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Reakcija PCR je izvođena u aparatu 2720 Thermal cycler (*Applied Biosystems*, SAD).

Tabela 7. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za umnožavanje regiona sa varijantom c.101T>C gena *GJB2*

| Oznaka prajmera | Sekvenca (5'-3')     | Dužina produkta (bp) |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| <b>M34T1</b>    | CCTTTGCAGCCACAACGAT  | 144                  |
| <b>M34T2</b>    | CAAACCGCCCAGAGTAGAAG |                      |

Kvalitet PCR produkata pre digestije se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa EtBr finalne koncentracije 0,5µg/ml koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti su analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru *ETX-F20.M transiluminator* (*Vilder Lourmat*, Francuska). Dužina dobijenih PCR produkata je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka). Uspešnost PCR reakcije i odsustvo kontaminacije potvrđeno je odsustvom produkata na gelu u kontrolnoj PCR tubici bez DNK uzorka (negativna kontrola-blank).

Dobijeni PCR produkti su digestovani restrikcijom enzimom BclI (izolovan iz *Bacillus caldolyticus*). Reakciona smeša za enzimsku digestiju je sadržala: 3µl pufera za digestiju (10mM Tris-HCl (pH 7.4 na 25°C), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA i 50% glicerol), 2µl 10U/µl enzima BclI (*Thermo Fisher Scientific*, USA), 15µl PCR produkta i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Smeša se inkubira na 55°C 16 h.

#### Analiza produkata enzimske digestije:

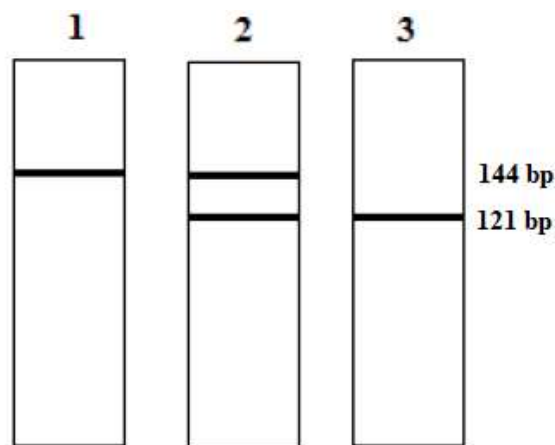
- Detekcija produkata enzimske digestije je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr u čija ležišta je nanošeno 15µl produkta sa 5µl boje *Orange G* (*Sigma-Aldrich*, SAD);
- U poslednje ležište na gelu je sipano 10µl DNK standarda za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka) radi određivanja dužine produkata;
- Razdvajanje produkata digestije je vršeno na horizontalnoj elektroforezi, 1,5h pri konstantnom naponu od 85V. Vizuelizacija produkata je urađena na UV transiluminatoru *ETX-F20.M transiluminator* (*Vilder Lourmat*, Francuska).

Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba sa detektovanom varijantom c.101T>C. U ovom slučaju, ukoliko je varijanta c.101T>C prisutna ne postoji mesto sečenja korišćenog restrikcijom enzima, što se tumači na sledeći način (Slika 14):

Slučaj 1: nakon digestije sa restrikcionim enzimom BclI, produkt će ostati nedigestovan (144 bp) što odgovara homozigotnom obliku detektovane c.101T>C varijante;

Slučaj 2: nakon digestije sa restrikcionim enzimom BclI, jedan produkt će ostati nedigestovan (144 bp) a drugi će biti isečen na dva fragmenta od 121 bp i 23 bp. Fragment od 23 bp migrira sa gela ostavljajući veći digestovani fragment (121 bp), što odgovara heterozigotnom obliku c.101T>C varijante;

Slučaj 3: nakon digestije PCR produkti će biti isečeni na dva fragmenta od 121 bp i 23 bp. Fragment od 23 bp migrira sa gela ostavljajući veći digestovani fragment (121 bp), što odgovara odsustvu c.101T>C varijante na oba alela (engl. *wild type*).



**Slika 14.** Šematski prikaz očekivanih PCR produkata nakon digestije BclI enzimom; 1 - uzorak homozigot za c.101T>C; 2 - uzorak heterozigot za c.101T>C; 3 - uzorak bez detektovane varijante

#### 3.2.4.2. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju *splajs* mutacije c.-23+1G>A egzona 1 gena *GJB2*

Za direktnu detekciju *splajs* mutacije c.-23+1G>A egzona 1 gena *GJB2* korišćena je PCR-RFLP metoda opisana ranije (Neocleous i sar, 2014). PCR reakcijom se vrši umnožavanje egzona 1 gena *GJB2*. Uzorak genomske DNK koncentracije 100ng je inicijalno denaturisan 5 min na 95°C i amplifikovan u 35 ciklusa (95°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec), sa finalnom ekstenzijom od 10 min na 72°C. Reakciona smeša (20µl) je sadržala sledeće komponente: 10x PCR puffer (*QIAGEN*), Q solution (*QIAGEN*), 0,2mM dNTPs (*SIGMA*), 5pmol/µl koncentracije pojedinačnih prajmera (Tabela 8), 5U Taq polimeraze (*QIAGEN*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše.

Tabela 8. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za umnožavanje egzona 1 gena *GJB2*

| Oznaka prajmera | Sekvenca (5'-3')     | Dužina produkta (bp) |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| Cx26 Ex1F       | GGGGCTCAAAGGAAGTAGGA | 499                  |
| Cx26 Ex1R       | AAGGACGTGTGTTGGTCCAG |                      |

Kvalitet PCR produkata pre digestije je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa EtBr finalne koncentracije 0,5µg/ml koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti su analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru. Dužina dobijenih PCR produkata je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka).

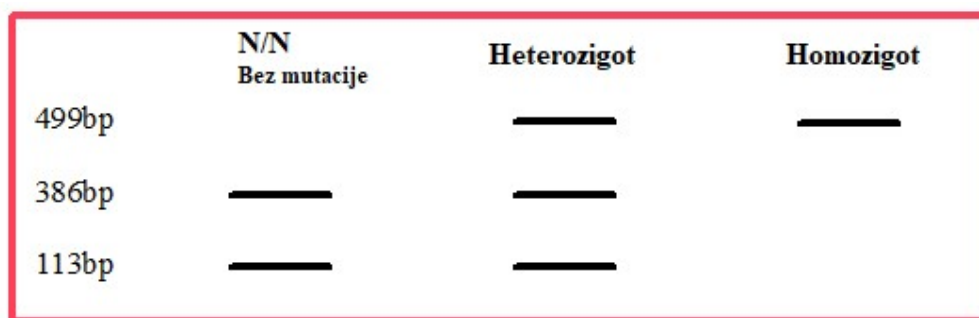
Uspešnost PCR reakcije i odsustvo kontaminacije potvrđeno je odsustvom produkata na gelu u kontrolnoj PCR tubici bez DNK uzorka (negativna kontrola-blank).

Umnoženi egzon 1 se tretira digestijom restrikcijom enzimom HphI (izolovan iz *E.coli* koja nosi klonirani gen *hphIR* iz *Haemophilus parahaemolyticus*). Reakciona smeša je sadržala: 2μl pufera za digestiju (10 mM Tris-HCl (pH7.4 na 25°C), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA i 50% glicerol), 0,5μl 10U/μl enzima HphI (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 3μl PCR produkta i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Inkubacija enzima se vrši na 37°C u trajanju od 3 h.

Analiza produkata enzimske digestije:

- Detekcija produkata enzimske digestije je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr u čija ležišta je nanošeno 15μl produkta sa 5μl boje *Orange G* (*Sigma-Aldrich*, SAD);
- U poslednje ležište na gelu je sipano 10μl DNK standarda za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka) radi određivanja dužine produkata;
- Produkti digestije su se razdvajali na horizontalnoj elektroforezi, 20 min pri konstantnom naponu od 85V. Vizuelizacija produkata je urađena na UV transiluminatoru.

Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba heterozigotnih nosioca mutacije c.-23+1G>A. Ukoliko uzorak koji nije nosilac navedene varijante (N/N) njegov PCR produkt trebalo bi da ima dve trake dužine 386 bp i 113 bp (postoji mesto sečenja enzimom). PCR produkt heterozigotnog uzorka bi trebalo da ima tri trake dužine 499 bp, 386 bp i 113 bp. Ukoliko je prisutna varijanta c.-23+1G>A u homozigotnom obliku, ne postoji mesto sečenja korišćenim restrikcijom enzimom pa se detektuje jedan nedigestovani produkt dužine 499 bp (Slika 15).



**Slika 15.** Šematski prikaz produkata PCR-RFLP reakcije nakon digestije HphI restrikcijom enzimom za direktnu detekciju mutacije c.-23+1G>A egzona 1 gena *GJB2*

### 3.2.4.3. PCR-RFLP metoda za direktnu detekciju mitohondrijske varijante m.1555A>G gena *MTRNR1*

Za direktnu detekciju mitohondrijske varijante gena *MTRNR1* m.1555A>G (stari naziv A>G1555) korišćena je PCR-RFLP metoda opisana ranije (Neocleous i sar, 2014). PCR reakcijom se vrši umnožavanje gena *MTRNR1*. Uzorak izolovane DNK koncentracije 100ng je inicijalno denaturisan 5 min na 95°C i amplifikovan u 35 ciklusa (95°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec), sa finalnom ekstenzijom od 10 min na 72°C. Reakciona smeša (20μl) je sadržala sledeće komponente: 10xPCR puffer (*QIAGEN*), Q solution (*QIAGEN*), 0,2mM dNTPs (*SIGMA*), 5pmol/μl koncentracije

pojedinačnih prajmera (Tabela 9), 5U Taq polimeraze (*QIAGEN*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše.

Tabela 9. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za umnožavanje gena *MTRNR1*

| Oznaka prajmera          | Sekvenca (5'-3')   | Dužina produkta (bp) |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| <i>MTRNR1A&gt;G1555F</i> | AGACGTTAGGTCAAGGTG | 460+360              |
| <i>MTRNR1A&gt;G1555R</i> | GTTTAGCTCAGAGCGGTC |                      |

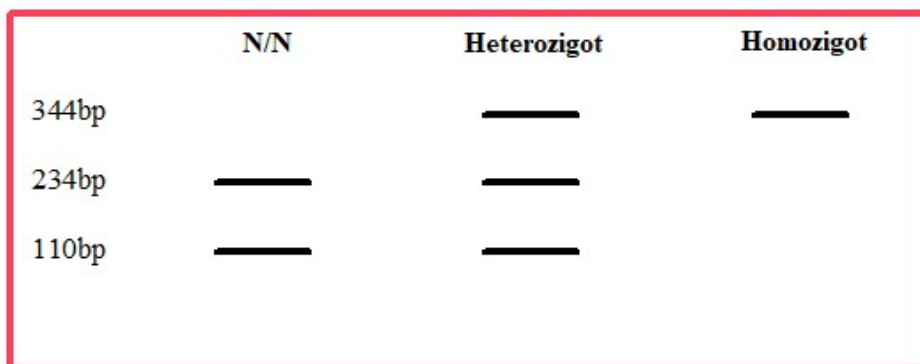
Kvalitet PCR produkata pre digestije je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa EtBr finalne koncentracije 0,5µg/ml koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti su analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru. Dužina dobijenih PCR produkata je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka). Uspešnost PCR reakcije i odsustvo kontaminacije potvrđeno je odsustvom produkata na gelu u kontrolnoj PCR tubici bez DNK uzorka (negativna kontrola-blank).

Umnoženi gen *MTRNR1* se tretira digestijom restrikcionim enzimom BsmAI (izolovan iz *Acinetobacter lwoffii* RFL26). Reakciona smeša je sadržala: 2µl pufera za digestiju (10mM Tris-HCl (pH 7.4 na 25°C), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA i 50% glicerol), 0,75µl 10U/µl enzima BsmAI (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 3µl PCR produkta i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Inkubacija enzima se vrši na 55°C 3 h.

Analiza produkata enzimske digestije:

- Detekcija produkata enzimske digestije je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr u čija ležišta je nanošeno 15µl produkta sa 5µl boje *Orange G* (*Sigma-Aldrich*, SAD);
- U poslednje ležište na gelu je sipano 10µl DNK standarda za veličinu (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*) (*Fermentas*, Nemačka) radi određivanja dužine produkata;
- Produkti digestije su se razdvajali na horizontalnoj elektroforezi, 20 min pri konstantnom naponu od 85 V. Vizuelizacija produkata je urađena na UV transiluminatoru.

Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba sa heteroplazmijom ("heterozigotnih nosilaca") mitohondrijske varijante m.1555A>G na sledeći način: PCR produkt uzorka koji nije nosilac navedene varijante (N/N) trebalo bi da ima dve trake dužine 234 bp i 110 bp (postoji mesto sečenja enzimom); PCR produkt heterozigotnog uzorka bi trebalo da ima tri trake dužine 344 bp, 234 bp i 110 bp; PCR produkt uzorka koji nosi varijantu na oba alela trebalo bi da ima samo jedan, nedigestovani produkt dužine 344 bp (Slika 16).



**Slika 16.** Šematski prikaz produkata PCR-RFLP reakcije nakon digestije BsmAI restrikcionim enzimom za direktnu detekciju mitohondrijske varijante gena *MTRNR1* m.1555A>G

### 3.2.5. Multipleks PCR metoda

Metoda multipleks PCR-a se zasniva na istovremenoj amplifikaciji više različitih sekvenci DNK u jednoj reakciji. Ova simultana amplifikacija različitih regiona DNK molekula je omogućena korišćenjem višestrukih setova prajmera u jednoj PCR reakciji, koji su specifični za različite DNK sekvence.

#### 3.2.5.1. Multipleks PCR reakcija za detekciju delecije del(GJB6-D13S1830) u genu *GJB6*

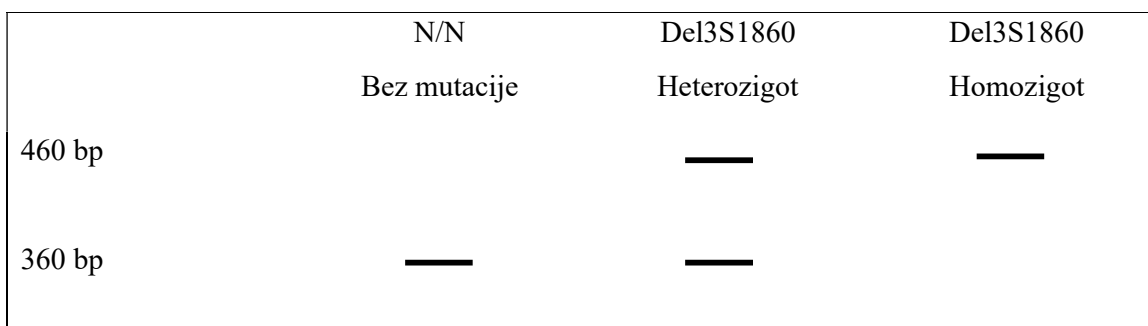
Detekcija veće parcijalne delecije veličine 309 kb gena *GJB6* je omogućena primenom multipleks PCR reakcije opisane ranije (Wu i sar, 2003). Genomska DNK koncentracije 100ng umnožavana je u 20µl reakcione smeše koja je sadržala: 10x PCR puffer (*QIAGEN*), Q solution (*QIAGEN*), 0,2mM dNTPs (*SIGMA*), 10pmol/µl koncentracije pojedinačnih prajmera (Tabela 10), 5U Taq polimeraze (*QIAGEN*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Uslovi PCR reakcije su bili sledeći: inicijalna denaturacija uzorka (95°C 5 min); 35 ciklusa (95°C 45 sec; 60°C 45 sec; 72°C 45 sec); finalna ekstenzija (72°C 10 min). Korišćeni prajmeri prikazani u Tabeli 10. su kreirani tako da prvi par prajmera (GJB6-1R i BKR-1) umnožavaju internu kontrolu gena *GJB6*, dok drugi par prajmera (STS-CX636 F i STS-CX636 R) umnožava fragment ukoliko je prisutna delecija. Na ovaj način je moguće odrediti i homozigote i heterozigotne nosioce, zato što kod homozigotne delecije dolazi i do delecije kontrolnih fragmenata.

Tabela 10. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju delecije del(GJB6-D13S1830) gena *GJB6*

| Oznaka prajmera    | Sekvenca (5'-3')          | Dužina produkta (bp) |
|--------------------|---------------------------|----------------------|
| <b>GJB6-1R (R)</b> | TTTAGGGGCATGATTGGGGTGATTT | 360                  |
| <b>BKR-1 (F)</b>   | CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT |                      |
| <b>STS-CX636 F</b> | TGCCCACCCCCCAAGTAGAG      | 460                  |
| <b>STS-CX636 R</b> | TTTCGGTTTCATTCATTTCCCTATT |                      |

Detekcija PCR produkata je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr (horizontalna elektroforeza, 85 V, 1 h) na koji je nanošeno 5µl boje (*Orange G, Sigma-Aldrich, SAD*) i 10µl produkta. Vizuelizacija je urađena na UV transiluminatoru. Ukoliko je delecija bila prisutna, dobijen je PCR produkt dužine 460 bp. Uspešnost reakcije potvrđena je prisustvom produkta dužine 360 bp, koji je bio interna kontrola ovog gena (Slika 17). U prisustvu homozigotne delecije dolazi do delecije i fragmenta interne kontrole. Rezultati su upoređivani sa kontrolama koje su predstavljale kako osobe bez delecije tako i osobe sa već dijagnostikovanom heterozigotnom parcijalnom delecijom ispitivanog gena *GJB6*. Takođe, uspešnost PCR reakcije i odsustvo kontaminacije potvrđeno je odsustvom produkata na gelu u kontrolnoj PCR tubici bez DNK uzorka (negativna kontrola-blank).





**Slika 17.** Šematski prikaz produkata multipleks PCR reakcije za detekciju del(GJB6-D13S1860)

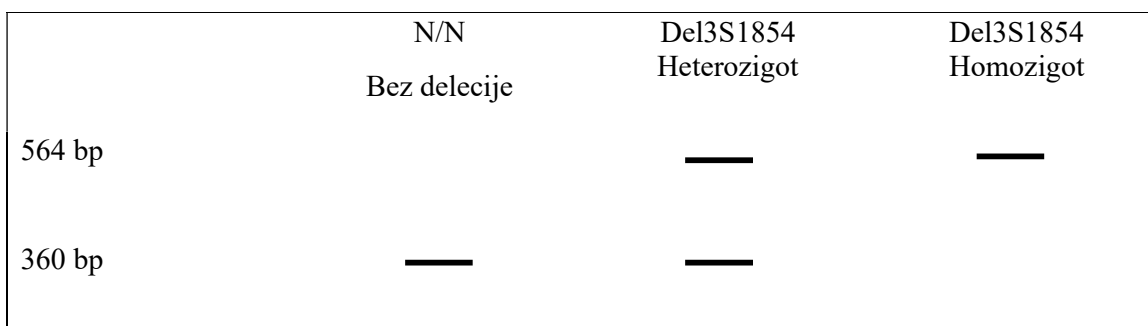
### 3.2.5.2. Multipleks PCR reakcija za detekciju delecije del(GJB6-D13S1854) u genu *GJB6*

Identifikacija druge parcijalne delecije u genu *GJB6* veličine 232 kb se zasniva na principu multipleks PCR reakcije, prema delimično modifikovanim uslovima originalne metode (del Castillo FJ i sar, 2005). Naziv, sekvence i dužina produkata korišćenih PCR prajmera su prikazani u Tabeli 11. Reakciona smeša (20µl) se sastojala od izolovane DNK koncentracije 100ng i sledećih komponenti: 10xPCR puffer (*QIAGEN*), Q solution (*QIAGEN*), 0,2mM dNTPs (*SIGMA*), 10pmol/µl koncentracije pojedinačnih prajmera (Tabela 11), 5U Taq polimeraze (*QIAGEN*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Uslovi PCR reakcije: inicijalna denaturacija uzorka (95°C 5 min); 5 ciklusa (94°C 40 sec; 65-72°C 45 sec); 25 ciklusa (94°C 40 sec; 60°C 40 sec; 72°C 40 sec); finalna ekstenzija (72°C 7 min).

Tabela 11. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju delecije del(GJB6-D13S1854) gena *GJB6*

| Oznaka prajmera   | Sekvenca (5'-3')          | Dužina produkta (bp) |
|-------------------|---------------------------|----------------------|
| <b>GJB6-1R</b>    | TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT  | 360                  |
| <b>BKR-1</b>      | CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT |                      |
| <b>D13S1854 F</b> | CTCCATCCTGGGTGACAGAGTGAG  | 564                  |
| <b>D13S1854 R</b> | AGGAAGAGCTGGGGTTGCTAAGAA  |                      |

Svaka reakcija, pored uzoraka DNK koji su ispitivani, sadržala je i uzorke pozitivne kontrole (heterozigotni nosilac delecije), negativne kontrole (uzorak bez delecije) i blank (uzorak bez dodate DNK). Od svakog uzorka ukupno 10µl PCR produkata je mešano sa 5µl Orange G boje. Razdvajanje i vizuelizacija PCR produkata je vršena na horizontalnoj elektroforezi na 2% agaroznom gelu, a potom na UV transiluminatoru. Na Slici 18 je predstavljen šematski prikaz produkata nakon PCR reakcije i horizontalne elektroforeze.



**Slika 18.** Šematski prikaz produkata multipleks PCR reakcije za detekciju del(GJB6-D13S1854)

### 3.2.6. Detekcija varijanti primenom metode sekvenciranja egzona 2 gena *GJB2*

Poslednji korak u analizi je bila tehnika sekvenciranja egzona 2 u genu *GJB2*. Za dobijanje i amplifikaciju DNK fragmenata koji u sebi sadrže čitavu kodirajuću sekvencu gena *GJB2*, a zatim i metoda sekvenciranja dobijenih PCR produkata korišćene su metode opisane ranije (Neocleous i sar, 2006).

#### 3.2.6.1. PCR umnožavanje egzona 2 gena *GJB2*

Najpre je reakcijom PCR umnožen kodirajući egzon 2 gena *GJB2*. Korišćeni prajmeri (*GJB2* F i *GJB2* R), njihove sekvence, kao i veličina produkata PCR prikazani su u Tabeli 12. Isti prajmeri su korišćeni i u postupku sekvenciranja, zajedno sa još dva dodatna uzvodna i nizvodna unutrašnja prajmera, čije su sekvence takođe prikazane u Tabeli 12. PCR smeša u ukupnoj zapremini od 25µl je sadržala: 10×PCR pufer (*QIAGEN*), Q solution (*QIAGEN*), 0,2 mM *dNTPs* (*SIGMA*), 5pmol uzvodni i 5pmol nizvodni prajmer, 0,5U *Taq* DNK polimeraze (*QIAGEN*), 100-200 ng DNK matrice i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. PCR je izvođen prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C; 35 ciklusa (45 sec na 95°C, 45 sec na 61°C, 45 sec na 72°C); finalna ekstenzija 10 min na 72°C (Neocleous i sar, 2006).

Tabela 12. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za umnožavanje i sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2*

| Oznaka prajmera       | Sekvenca (5'-3')       | Dužina produkta (bp) |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
| <b><i>GJB2</i> F</b>  | GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG | 814                  |
| <b><i>GJB2</i> R</b>  | AGCAGAGCTCCATTGTTGCATC |                      |
| <b><i>GJB2</i> RI</b> | CTCCCCCTTGATGAACTTCC   | /                    |
| <b><i>GJB2</i> FI</b> | CTGCAGCTGATCTTCGTGTCC  |                      |

Kvalitet PCR produkata pre sekvenciranja se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa EtBr, koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti, 5µl, su mešani sa 5µl Orange G boje, a zatim analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru. Dužina dobijenih PCR produkata (814 bp) je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (*ΦX174 RF DNA/Hae III*).

Produkti umnožavanja su čuvani na +4°C. U daljem postupku, PCR produkti prečišćavani su upotrebom enzima ExoSAP-IT® (*Affymetrix UK Ltd. USB®*) na sledeći način: smeša 2µl PCR produkta i 1,2µl enzima su inkubirani na 37°C 15 min, kako bi se degradovali preostali prajmeri i dinukleotidi koji se nisu vezali; zatim sledi inkubacija na 80°C u trajanju od 15 min kojom se postiže inaktivacija ExoSAP-IT enzima. Ovako dobijeni prečišćeni produkti se čuvaju u mraku na -20°C i spremni su za sekvenciranje.

### 3.2.6.2. Sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2*

Sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2* izvršeno je upotrebom modifikovane PCR metode terminacije sinteze (engl. *termal cycling sequencing method*) (Neocleous i sar, 2006). Smeše su pripremane u ukupnoj zapremini od 20µl i sadržale su: 3µl prečišćenog PCR produkta, 1µM odgovarajućih prajmera, 3µl *BigDye Terminator v1.1/v3.1 sequencing buffer* (*Applied Biosystems, SAD*) i 2µl *BigDye Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit-a* (*Applied Biosystems, SAD*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Reakcija sekvenciranja izvođena je prema sledećem protokolu: 1 min na 96°C; 25 ciklusa (10 sec na 96°C, 5 sec na 50°C, 4 min na 60°C). Produkti amplifikacije su čuvani na -20°C do prečišćavanja i dalje analize.

### 3.2.6.3. Prečišćavanje reakcije sekvenciranja i analiza na automatskom DNK sekvencatoru

Prečišćavanje reakcije sekvenciranja je sprovedeno na dva načina:

*I Prečišćavanje kolonicama (kertridž-om):*

- Centrifugirati gel filtrirajući kertridž (*Performa Gel filtration Cartridge, EdgeBio Systems, Španija*) 2 min na 850 x g;
- Prebaciti kertridž na mikrotitarsku ploču sa 96 ležišta i dodati PCR produkte u svako ležište;
- Centrifugirati 2 min na 850 x g.

Ovako pripremljenu mikrotitarsku ploču sa 96 ležišta staviti u mašinu za sekvenciranje (*3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD*)

*II Prečišćavanje precipitacijom:*

- U svaku reakciju sekvenciranja dodavano je 20µl ddH<sub>2</sub>O, 4,2µl Na-Acetata i 100µl 99% ohlađenog etanola;
- Smeša je inkubirana 15 min u mraku na sobnoj temperaturi i nakon toga centrifugirana 15 min na 13 000 rpm na sobnoj temperaturi. Odliti supernatant;
- U talog dodati 140µl 70% ohlađenog etanola;
- Centrifugirati 15 min na 13 000 rpm na sobnoj temperaturi. Odliti supernatant;
- Sušiti talog 2 min na 90°C;
- U talog dodati 15µl HiDi Formamida (*Applied Biosystems, SAD*);
- Denaturisati uzorke 2 min na 95°C, ohladiti 2 min na +4°C, prebaciti na mikrotitarsku ploču sa 96 ležišta i staviti u mašinu za sekvenciranje (*3130xl ili 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD*).

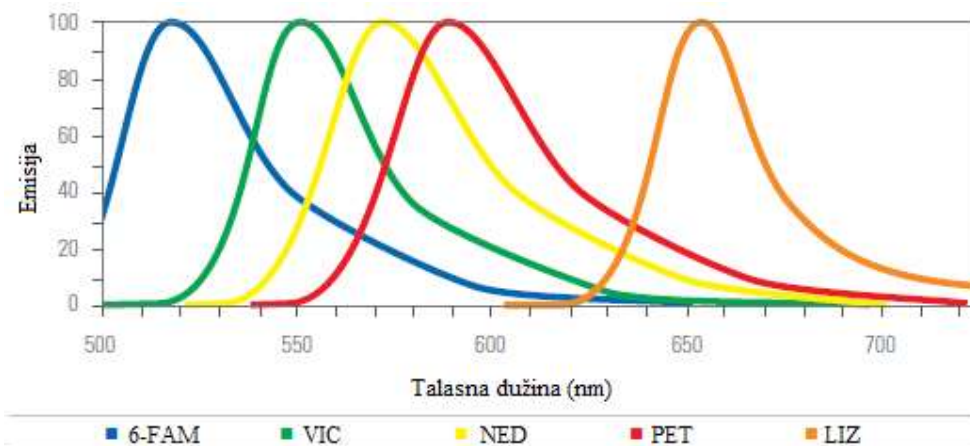
Sekvence su očitavane automatski, uz korišćenje *Seqscape Software-a v2.7* (*Applied Biosystems, SAD*), *Chromas v.1.0* programa i *Multalin* programa (Corpet 1988). Varijacije u sekvenci su potvrđene sekvenciranjem u oba smera (2 reakcije), i korišćenjem dodatnih unutrašnjih prajmera u oba smera (nove 2 reakcije).

### 3.2.7. Fluorescentna multipleks STR-PCR analiza za određivanje eventualnog prisustva maternalne kontaminacije prilikom prenatalne dijagnostike

Za identifikaciju eventualnog prisustva maternalne kontaminacije u fetalnom uzorku tokom prenatalne dijagnostike korišćena je fluorescentna multipleks PCR analiza kratkih tandemskih ponovaka (engl. *Short Tandem Repeats, STR*). Za istovremeno umnožavanje 15 STR i amelogenin lokusa korišćen je komercijalni kit *AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit* (*Applied Biosystems, SAD*). Ovaj komercijalni kit, kao i sama metoda, inicijalno se koristi u forenzičkim ispitivanjima DNK profila i u analizi genetičkih markera prilikom praćenja himerizama nakon transplantacije, kod obolelih od hematoloških bolesti prema uputstvu proizvođača (Tabela 13, Slika 19).

Tabela 13. Nazivi lokusa i fluorescentne boje kojima su obeleženi analizirani STR lokusi (*AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit*)

| STR lokus                                       | Fluorescentna boja |
|---|--------------------|
| <b>D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO</b>          | 6-FAM (plava)      |
| <b>D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338</b> | VIC (zelena)       |
| <b>D19S433, vWA, TPOX, D18S51</b>               | NED (žuta)         |
| <b>Amelogenin, D5S818, FGA</b>                  | PET (crvena)       |
| <b>GeneScan-500 Standard</b>                    | LIZ (narandžasta)  |



Slika 19. Talasne dužine fluorescentnih boja kojim su obeleženi analizirani STR lokusi (*AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit*)

Komercijalni *AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit* sadrži sledeće reagense: *AmpFLSTR Identifiler Plus* reakcioni miks, *AmpFLSTR Identifiler Plus* prajmer miks, kontrolni DNK uzorak (9947A DNK koncentracije 10ng/μl) i standard (*GeneScan-500 Standard*). PCR reakcijom se vrši umnožavanje STR lokusa. Uzorak genomske DNK koncentracije 1ng/μl je inicijalno denaturisan 11 min na 94°C i amplifikovan u 28 ciklusa (94°C 60 sec, 59°C 60 sec, 72°C 60 sec), sa finalnom ekstenzijom od 1 h na 60°C. Reakciona smeša (25μl) je sadržala sledeće komponente: smeša prajmera (*AmpFLSTR Identifiler Plus Primer Set*) (*Applied Biosystems, SAD*), reakcionu smešu (*AmpFLSTR Identifiler Plus Master Mix*) (*Applied Biosystems, SAD*) i ddH<sub>2</sub>O do ukupne zapremine smeše. Reakcija PCR je izvođena u aparatu 2720 Thermal cycler (*Applied Biosystems, SAD*).

U svakoj reakciji se za pozitivnu kontrolu koristi komercijalno dobijeni kontrolni uzorak DNK (9947A DNK), dok se za negativnu kontrolu dodaje voda bez nukleaza u PCR smešu umesto uzorka DNK. Dobijeni PCR produkti se čuvaju u mraku na -20°C.

### 3.2.7.1. Detekcija dobijenih PCR produkata na kapilarnoj elektroforezi

Svaka od fluorescentnih boja emituje svoj maksimum fluorescencije na različitim talasnim dužinama, što omogućava njihovu detekciju pomoću kapilarne elektroforeze (*3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD*) i analizu dobijenih podataka, koja podrazumeva određivanje veličine fragmenata, visine i površine ispod pika, pomoću *GeneMapper* programa (*Applied Biosystems, SAD*).

Priprema uzoraka za detekciju se vrši na sledeći način:

- Rastvor A se pravi tako što se pomeša 0,5µl *GeneScan-500* standarda i 9,5µl Hi-Di formamida (*Applied Biosystems, SAD*); smeša se vorteksuje 15 sec;
- Zatim se pomeša 10µl rastvora A i 1µl smeše standarda za veličinu alela (engl. *allelic ladder mix*) (*Applied Biosystems, SAD*);
- Smeše se potom denaturišu 3 min na 95°C i odmah prebace na led;
- Smeša se razliva na mikrotitarsku ploču sa 96 ležišta koja se stavlja u aparat kapilarne elektroforeze (*3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD*).

### 3.2.7.2. Procena eventualnog prisustva maternalne kontaminacije u fetalnom uzorku

Odnos količine DNK fetusa i majke u jednom uzorku moguće je kvantitativno proceniti STR-PCR analizom. Količina DNK u uzorku odgovara visini ili površini ispod pika informativnih alela. Za eventualno prisustvo maternalne kontaminacije, količina DNK je procenjivana na osnovu površine ispod pika.

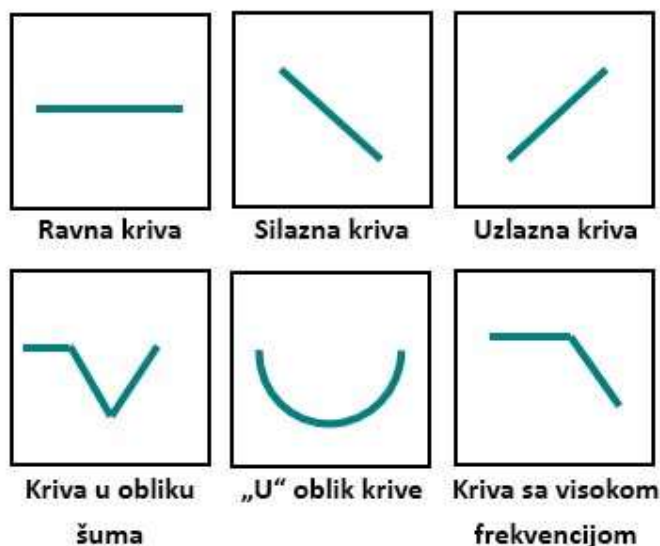
Specifične formule za računanje su formirane u zavisnosti od toga da li je fetalni uzorak ili uzorak majke homozigot ili heterozigot za informativni alel. S obzirom da je DNK majke u fetalnom uzorku manje prisutna, računa se procenat DNK fetusa, dok se procenat DNK majke računa oduzimanjem od 100% (Clayton i Buckelton, 2005).

### 3.2.8. Audiometrijske analize

Dijagnostika, odnosno procena oštećenja sluha se vrši audiološkim analizama koje imaju ulogu određivanja tipa i stepena oštećenja sluha.

Postoji nekoliko klasifikacija kojima se određuje stepen oštećenja sluha. Osnovne frekvencije za razumevanje govora su u regionu od 500 do 4 000 Hz. Danas se za određivanje slušne senzitivnosti unutar regiona „govornih frekvencija“ najčešće koristi prosečan pad sluha u decibelima (dB) na ključnim govornim frekvencijama na boljem uvu - 500 Hz, 1 000 Hz i 2 000 Hz (Davies, 2003). Za odrasle, klinički normalan dijapazon na audiogramu je od 0 do 20 dB praga sluga. Normalan region za decu je limitiraniji zato što i veoma blago oštećenje sluha može imati efekat na razvoj sluha i govora. Pedijatrijski prag sluha koji premašuje 15 dB se klasifikuje kao abnormalan. Težina oštećenja sluha se klasifikuje na osnovu slušnog praga izraženim u dB (Tabela 1) (Hoefsloot i sar, 2013). Pragovi u regionu od 20 dB do 40 dB praga sluha se klasifikuju kao umereno oštećenje sluha, 41 dB do 55 dB praga sluha definišu srednje oštećenje sluha; nivoi praga od 56 dB do 70 dB smatraju se srednje teškim oštećenjem sluha; pragovi u nivou od 71 dB do 95 dB kao teško oštećenje sluha, a svi pragovi preko 95 dB su asocirani sa dubokim oštećenjem sluha (Tabela 1). Kao referentan koristi se podatak da je nivo intenziteta govora šapatom uz uvo manji od 25 dB, konverzijski govor u regionu od 40 dB do 50 dB i glasan govor - vika na stopu od uva na nivou oko 80 dB (Gacek i sar, 2003; Hinchcliffe, 2003; Robert, 2003).

Kriva praga audiograma se klasifikuje u više različitih audioprofila (profil audiometrije čistog tona): ravna kriva, silazna kriva (nizvodna kriva), uzlazna kriva (uzvodna kriva), kriva u obliku šuma (engl. *noise-notch*), „U“ oblik krive i kriva sa visokom frekvencijom (Slika 20).



**Slika 20.** Krive praga audiograma; različiti tipovi audioprofila (preuzeto sa: <https://www.theartofhearing.co.uk/post/degree-type-and-configuration-of-hearing-difficulty>, modifikovano)

Moguća je i dalja klasifikacija oštećenja sluha audiometrijskim analizama na obostrano-simetrično, obostrano-asimetrično ili jednostrano i na stabilno ili progresivno oštećenja sluha.

Primena različitih audioloških metoda zavisi od uzrasta osobe i sposobnosti za saradnju kojoj se procenjuje sluh. Kod novorođenčadi i dece do četiri godine za procenu oštećenja sluha rade se sledeće audiometrijske analize: snimanje tranzitornih otoakustičnih emisija (engl. *transitory evoked otoacoustic emission* - TEOAE), auditivni evocirani potencijali moždanog stabla (engl. *brainstem evoked response audiometry* - BERA) i metoda auditornog stabilnog odgovora (engl. *auditory steady-state response* - ASSR). Kod pacijenata starijih od četiri godine, pored pomenutih metoda radi se i tonalna liminarna audiometrija u zvučno izolovanoj kabini, *cameri silentii*. Obavezna je i timpanometrija, kojom se određuje pritisak u srednjem uvu i pokretljivost timpanoosikularnog lanca i značajna je u određivanju mesta lezije.

Svim pacijentima u ovoj studiji urađena je timpanometrija od strane lekara ORL specijalista na *Danplex tym 87* aparatu (*Grason-Stadler*, SAD). Snimani su akustički refleksi na 500 Hz, 1 000 Hz, 2 000 Hz i 4 000 Hz pri intenzitetu od 70 dB, 80 dB, 90 dB i 100 dB. Snimanje tranzitornih otoakustičkih emisija je obavljano na aparatu *MAICO ERO SCAN* (*Maico*, Nemačka), dok su testovi auditivnih evociranih potencijala moždanog stabla snimani na aparatu *HORTMAN NEUROOTOMETRY* (*Neckartenzlingen*, Nemačka).

### 3.2.9. Statističke metode

Raspodela učestalosti alela i genotipova, kao i njihova povezanost sa različitim kliničkim stepenima oštećenja sluha ispitivanih pacijenata od NSAROS su analizirani korišćenjem testova opisne statistike, upotrebom *Pivot* tabela i statističkim testovima Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ), Fisherovog testa tačne verovatnoće i Kruskal-Wallis testa (sa dodatkom Bonferroni korekcije). Primenjenim statističkim testovima ispitivana je nulta hipoteza da ne postoji razlika u učestalostima ispitivanih parametara između različitih kliničkih stepena oštećenja sluha u analiziranom uzorku pacijenata obolelih od NSAROS. Smatra se da između određenih grupa bolesnika postoji statistički značajna razlika u učestalostima (odbacuje se polazna hipoteza) ukoliko je vrednost verovatnoće manja od 0,05 ( $p^4(P^5) < 0,05$ ).

Pored ovih statističkih metoda rađena je i Bayesova analiza za procenu rizika. Bayesova analiza je korišćena za konačnu procenu individualnog rizika u grupi zdravih osoba, nakon određivanja statusa heterozigotnih nosilaca, koristeći učestalosti alela iz velike studije koja je obuhvatila podatke iz različitih populacija (Snoeckx i sar, 2005).

---

<sup>4</sup> p- verovatnoća Hi kvadrat i Kruskal-Wallis testa

<sup>5</sup> P-Fisherova tačna verovatnoća

## 4. REZULTATI

### 4.1. Identifikacija varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* i određivanje njihove učestalosti kod obolelih od NSAROS u Srbiji

Detekcija varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* rađena je na uzorcima DNK grupe od 119 pacijenata sa klinički postavljenom dijagnozom obostranog sensorineuralnog oštećenja sluha koja odgovara nesindromskom autozomno-recesivnom oštećenju sluha. Za direktnu detekciju različitih varijanti korišćene su sledeće metode: PCR-ARMS (c.35delG i c.71G>A), PCR-RFLP (c.101T>C; c.-23+1G>A i m.1555A>G) i multipleks PCR (del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854)). Za detekciju prisustva drugih tačkastih mutacija, manjih delecija i duplikacija u egzonu 2 gena *GJB2* korišćena je metoda sekvenciranja po Sangeru.

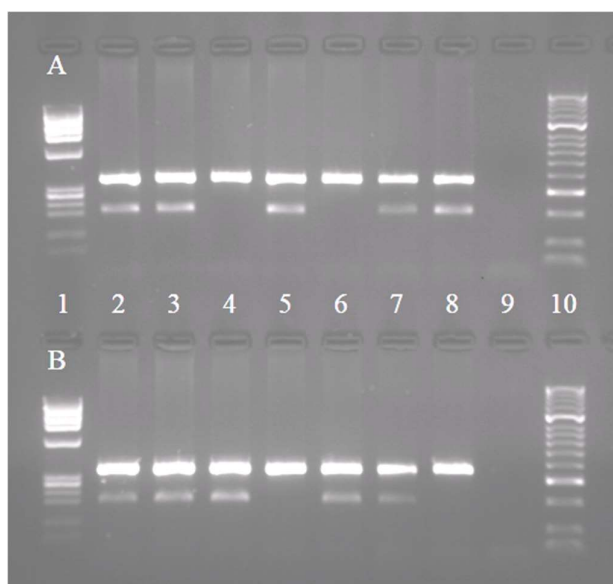
#### 4.1.1. Direktna detekcija varijante c.35delG u genu *GJB2* primenom PCR-ARMS metode

Uzorcima DNK svih 119 obolelih od NSAROS najpre su analizirani korišćenjem PCR-ARMS metode sa specifičnim prajmerima koji omogućavaju direktnu detekciju varijante c.35delG u genu *GJB2*. Metoda je izabrana kao prvi korak zbog veoma visoke učestalosti navedene mutacije u populaciji Kavkazijanaca kod osoba obolelih od ovakvog tipa poremećaja sluha (Hoefsloot i sar, 2013). Varijanta c.35delG, poznatija pod starim nazivom Gdel35, je označena kao patogena „frameshift“ mutacija. Predstavlja deleciju jedne baze guanina (G) u nizu od šest guanina (pozicija nukleotida 35) koja dovodi do pomeranja okvira čitanja i prevremene terminacije translacije proteina (koneksin 26) u 13. kodonu (p.Gly12Valfs) (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17004/>) (Zelante, 1997; Dragomir i sar, 2015). Zbog ovakvog efekta, ova varijanta pripada grupi tzv. „truncating“ mutacija.

Kao što je već rečeno, za direktnu detekciju pomenute varijante korišćena je PCR-ARMS metoda opisana ranije (Scott i sar, 1998; Lucotte i sar, 2001) koja je delimično modifikovana. Metoda je validirana u Laboratoriji za medicinsku genetiku, IMD prema protokolu rada laboratorije. Takođe, analiza je verifikovana korišćenjem kontrolnih uzoraka pozitivnih za varijantu c.35delG gena *GJB2*.

Od ukupno 238 analiziranih alela, varijanta c.35delG je identifikovana na 63 alela (26,47%) (Slika 21).



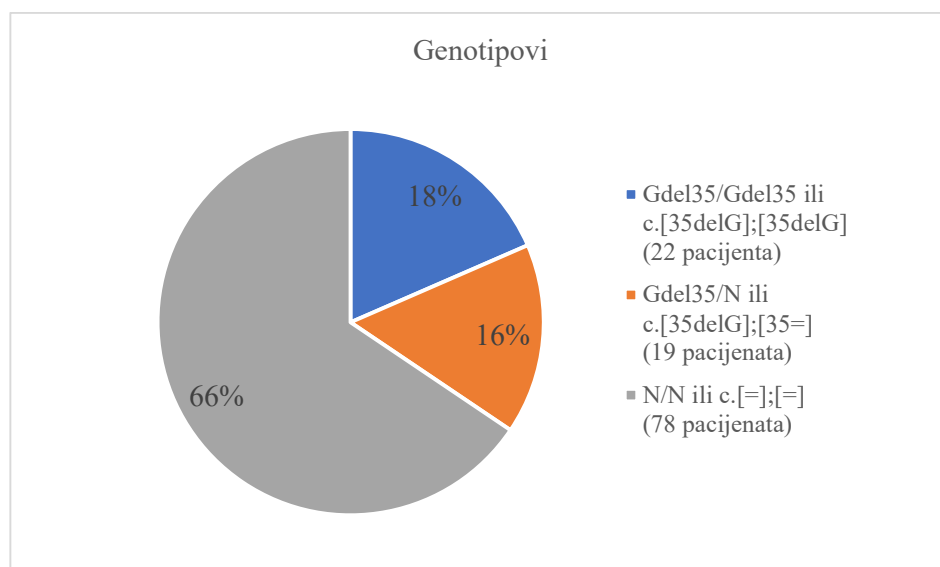


**Slika 21.** PCR-ARMS produkti direktne detekcije varijante c.35delG (dužine 202 bp) sa internom kontrolom (amelogenin, 360 bp); 2% agarozni gel; 85V, 45min.

A. PCR reakcija za detekciju normalnog alela, B. PCR reakcija za detekciju mutiranog alela.

kolona 1: DNK marker (*GeneRuler 1kb DNA ladder*); kolone 2 i 3: uzorci dva pacijenta sa heterozigotnom delecijom; kolona 4: pacijent sa homozigotnom delecijom; kolona 5: pacijent bez delecije (eng. *wild type*); kolona 6: kontrolni uzorak sa homozigotnom delecijom; kolona 7: kontrolni uzorak sa heterozigotnom delecijom; kolona 8: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*); kolona 9 blank - bez uzorka; kolona 10: DNK marker (*PhiX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*)

Molekularna analiza sprovedena na prikazanom uzorku pacijenata, pokazala je prisustvo patogene varijante c.35delG u homozigotnom stanju kod 22 obolela (genotip: c.[35delG];[35delG]), 19 pacijenata su bili heterozigoti (genotip: [35delG];[35=]), dok kod 78 pacijenata nije detektovana ova mutacija (genotip c.[=];[=]) (Slika 22).



**Slika 22.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti dobijenih genotipova nakon primene metode za direktnu detekciju varijante c.35delG u grupi od 119 ispitivanih pacijenata sa NSAROS

#### 4.1.2. Direktna detekcija varijante c.71G>A u genu *GJB2* primenom PCR-ARMS metode

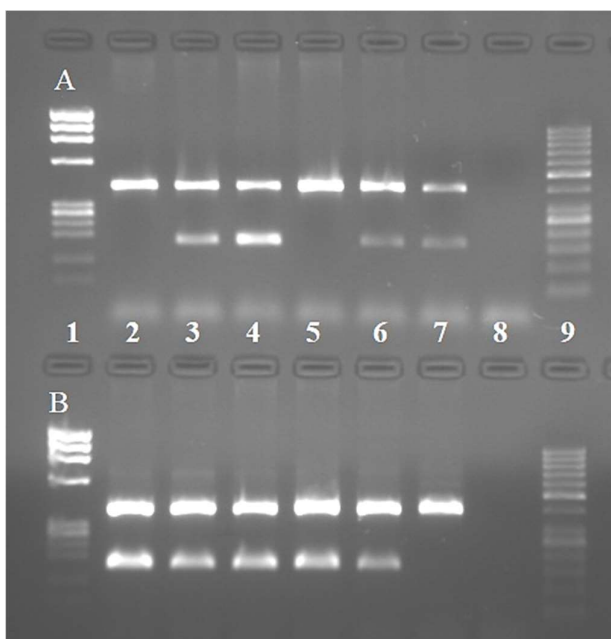
Kod 97 pacijenata kod kojih nije detektovana mutacija c.35delG na oba alela, rađen je dalji skrining gena *GJB2* i *GJB6* na prisustvo drugih varijanti.

Na osnovu dostupnih podataka o učestalosti u svetu, kao sledeći korak izabrana je metoda PCR-ARMS sa specifičnim prajmerima za direktnu detekciju varijante c.71G>A u genu *GJB2*. Varijanta c.71G>A (p.Trp24Ter, stari naziv W24Ter) je mutacija bez smisla (i pripada "truncating" mutacijama). Kao posledica zamene G u A na poziciji nukleotida 71, dolazi do formiranja prevremenog stop kodona prilikom sinteze koneksina 26 (sintetiše se protein veličine 24 umesto 226 aminokiselina) (NM\_004004.6) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17002/>) (Kelsell i sar, 1997; Dragomir i sar, 2015).

Direktna detekcija varijante c.71G>A omogućena je primenom delimično modifikovane originalne metode PCR-ARMS (Scott i sar, 1998). Modifikacije originalne metode su validirane u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMD, dok je metoda verifikovana korišćenjem pozitivnih kontrolnih uzoraka za pomenutu varijantu.

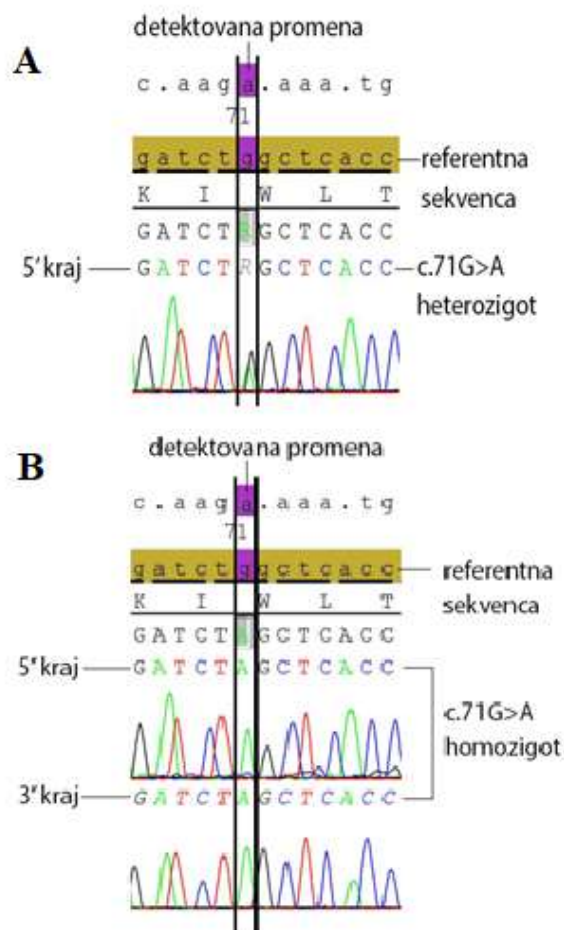
U analiziranom uzorku ova patogena varijanta je identifikovana kod ukupno 5 pacijenata. Kod tri je bila u homozigotnom obliku, a kod dva pacijenta u heterozigotnom, sa ukupnom učestalošću alela od 3,36% (8/238 alela) (Slika 23).

Prisustvo mutacije c.71G>A je potvrđeno i metodom sekvenciranja egzona 2 gena *GJB2* (Slika 24).



**Slika 23.** PCR-ARMS produkti direktne detekcije varijante c.71G>A (dužine 169 bp) sa internom kontrolom (amelogenin, 360 bp); 2% agarozni gel; 85V, 45min.

A. PCR reakcija za detekciju normalnog alela, B. PCR reakcija za detekciju mutiranog alela. kolona 1: DNK marker (*GeneRuler 1kb DNA ladder*); kolona 2: pacijent sa homozigotnom mutacijom; kolone 3 i 4: uzorci dva pacijenta sa heterozigotnom mutacijom; kolona 5: kontrolni uzorak sa homozigotnom mutacijom; kolona 6: kontrolni uzorak sa heterozigotnom mutacijom; kolona 7: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*); kolona 8 blank - bez uzorka; kolona 9: DNK marker (*PhiX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*)



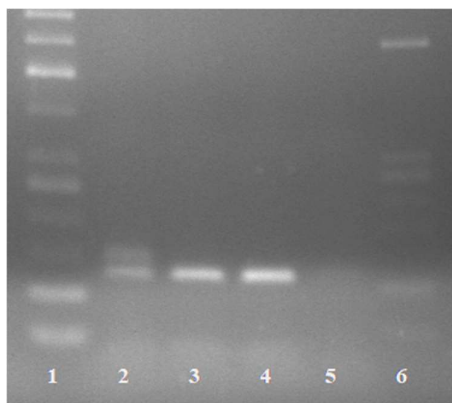
**Slika 24.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; A. pacijent sa heterozigotnom mutacijom c.71G>A; B. pacijent sa homozigotnom mutacijom c.71G>A

#### 4.1.3. Direktna detekcija varijante c.101T>C u genu *GJB2* primenom PCR-RFLP metode

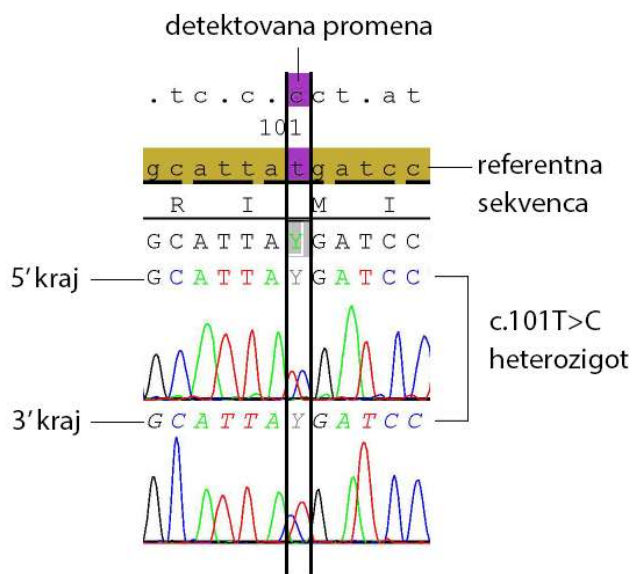
Na osnovu detektovane učestalosti kod obolelih u drugim populacijama, sledeća varijanta koja je ispitivana je bila c.101T>C (p.Met34Thr, stari naziv M34T). Ova varijanta predstavlja varijantu promenjenog smisla zamene T u C na 101. nukleotidnoj poziciji, što dovodi do zamene aminokiseline metionina sa treoninom na poziciji 34. aminokiseline u polipeptidnom lancu koneksina 26 (Coco i sar, 2013). Ispitivana varijanta po svom efektu spada u patogene (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17000/>), mada je većina autora i dalje klasifikuje kao kontroverznu (Hoefsloot i sar, 2013).

Za direktnu detekciju varijante c.101T>C korišćena je delimično modifikovana PCR-RFLP metoda opisana ranije (Perea i sar, 2007; Al Achkar i sar, 2011). Prema protokolu rada Laboratorije za medicinsku genetiku IMD je modifikovana i validirana metoda. Metoda je verifikovana upotrebom kontrolnog uzorka pozitivnog na pomenutu varijantu.

U analiziranom uzorku ova varijanta je identifikovana kod ukupno dva alela, sa učestalošću od 0,84% (2/238). Direktna detekcija ove varijante je rađena PCR-RFLP metodom na osnovu prisustva/odsustva specifičnog mesta sečenja restriktionog enzima Bcl I i detektovana je kod dva pacijenta u heterozigotnom obliku. Dobijeni rezultati su naknadno potvrđeni i metodom sekvenciranja kodirajućeg regiona gena *GJB2* (Slike 25 i 26).



**Slika 25.** PCR-RFLP produkti direktne detekcije varijante c.101T>C. Nakon digestije enzimom Bcl I dobijeni produkti za mutirani alel su dužine 144 bp (nedigestovani) i normalni alel dužine 121 bp (digestovani); 2% agarozni gel; 85V, 1,5h. kolona 1: DNK marker (*PhiX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*); kolona 2: pacijent sa heterozigotnom mutacijom; kolone 3 i 4: uzorci dva pacijenta bez mutacije; kolona 5: blank - bez uzorka; kolona 6: DNK marker (*GeneRuler 1kb DNA ladder*)

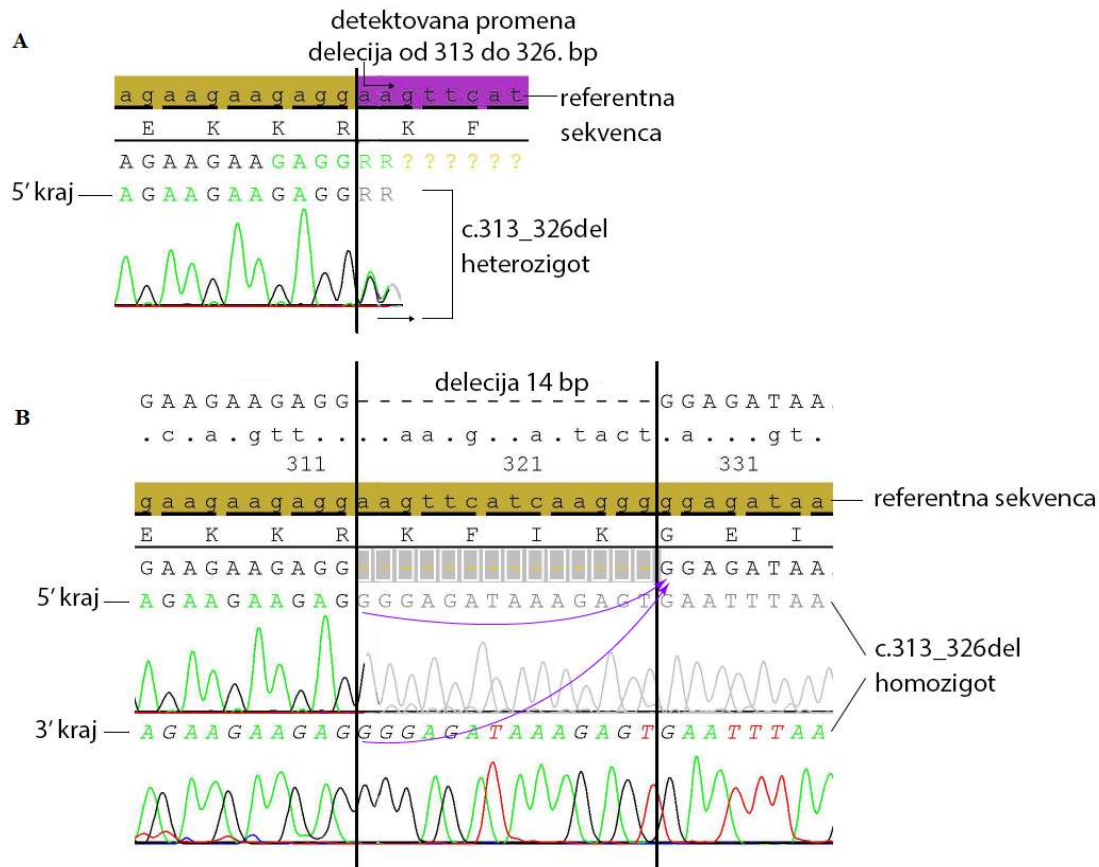


**Slika 26.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.101T>C

#### 4.1.4. Sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2* metodom po Sangeru

Za detekciju prisustva drugih tačkastih mutacija, manjih delecija i duplikacija u egzonu 2 gena *GJB2* korišćena je metoda sekvenciranja po Sangeru. Sekvenciranje ovog kodirajućeg regiona rađeno je kod svih pacijenata osim grupe u kojoj je c.35delG mutacija bila identifikovana u homozigotnom stanju. Kao rezultat primene ove metode, dodatno je pronađeno još 8 varijanti:

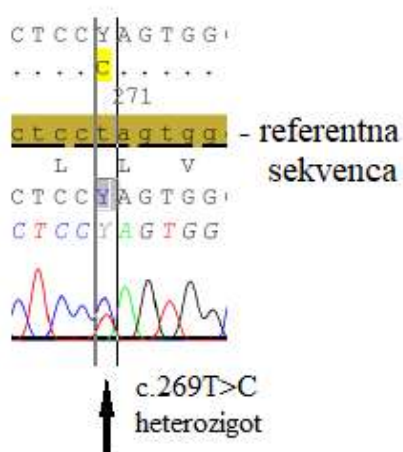
- varijanta c.313\_326del (p.Lys105Glyfs, stari naziv 313del14): ova varijanta predstavlja deleciju od 14 bp počevši od pozicije nukleotida 313, pripada *frameshift* mutacijama sa patogenim efektom (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44737/>) i dovodi do prevremenog zaustavljanja translacije koneksina 26 na poziciji kodona 110 (Kupka i sar, 2002). U analiziranom uzorku identifikovana je kod 9 alela sa ukupnom učestalošću od 3,78% (9/238) (Slika 27). Od tog broja, kod jednog pacijenta je pronađena u homozigotnom obliku i kod 8 pacijenata u heterozigotnom obliku (kao jedna od varijanti složenih heterozigota).



**Slika 27.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; A. pacijent sa heterozigotnom mutacijom c.313\_326del; B. pacijent sa homozigotnom mutacijom c.313\_326del

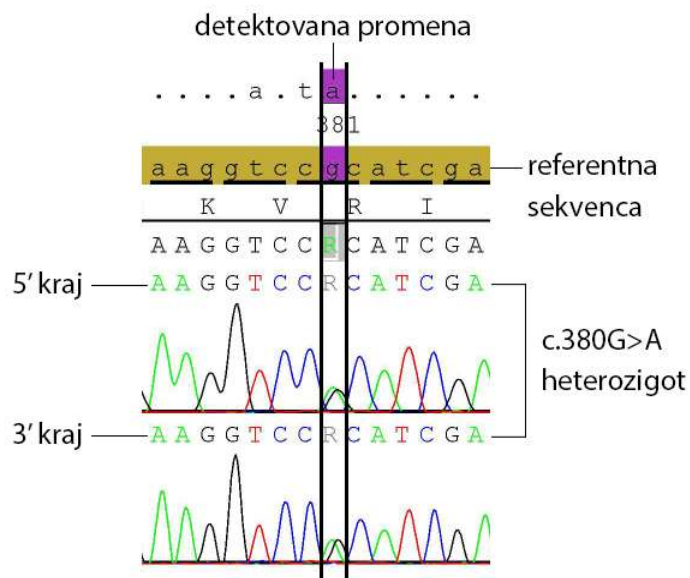
- varijanta c.269T>C (p.Leu90Pro, stari naziv L90P): predstavlja supstituciju timina citozinom na poziciji 269 (Loffler i sar, 2001), što rezultuje zamenom leucina prolinom u 90. kodonu polipeptidnog lanca koneksina 26. Ova varijanta pripada “*missense*” varijantama sa kontroverznim efektom, mada je najveći broj studija klasifikuje u varijantu sa patogenim efektom (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17016/>).

Identifikovana je kod 3 alela, sa ukupnom alelskom učestalošću od 1,26% (3/238); kod dva pacijenta složenih heterozigota i kod jednog pacijenta kao jedina detektovana mutacija u heterozigotnom obliku (Slika 28).



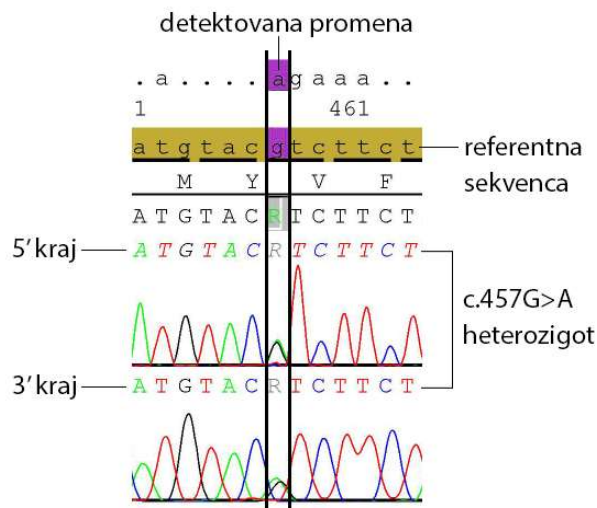
**Slika 28.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.269T>C

- varijanta c.380G>A (p.Arg127His, stari naziv R127H): ova varijanta u egzonu 2 gena *GJB2* predstavlja baznu zamenu guanina adeninom na poziciji nukleotida 380, što u kodonu 127 koneksina 26 dovodi do zamene arginina histidinom (Rabionet i sar, 2000). Efekat ove varijante promenjenog smisla je kontroverzan (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44745/>). U analiziranom uzorku obolelih od NSAROS detektovana je kod tri pacijenta u heterozigotnom obliku; ukupno kod 3 alela, sa učestalošću od 1,26% (3/238) (Slika 29).



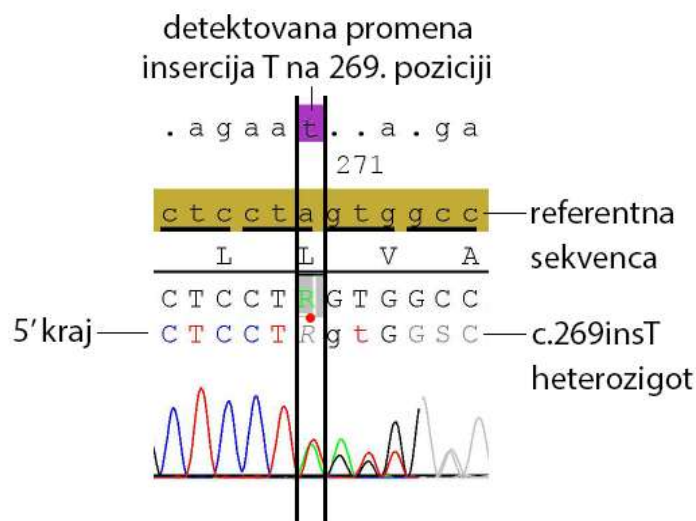
**Slika 29.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom mutacijom c.380G>A

- varijanta c.457G>A (p.Val153Ile, stari naziv V153I): varijanta promenjenog smisla nukleotidne supstitucije G u A na 457 poziciji. Ova supstitucija rezultuje zamenom aminokiselina valina izoleucinom u kodonu 153 koneksina 26 i ima benigni efekat, tj. prema učestalosti se klasifikuje u polimorfizme (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44754/>). U analiziranom uzorku je detektovana kod 2 alela, sa ukupnom učestalošću od 0,84% (2/238) (Slika 30). Aleli sa ovom varijantom su identifikovani kod dva pacijenta u heterozigotnom obliku.



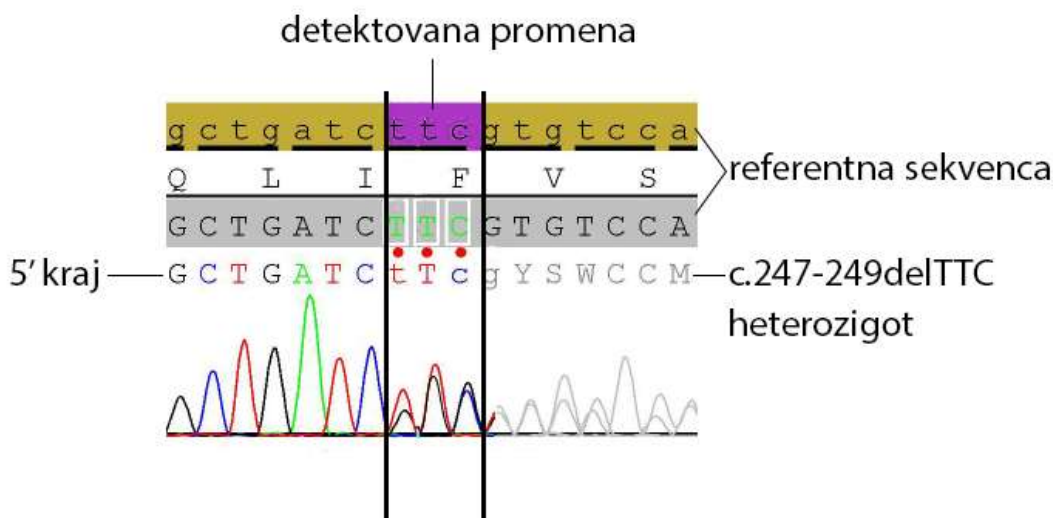
**Slika 30.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape* v2.7 programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.457G>A

- varijanta c.269insT (p.Val91fs): ova varijanta dovodi do pomeranja okvira čitanja insercijom timina na poziciji nukleotida 269 (Denoyelle i sar, 1999; Pandya i sar, 2003). Prema svom efektu pripada patogenim varijantama jer dovodi do prevremenog zaustavljanja translacije koneksina 26 (Pandya i sar, 2003). Po novijoj klasifikaciji obeležava se kao c.269dupT, mada se u većini publikacija i dalje koristi stari naziv (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/177737/>). U analiziranoj grupi pacijenata je identifikovana kod samo jednog pacijenta koji je složeni heterozigot, sa ukupnom učestalošću alela od 0,42% (1/238) (Slika 31).



**Slika 31.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.269insT

- varijanta c.247-249delTTC (p.Phe83del): ovo je prema efektu patogena varijanta u genu *GJB2* koja dovodi do delecije tri nukleotida (TTC) i pomeranja okvira čitanja, rezultujući u deleciji aminokiseline fenilalanin na poziciji 83 proteinskog produkta, koneksina 26 (NM\_004004.6) ([https://varsome.com/variant/hg38/GJB2\(NM\\_004004.6\)%3Ac.247\\_249del?annotation-mode=germline](https://varsome.com/variant/hg38/GJB2(NM_004004.6)%3Ac.247_249del?annotation-mode=germline)) (Petersen i sar, 2012). Ova delecija je detektovana kod jednog pacijenta u heterozigotnom obliku, tj. u jednom alelu (učestalost 0,42%, 1/238) (Slika 32).

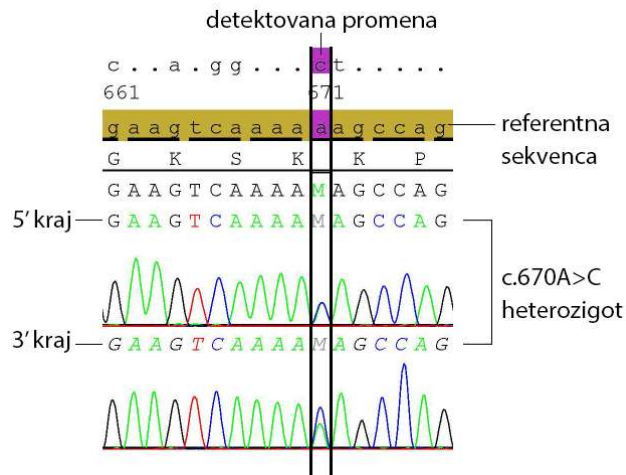


**Slika 32.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.247-249delTTC

- varijanta c.670A>C (p.Lys224Gln, stari naziv K224Q): pripada varijantama promenjenog smisla, dovodi do supstitucije baza (A u C) u poziciji 670. nukleotida (Antoniadi i sar, 2000). Ova supstitucija rezultuje zamenom lizina glutaminom u koneksinu 26 na aminokiselinskoj poziciji 224, sa još uvek nedefinisanim efektom (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44765/>). U analiziranoj grupi pacijenata,

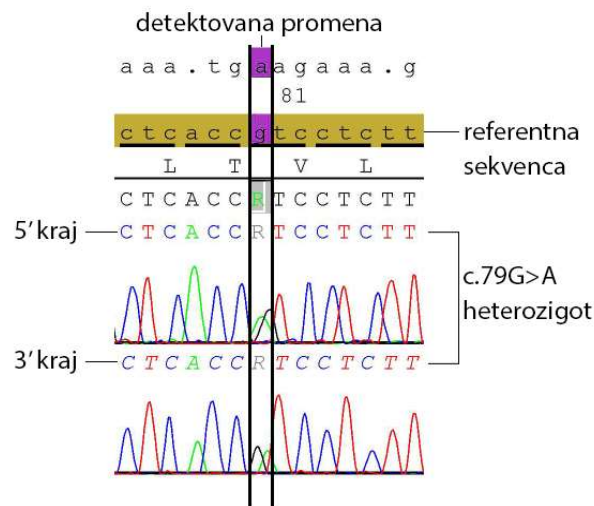


detektovana je kod jednog pacijenta u heterozigotnom obliku, tj. identifikovana na jednom alelu (1/238), sa ukupnom učestalošću od 0,42% (Slika 33).



**Slika 33.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.670A>C

- c.79G>A varijanta (p.Val27Ile, stari naziv V27I): predstavlja supstituciju G u A na poziciji 79. nukleotida, što rezultuje zamenom valina izoleucinom u 27. kodonu koneksina 26. (Kelley et al, 1998). Ova varijanta spada u grupu *missense* varijanti, a prema njenom efektu se klasifikuje u polimorfizme (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36279/>). U analiziranoj grupi obolelih od NSAROS identifikovana je u heterozigotnom obliku kod jednog pacijenta, sa ukupnom alelskom učestalošću od 0,42% (1/238 alela) (Slika 34).

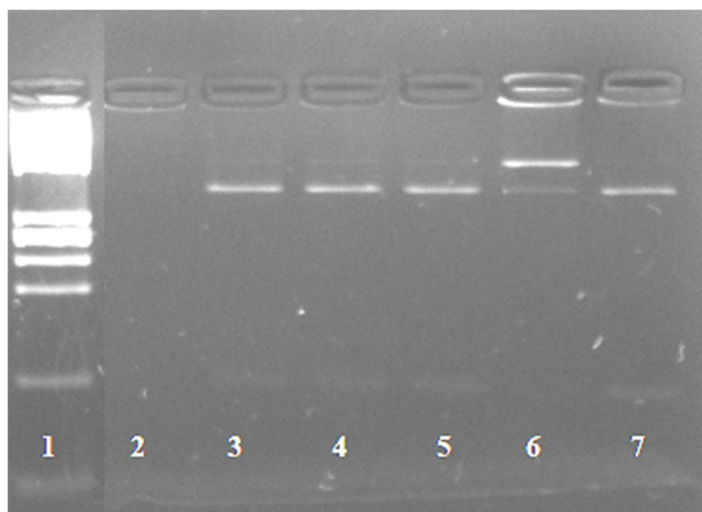


**Slika 34.** Sekvenca egzona 2 gena *GJB2*, analizirana *SeqScape v2.7* programom; pacijent sa identifikovanom heterozigotnom varijantom c.79G>A

#### 4.1.5. Direktna detekcija varijante c.-23+1G>A gena *GJB2* primenom PCR-RFLP metode

U grupi pacijenata kod kojih do sada pomenutim metodama nisu bile identifikovane bialelske mutacije (ukupno 82 obolela), urađen je dalji skrining na prisustvo varijante c.-23+1G>A. Ova varijanta, originalno nazvana IVS1+1G>A, predstavlja tačkastu “*splajs*” varijantu nekodirajućeg egzona 1 gena *GJB2* sa patogenim efektom (NM\_004004.5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17029/>). Direktna detekcija je rađena pomoću PCR-RFLP metode na osnovu prisustva/odsustva specifičnog mesta sečenja restrikcionog enzima Hph I.

Rezultati analize su pokazali da nijedan pacijent nije bio nosilac pomenute mutacije (Slika 35).



**Slika 35.** PCR-RFLP produkti direktne detekcije varijante c.-23+1G>A egzona 1 gena *GJB2*. Nakon digestije enzimom Hph I, mutirani alel je dužine 499 bp (nedigestovan) a normalni alel dužine 386 bp (digestovan); 2% agarozni gel; 85V, 30min.

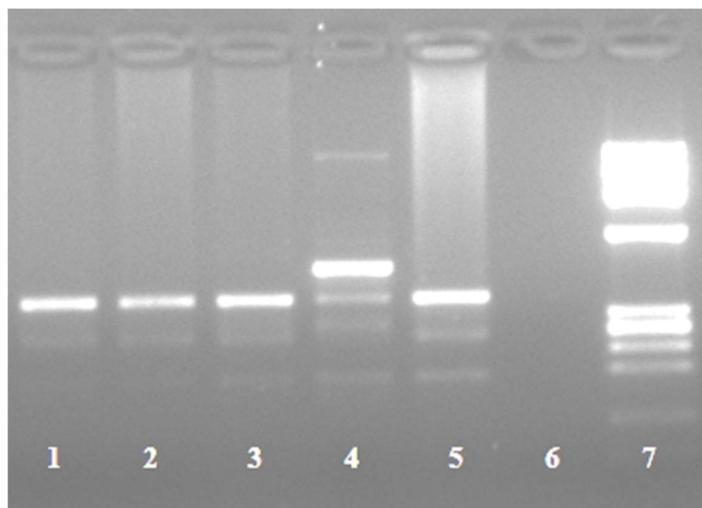
kolona 1: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*); kolona 2: blank- bez uzorka; kolone 3, 4 i 5: uzorci tri pacijenta bez mutacije; kolona 6: kontrolni uzorak sa heterozigotnom mutacijom; kolona 7: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*)

#### 4.1.6. Direktna detekcija delecija u genu *GJB6* primenom multipleks PCR metode

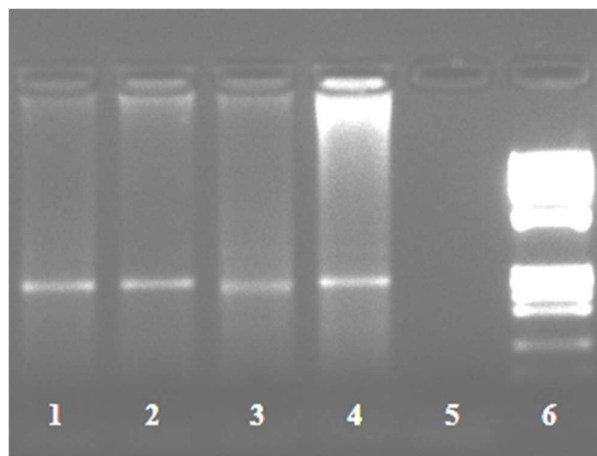
Svi pacijenti bez identifikovanih bialelskih mutacija (ukupno 82), dalje su analizirani na prisustvo čestih parcijalnih delecija u genu *GJB6*. Delecija del(*GJB6-D13S1830*) predstavlja parcijalnu deleciju gena *GJB6* veličine 309 kb sa patogenim efektom (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/5546/>). Druga parcijalna delecija gena *GJB6*, takođe sa patogenim efektom, del(*GJB6-D13S1854*) je veličine 232 kb i zahvata deleciju od introna 2 gena *GJB6* do introna 4 gena *CRYL1* (NC\_000013.11) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000005887/>). Obe delecije se najčešće javljaju u kombinaciji sa varijantama u genu *GJB2*.

Metoda izbora su bile dve odvojene multipleks PCR reakcije za direktnu detekciju gore pomenutih delecija. Analize su sprovedene na odeljenju molekularne genetike, funkcije i terapije Instituta za neurologiju i genetiku Kipra (Nikozija, Kipar) prema delimično modifikovanim uslovima originalnih metoda (Wu i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005). Obe metode su validirane i verifikovane prema protokolu rada laboratorije.

Rezultati ovih analiza su pokazali da nijedan pacijent nije bio nosilac analiziranih delecija (Slike 36 i 37).



**Slika 36.** Produkti multipleks PCR reakcije za detekciju parcijalne delecije gena *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1830) (mutirani alel dužine 460 bp i normalni alel dužine 360 bp); 2% agarozni gel; 85V, 30min. kolone 1, 2 i 3: DNK uzorci tri pacijenta bez mutacije; kolona 4: kontrolni uzorak sa heterozigotnom delecijom; kolona 5: kontrolni uzorak bez delecije (engl. *wild type*); kolona 6: blank- bez uzorka; kolona 7: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*)

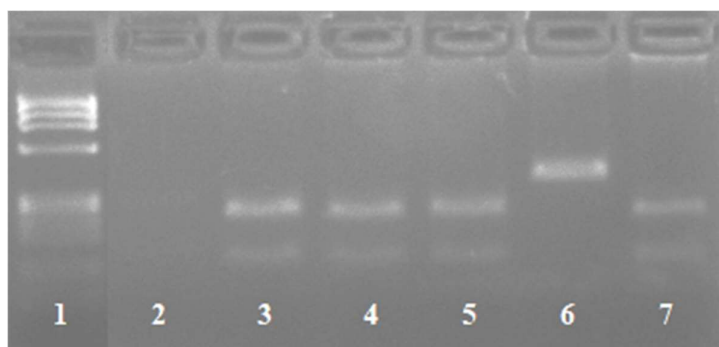


**Slika 37.** Produkti multipleks PCR reakcije za detekciju parcijalne delecije gena *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1854) (mutirani alel dužine 564 bp i normalni alel dužine 333 bp); 2% agarozni gel; 85V, 30min. kolone 1, 2 i 3: DNK uzorci tri pacijenta bez mutacije; kolona 4: kontrolni uzorak bez delecije (engl. *wild type*); kolona 5: blank - bez uzorka; kolona 6: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*)

#### 4.1.7. Direktna detekcija mitohondrijske varijante m.1555A>G primenom PCR-RFLP metode

Kao poslednji korak, u grupi od 82 obolela od NSAROS urađena je analiza na prisustvo mitohondrijske varijante m.1555A>G, stari naziv A1555G. Ova varijanta predstavlja nukleotidnu zamenu (A u G) na 1555. poziciji mitohondrijske DNK sa patogenim efektom (NC\_012920.1) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/9628/>) (Hutchin i Cortopassi, 2000; Kenneson i sar, 2002). Skrining ove mitohondrijske mutacije je urađen pomoću PCR-RFLP metode i prisustva/odsustva restrikcionog mesta za enzim BsmAI. Ova metoda je rađena na odeljenju molekularne genetike, funkcije i terapije Instituta za neurologiju i genetiku Kipra (Nikoziya, Kipar), validirana prema protokolu rada njihove laboratorije.

Nakon primene pomenute molekularno-genetičke metode, ova mitohondrijska varijanta nije detektovana ni u jednom analiziranom uzorku (Slika 38).



**Slika 38.** PCR-RFLP produkti za detekciju mitohondrijske varijante A1555G. Nakon digestije enzimom BsmAI, mutirani alel je dužine 344 bp (nedigestovan) a normalni alel dužine 234+110 bp (digestovan); 2% agarozni gel; 85V, 45min.

kolona 1: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*); kolona 2: blank- bez uzorka; kolone 3, 4 i 5: DNK uzorci tri pacijenta bez mutacije; kolona 6: kontrolni uzorak sa homozigotnom varijantom A1555G (nedigestovan produkt); 7: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*)

#### 4.2. Određivanje distribucije detektovanih varijanti i genotipova u genima *GJB2* i *GJB6* kod obolelih od NSAROS u Srbiji

Primenom prethodno opisanih molekularno genetičkih metoda za identifikaciju varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* DFNB1 lokusa, analizirano je ukupno 119 pacijenata obolelih od NSAROS. Na osnovu dobijenih rezultata, bilo je moguće po prvi put odrediti tip i učestalost mutacija i dobijenih genotipova u populaciji obolelih od NSAROS u Srbiji.

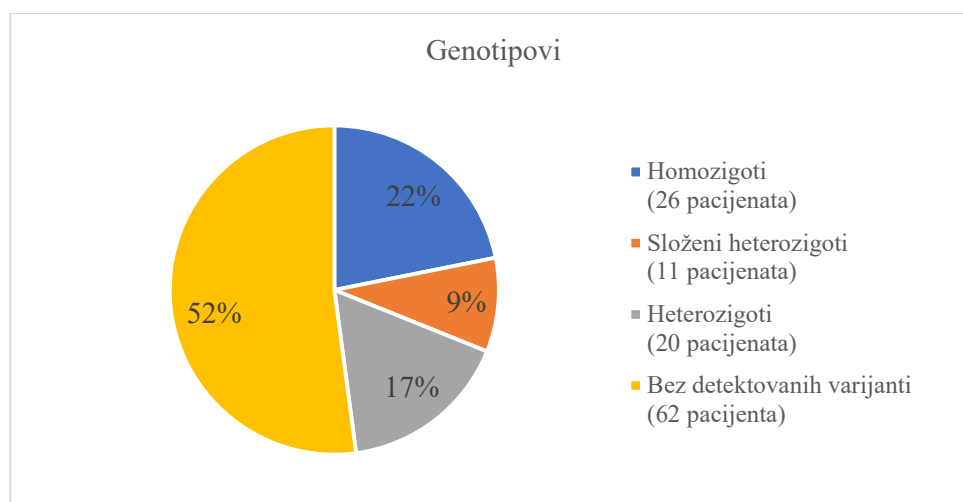
U analiziranoj grupi pacijenata detektovano je 11 različitih varijanti. Sve varijante se nalaze u kodirajućem regionu egzona 2 gena *GJB2*. Šest varijanti su bile patogene, dve varijante imaju kontroverzan efekat, dve varijante se svrstavaju u polimorfizme, dok je kod jedne varijante efekat nepoznat. Najveću učestalost je imala mutacija c.35delG (26,47%, 63/238 alela). Preostale varijante su bile zastupljene od 0,42-3,78%. Primenom svih pomenutih metoda ukupno je identifikovano 39,50% alela (94/238) u analiziranoj grupi obolelih od NSAROS (Tabela 14).

Tabela 14. Distribucija identifikovanih varijanti gena *GJB2* u analiziranoj grupi od 119 obolelih od NSAROS u Srbiji

| Varijanta          |                         |                       |                            |                       | Broj alela (N <sup>o</sup> ) | Učestalost (%) |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Naziv na nivou DNK | Naziv na nivou proteina | Stari naziv varijante | Lokacija* (domen proteina) | Efekat                |                              |                |
| c.35delG           | p.Gly12Valfs            | Gdel35                | N-terminus                 | Patogena              | 63/238                       | 26,47%         |
| c.313_326del       | p.Lys105Glyfs           | 313del14              | IC2                        | Patogena              | 9/238                        | 3,78%          |
| c.71G>A            | p.Trp24Ter              | W24Ter                | TM1                        | Patogena              | 8/238                        | 3,36%          |
| c.269T>C           | p.Leu90Pro              | L90P                  | TM2                        | Patogena              | 3/238                        | 1,26%          |
| c.380G>A           | p.Arg127His             | R127H                 | IC                         | Kontroverzna          | 3/238                        | 1,26%          |
| c.101T>C           | p.Met34Thr              | M34T                  | TM1                        | Patogena/kontroverzna | 2/238                        | 0,84%          |
| c.457G>A           | p.Val153Ile             | V153I                 | TM3                        | Polimorfizam          | 2/238                        | 0,84%          |
| c.269insT          |                         | 269insT               | TM2                        | Patogena              | 1/238                        | 0,42%          |
| c.247-249delTTC    | p.Phe83del              |                       |                            | Patogena              | 1/238                        | 0,42%          |
| c.670A>C           | p.Lys224Gln             | K224Q                 | IC3                        | Nepoznato             | 1/238                        | 0,42%          |
| c.79G>A            | p.Val27Ile              | V27I                  | TM1                        | Polimorfizam          | 1/238                        | 0,42%          |
| Ukupno             |                         |                       |                            |                       | 94/238                       | 39,50%         |

\*TM-transmembranski domen; IC (engl. *Intercellular*)-unutarćelijski domen

Od 119 analiziranih pacijenata obolelih od NSAROS, kod 37 su detektovane bialelske varijante (homozigoti i složeni heterozigoti) sa ukupnom učestalošću od 31,09%. Dvadeset pacijenata su bili heterozigotni nosioci (16,81%), dok kod 52,10% obolelih (62 pacijenta) nisu identifikovane varijante ni na jednom alelu (Slika 39).



Slika 39. Grafički prikaz procentualne zastupljenosti detektovanih tipova genotipova u grupi od 119 ispitivanih pacijenata sa NSAROS

U Tabeli 15. je predstavljena raspodela dobijenih genotipova u odnosu na pol i uzrast analiziranih pacijenata.

Tabela 15. Raspodela dobijenih genotipova u odnosu na pol i uzrast izražen u godinama u grupi od 119 analiziranih obolelih od NSAROS

| Genotip                    | Pol    | Broj pacijenata (N°) | Uzrast (najmlađi) | Uzrast (najstariji) | Uzrast (prosečna vrednost) |
|----------------------------|--------|----------------------|-------------------|---------------------|----------------------------|
| Homozigoti                 | Ženski | 16                   | 1                 | 36                  | 13,31                      |
|                            | Muški  | 10                   | 1,9               | 37                  | 11,79                      |
|                            | Ukupno | <b>26</b>            | <b>1</b>          | <b>37</b>           | <b>12,73</b>               |
| Složeni heterozigoti       | Ženski | 4                    | 2,4               | 68                  | 20,60                      |
|                            | Muški  | 7                    | 0,9               | 34                  | 11,57                      |
|                            | Ukupno | <b>11</b>            | <b>0,9</b>        | <b>68</b>           | <b>14,85</b>               |
| Heterozigoti               | Ženski | 9                    | 1,4               | 25                  | 8,93                       |
|                            | Muški  | 11                   | 2                 | 50                  | 12,91                      |
|                            | Ukupno | <b>20</b>            | <b>1,4</b>        | <b>50</b>           | <b>11,23</b>               |
| Bez detektovanih varijanti | Ženski | 27                   | 1,1               | 41                  | 12,83                      |
|                            | Muški  | 35                   | 0,4               | 30                  | 5,05                       |
|                            | Ukupno | <b>62</b>            | <b>0,4</b>        | <b>41</b>           | <b>8,51</b>                |
| Ukupno                     |        | <b>119</b>           | <b>0,4</b>        | <b>68</b>           | <b>10,45</b>               |

U analiziranoj grupi od 119 obolelih od NSAROS, ukupno je identifikovano 16 različitih genotipova. Najveću učestalost su imali homozigoti za mutaciju c.35delG (genotip: c.[35delG];[35delG]) (18,49%, 22/119), dok kod 62 pacijenta (52,10%) nisu nađene promene u ispitivanim genima (genotip: c.[=];[=]) (Tabela 16).

Tabela 16. Identifikovani genotipovi i njihova učestalost u grupi od 119 analiziranih pacijenata sa NSAROS

| Tip genotipa               | Genotip                     | Broj pacijenata (N°) | Ukupna učestalost (% , N°) | Učestalost u grupi (% , N°) |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Homozigoti                 | c.[313_326del];[313_326del] | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 3,85%<br>(1/26)             |
|                            | c.[35delG];[35delG]         | 22                   | 18,49%<br>(22/119)         | 84,62%<br>(22/26)           |
|                            | c.[71G>A];[71G>A]           | 3                    | 2,52%<br>(3/119)           | 11,54%<br>(3/26)            |
|                            | <b>Ukupno</b>               | <b>26</b>            | <b>21,85%</b>              | <b>100,00%</b>              |
| Složeni heterozigoti       | c.[35delG];[269insT]        | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 9,09%<br>(1/11)             |
|                            | c.[35delG];[313_326del]     | 6                    | 5,04%<br>(6/119)           | 54,55%<br>(6/11)            |
|                            | c.[35delG];[269T>C]         | 2                    | 1,68%<br>(2/119)           | 18,18%<br>(2/11)            |
|                            | c.[35delG];[71G>A]          | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 9,09%<br>(1/11)             |
|                            | c.[71G>A];[313_326del]      | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 9,09%<br>(1/19)             |
|                            | <b>Ukupno</b>               | <b>11</b>            | <b>9,24%</b>               | <b>100,00%</b>              |
| Heterozigoti               | c.[247-249delTTC];[?]       | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 5,00%<br>(1/20)             |
|                            | c.[35delG];[?]              | 9                    | 7,56%<br>(9/119)           | 45,00%<br>(1/20)            |
|                            | c.[670A>C];[?]              | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 5,00%<br>(1/20)             |
|                            | c.[269T>C];[?]              | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 5,00%<br>(1/20)             |
|                            | c.[101T>C];[?]              | 2                    | 1,68%<br>(2/119)           | 10,00%<br>(2/20)            |
|                            | c.[380G>A];[?]              | 3                    | 2,52%<br>(3/119)           | 15,00%<br>(3/20)            |
|                            | c.[457G>A];[?]              | 2                    | 1,68%<br>(2/119)           | 10,00%<br>(2/20)            |
|                            | c.[79G>A];[?]               | 1                    | 0,84%<br>(1/119)           | 5,00%<br>(1/20)             |
|                            | <b>Ukupno</b>               | <b>20</b>            | <b>16,81%</b>              | <b>100,00%</b>              |
| Bez detektovanih varijanti | c.[=];[=]                   | 62                   | 52,10%<br>(62/119)         | 100,00%<br>(62/62)          |
|                            | <b>Ukupno</b>               | <b>62</b>            | <b>52,10%</b>              | <b>100,00%</b>              |
| <b>Ukupno</b>              |                             | <b>119</b>           | <b>100,00%</b>             |                             |

### 4.3. Ispitivanje fenotipske varijabilnosti identifikovanih varijanti - asocijacija genotipova sa stepenom oštećenja sluha

#### 4.3.1. Rezultati audioloških ispitivanja

Kliničko audiološko ispitivanje je sprovedeno kod svih 119 pacijenata sa dijagnozom obostranog sensorineuralnog oštećenja sluha koja odgovara NSAROS. Audiometrijski testovi su sprovedeni kod 103 bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze (pedijatrijski pacijenti). Kod starijih pacijenata (ukupno 16), dijagnoza NSAROS je već bila ranije postavljena, ali je audiološkim ispitivanjima ponovo određen stepen oštećenja sluha u trenutku kada su poslani na genetičke analize. Rezultati su pokazali da su pacijenti imali umereno do duboko oštećenje sluha. Tabele 17 i 18 prikazuju zastupljenost različitog stepena oštećenja sluha u odnosu na pol pacijenata, uzrast i prag čujnosti (izraženog u decibelima, dB). Jedan pacijent je imao umereno oštećenje sluha, ali podatak o pragu čujnosti nije bio dostupan, već je naznačen samo stepen oštećenja sluha (Tabela 18). Primenom statističkog Hi kvadrat testa pokazano je da nema asocijacije između stepena oštećenja sluha i pola ispitivanih pacijenata ( $p=0,600$ ) (Tabela 17).

Tabela 17. Učestalost dobijenih tipova oštećenja sluha u odnosu na pol i uzrast pacijenata (izražen u godinama) u analiziranoj grupi

| Stepen oštećenja sluha | Pol    | Broj pacijenata (N°) | Uzrast (najmlađi) | Uzrast (najstariji) | Uzrast (prosečna vrednost) | Ukupna učestalost (N°, %) |
|------------------------|--------|----------------------|-------------------|---------------------|----------------------------|---------------------------|
| Umereno                | muški  | 1                    | 1,6               | 1,6                 | 1,60                       | 1/119 (0,84%)             |
| Srednje                | ženski | 12                   | 1,4               | 41                  | 13,70                      | 20/119 (16,81%)           |
|                        | muški  | 8                    | 2                 | 15                  | 7,38                       |                           |
| Srednje teško          | ženski | 6                    | 2,3               | 25                  | 11,55                      | 18/119 (15,13%)           |
|                        | muški  | 12                   | 0,4               | 50                  | 10,62                      |                           |
| Teško                  | ženski | 19                   | 1                 | 38                  | 13,05                      | 39/119 (32,77%)           |
|                        | muški  | 20                   | 0,9               | 18                  | 5,36                       |                           |
| Duboko                 | ženski | 19                   | 1                 | 68                  | 12,85                      | 41/119 (34,45%)           |
|                        | muški  | 22                   | 0,7               | 37                  | 10,11                      |                           |
| <b>Ukupno</b>          |        | <b>119</b>           | <b>0,4</b>        | <b>68</b>           | <b>10,45</b>               | <b>100,00%</b>            |
| <b>Hi kvadrat test</b> |        |                      | $\chi^2=2,752$    | $df^6=4$            | $p=0,600$                  |                           |

Primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće, pokazano je postojanje statistički značajne razlike ( $P<0,05$ ) u zastupljenosti tipova stepena oštećenja sluha u analiziranoj grupi pacijenata obolelih od NSAROS (Tabela 17). Najučestaliji tipovi stepena oštećenja sluha su bili duboko, teško i srednje oštećenje (34,45%, 32,77% i 16,81% redom).

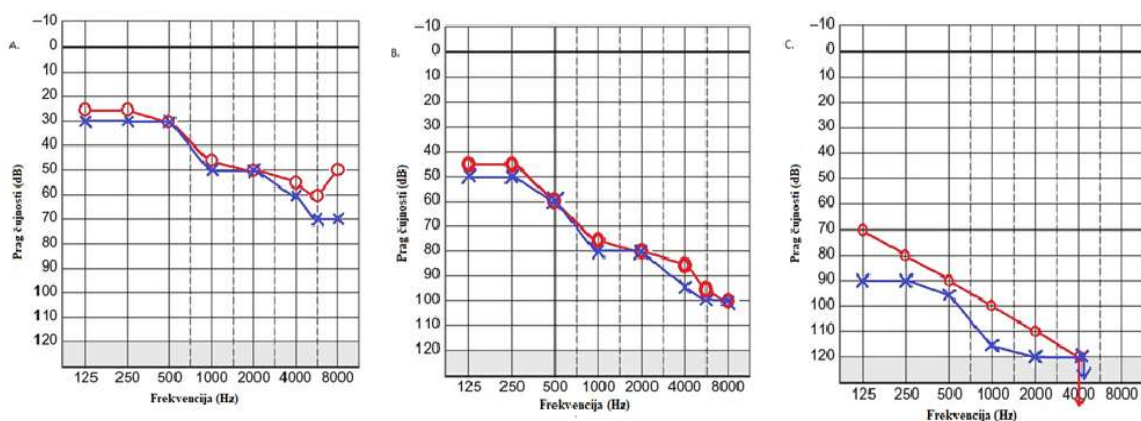
<sup>6</sup> df- stepen slobode



Tabela 18. Stepen oštećenja sluha sa vrednostima praga sluha (čujnosti) izraženim u decibelima (dB) u grupi od 119 bolesnika sa NSAROS

| Stepen oštećenja sluha                 | Broj pacijenata (N <sup>o</sup> , %) | Prosečna vrednost praga sluha (dB) |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| Umereno                                | 1(0,84%)                             | /                                  |
| Srednje                                | 20 (16,81%)                          | 51,19                              |
| Srednje teško                          | 18 (15,13%)                          | 64,10                              |
| Teško                                  | 39 (32,77%)                          | 70,95                              |
| Duboko                                 | 41 (34,45%)                          | 98,30                              |
| <b>Ukupno</b>                          | <b>119</b>                           | <b>69,03</b>                       |
| <b>Fisherov test tačne verovatnoće</b> |                                      | <b>P&lt;0,05</b>                   |

Na Slici 40 su prikazani audiogrami tri pacijenta sa najčešćim tipovima oštećenja sluha.



**Slika 40.** Audiogrami - odnos praga čujnosti (dB) i frekvencije (Hz) kod tri analizirana pacijenta; crvenom bojom je označeno desno uvo, a plavom levo uvo.

A. pacijent sa srednjim oštećenjem sluha; B. pacijent sa teškim oštećenjem sluha i C. pacijent sa dubokim oštećenjem sluha

#### 4.3.2. Ispitivanje asocijacije detektovanih genotipova varijante c.35delG sa stepenom oštećenja sluha

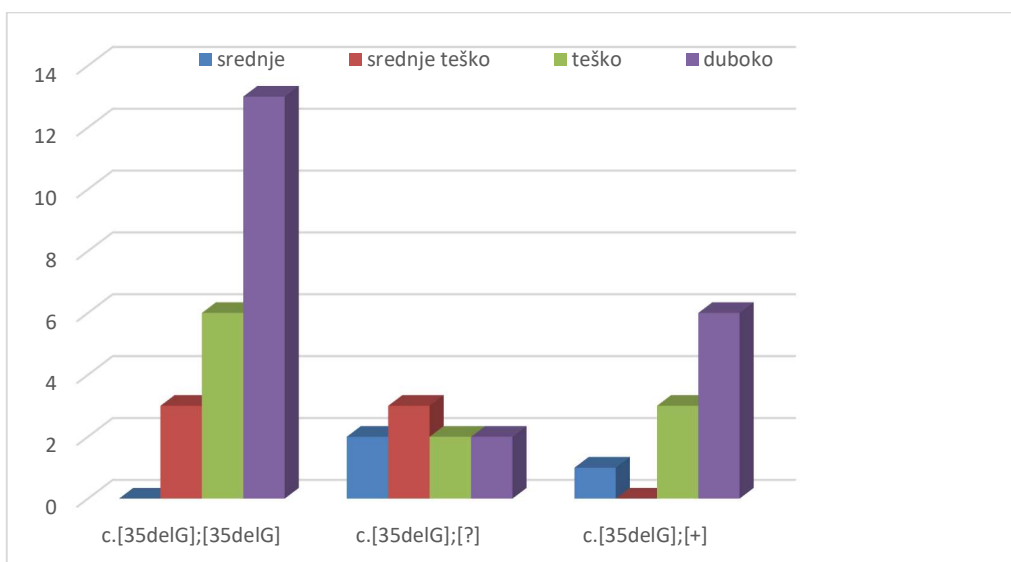
Kao što je već rečeno, najveću učestalost u ispitivanoj grupi od 119 pacijenata sa NSAROS je imala varijanta c.35delG (26,47%, Tabela 14). Detektovana je kod 41 pacijenta: kod 22 u

homozigotnom obliku, kod 10 složenih heterozigota, dok je kod 9 pacijenata c.35delG bila u heterozigotnom obliku (bez identifikovane druge uzročne mutacije) (Tabela 19, Slika 41). Kod pacijenata sa homozigotnom varijantom c.35delG najviše je bio zastupljen najteži stepen oštećenja sluha (duboko) - 59,09% (Tabela 19, Slika 41). Pacijenti sa genotipom c.[35delG];[+] su u najvećem broju slučajeva imali teško ili duboko oštećenje sluha. Heterozigotni pacijenti za varijantu c.35delG su imali skoro podjednako zastupljene sve tipove oštećenja (Tabela 19, Slika 41). Statistički značajna razlika između stepena oštećenja sluha i analiziranih genotipova pokazana je primenom Kruskal-Wallis testa ( $p=0,042$ ) (Tabela 19).

Tabela 19. Stepen oštećenja sluha kod 41 pacijenta sa detektovanom varijantom c.35delG prisutnom u različitim genotipovima

| Genotip                                    |                         | Stepen oštećenja sluha | Broj pacijenata (N°) | Učestalost u grupi (N°, %) |
|--|-------------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| Homozigot<br>c.[35delG];[35delG]           |                         | Srednje teško          | 3                    | 13,64%<br>(3/22)           |
|  |                         | Teško                  | 6                    | 27,27%<br>(6/22)           |
|  |                         | Duboko                 | 13                   | 59,09%<br>(13/22)          |
|  |                         | <b>Ukupno</b>          | <b>22</b>            | <b>100,00%</b>             |
| Složeni<br>Heterozigoti<br>c.[35delG];[+]* | c.[35delG];[269insT]    | Duboko                 | 1                    | 10,00%<br>(1/10)           |
|  | c.[35delG];[313_326del] | Teško                  | 2                    | 20,00%<br>(2/10)           |
|  |                         | Duboko                 | 4                    | 40,00%<br>(4/10)           |
|  | c.[35delG];[269T>C]     | Srednje                | 1                    | 10,00%<br>(1/10)           |
|  |                         | Teško                  | 1                    | 10,00%<br>(1/10)           |
|  | c.[35delG];[71G>A]      | Duboko                 | 1                    | 10,00%<br>(1/10)           |
|  | <b>Ukupno</b>           |                        |                      | <b>10</b>                  |
| Heterozigoti<br>c.[35delG];[?]             |                         | Srednje                | 2                    | 22,22%<br>(2/9)            |
|  |                         | Srednje teško          | 3                    | 33,33%<br>(3/9)            |
|  |                         | Teško                  | 2                    | 22,22%<br>(2/9)            |
|  |                         | Duboko                 | 2                    | 22,22%<br>(2/9)            |
|  |                         | <b>Ukupno</b>          | <b>9</b>             | <b>100,00%</b>             |
| <b>Ukupno</b>                              |                         |                        | <b>41</b>            |                            |
| <b>Kruskal-Wallis test</b>                 |                         |                        | <b>p=0,042</b>       |                            |

\*-prisustvo druge identifikovane varijante



**Slika 41.** Grafički prikaz zastupljenosti tipa oštećenja sluha u različitim grupama genotipova sa varijantom c.35delG; X-osa genotipovi sa različitim stepenom oštećenja sluha; Y-osa broj pacijenata

Kako bi se odredilo poreklo statističke značajnosti, urađene su dodatne analize poređenja parova genotipova i njihovih stepena oštećenja sluha. Rezultati ovih analiza su pokazali prisustvo statistički značajne razlike između stepena oštećenja sluha poređenjem sledećih genotipova: homozigoti/heterozigoti, složeni heterozigoti/heterozigoti (bez Bonferroni korekcije) (Tabela 20). Poređenjem homozigota sa složenim heterozigotima značajnost nije dobijena ( $p > 0,05$ ) (Tabela 20).

Tabela 20. Rezultati statističkog poređenja stepena oštećenja sluha među detektovanim genotipovima primenom Kruskal-Wallis testa

|  | p vrednost   | p vrednost (nakon Bonferroni korekcije) |
|--|--------------|---|
| <b>Homozigoti/Heterozigoti</b>           | <b>0,016</b> | 0,049                                   |
| <b>Složeni heterozigoti/Heterozigoti</b> | <b>0,038</b> | 0,115                                   |
| <b>Homozigoti/Složeni heterozigoti</b>   | 0,999        | 1,000                                   |

#### 4.3.3. Ispitivanje asocijacije svih detektovanih genotipova sa stepenom oštećenja sluha

Rezultati uporedne analize audioloških profila 119 obolelih od NSAROS i svih detektovanih genotipova pokazali su da su pacijenti sa bialelskim varijantama, bilo u homozigotnom stanju ili kao složeni heterozigoti, najčešće imali duboko oštećenje sluha (57,69% i 63,64% respektivno, Tabela 21, Slika 42). Kod heterozigotnih pacijenata najčešće je zastupljeno srednje oštećenje sluha (45%), dok su ostala skoro podjednako zastupljena (Tabela 21, Slika 42). Grupa pacijenata bez detektovanih varijanti (62/119), najčešće je imala teško do duboko oštećenje sluha (38,71% i 25,81% redom) (Tabela 21, Slika 42). Primenom Kruskal-Wallis testa pokazano je postojanje statistički značajne

razlike ( $p < 0,001$ ), a samim tim i asocijacija između stepena oštećenja sluha i dobijenih genotipova kod 119 pacijenta (Tabela 21). Kako se primenjenim testom može videti samo ukupno postojanje asocijacije, urađene su dalje statističke analize kojima su poređeni stepeni oštećenja sluha među parovima dobijenih genotipova. Rezultati su pokazali prisustvo statistički značajne razlike poređenjem heterozigota sa ostalim genotipovima, kao i poređenjem homozigotnih sa pacijentima bez detektovanih varijanti (Tabela 22).

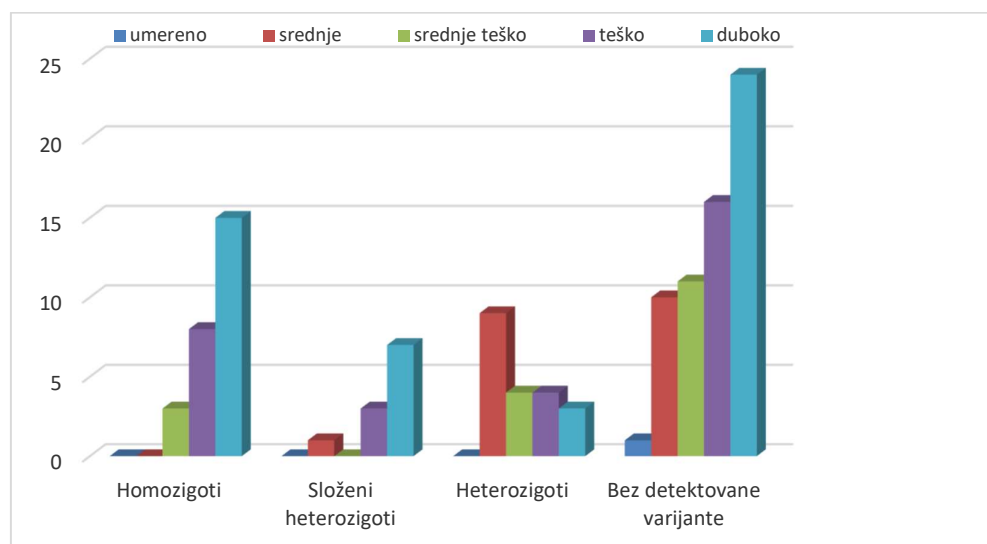
Tabela 21. Step en oštećenja sluha u različitim grupama genotipova identifikovanih kod 119 pacijenata obolelih od NSAROS

| Tip genotipa        | Step en oštećenja sluha | Genotip                     | Broj pacijenata (N°) | Učestalost u grupi detektovanih genotipova (%) |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|--|
| Homozigot           | srednje teško           | c.[35delG];[35delG]         | 3                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>3</b>             | <b>11,54%</b>                                  |
|                     | Teško                   | c.[313_326del];[313_326del] | 1                    |  |
|                     |                         | c.[35delG];[35delG]         | 6                    |  |
|                     |                         | c.[71G>A];[71G>A]           | 1                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>8</b>             | <b>30,77%</b>                                  |
|                     | Duboko                  | c.[35delG];[35delG]         | 13                   |  |
|                     |                         | c.[71G>A];[71G>A]           | 2                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>15</b>            | <b>57,69%</b>                                  |
|                     | <b>Ukupno</b>           |                             |                      | <b>26</b>                                      |
| Složeni heterozigot | Srednje                 | c.[35delG]; [269T>C]        | 1                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>1</b>             | <b>9,09%</b>                                   |
|                     | Teško                   | c.[35delG];[313_326del]     | 2                    |  |
|                     |                         | c.[35delG]; [269T>C]        | 1                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>3</b>             | <b>27,27%</b>                                  |
|                     | Duboko                  | c.[35delG];[269insT]        | 1                    |  |
|                     |                         | c.[35delG];[313_326del]     | 4                    |  |
|                     |                         | c.[35delG];[71G>A]          | 1                    |  |
|                     |                         | c.[71G>A];[313_326del]      | 1                    |  |
|                     | <b>Ukupno</b>           |                             |                      | <b>7</b>                                       |
| <b>Ukupno</b>       |                         |                             | <b>11</b>            | <b>100,00%</b>                                 |
| Heterozigot         | Srednje                 | c.[247-249delTTC];[?]       | 1                    |  |
|                     |                         | c.[35delG];[?]              | 2                    |  |
|                     |                         | c.[380G>A];[?]              | 3                    |  |
|                     |                         | c.[457G>A];[?]              | 2                    |  |
|                     |                         | c.[79G>A];[?]               | 1                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>9</b>             | <b>45,00%</b>                                  |
|                     | srednje teško           | c.[35delG];[?]              | 3                    |  |
|                     |                         | c.[269T>C];[?]              | 1                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>4</b>             | <b>20,00%</b>                                  |
|                     | Teško                   | c.[35delG];[?]              | 2                    |  |
|                     |                         | c.[101T>C];[?]              | 2                    |  |
|                     |                         | <b>Ukupno</b>               | <b>4</b>             | <b>20,00%</b>                                  |
|                     | Duboko                  | c.[35delG];[?]              | 2                    |  |
|                     |                         | c.[670A>C];[?]              | 1                    |  |

|                            |               |               |                   |                |
|----------------------------|---------------|---------------|-------------------|----------------|
|                            |               | <b>Ukupno</b> | <b>3</b>          | <b>15,00%</b>  |
|                            |               | <b>Ukupno</b> | <b>20</b>         | <b>100,00%</b> |
| Bez detektovanih varijanti | Umereno       | c.[=];[=]     | 1                 | 1,61%          |
|                            | Srednje       | c.[=];[=]     | 10                | 16,13%         |
|                            | srednje teško | c.[=];[=]     | 11                | 17,74%         |
|                            | Duboko        | c.[=];[=]     | 16                | 25,81%         |
|                            | Teško         | c.[=];[=]     | 24                | 38,71%         |
|                            |               | <b>Ukupno</b> | <b>62</b>         | <b>100,00%</b> |
|                            |               | <b>Ukupno</b> | <b>119</b>        |                |
| <b>Kruskal-Wallis test</b> |               |               | <b>p&lt;0,001</b> |                |

Tabela 22. Rezultati statističkog poređenja stepena oštećenja sluha među genotipovima

|  | <b>p vrednost</b> | <b>p vrednost (nakon Bonferroni korekcije)</b> |
|--|-------------------|--|
| <b>Heterozigoti/Bez detektovane varijante</b>          | <b>0,010</b>      | 0,060  |
| <b>Homozigoti/Heterozigoti</b>                         | <b>&lt;0,001</b>  | <0,001   |
| <b>Složeni heterozigoti/Heterozigoti</b>               | <b>0,001</b>      | 0,007  |
| <b>Homozigoti/ Bez detektovane varijante</b>           | <b>0,027</b>      | 0,159  |
| <b>Složeni heterozigoti/ Bez detektovane varijante</b> | 0,089             | 0,534  |
| <b>Homozigoti/ Složeni heterozigoti</b>                | 0,916             | 1,000  |



Slika 42. Grafički prikaz zastupljenosti tipova oštećenja sluha u različitim grupama genotipova identifikovanih kod 119 obolelih od NSAROS

#### 4.3.4. Ispitivanje asocijacije stepena oštećenja sluha i identifikovanih varijanti u odnosu na njihov efekat na koneksin 26

Kao što je već rečeno, u analiziranoj grupi od 119 pacijenata sa NSAROS kod ukupno 57 obolelih je detektovano 11 različitih varijanti. Na osnovu toga kakav efekat imaju na strukturu i/ili funkciju koneksina 26, sve identifikovane varijante su podeljene u dve grupe. Pet detektovanih *nonsense* i *frameshift* varijanti su pripadale grupi tzv. „truncating“ mutacija (obeleženi sa T), dok su preostalih 6 bile tzv. *nontruncating* (obeleženi kao NT) (Tabela 23).

Tabela 23. Podela identifikovanih varijanti prema njihovom efektu na koneksin 26

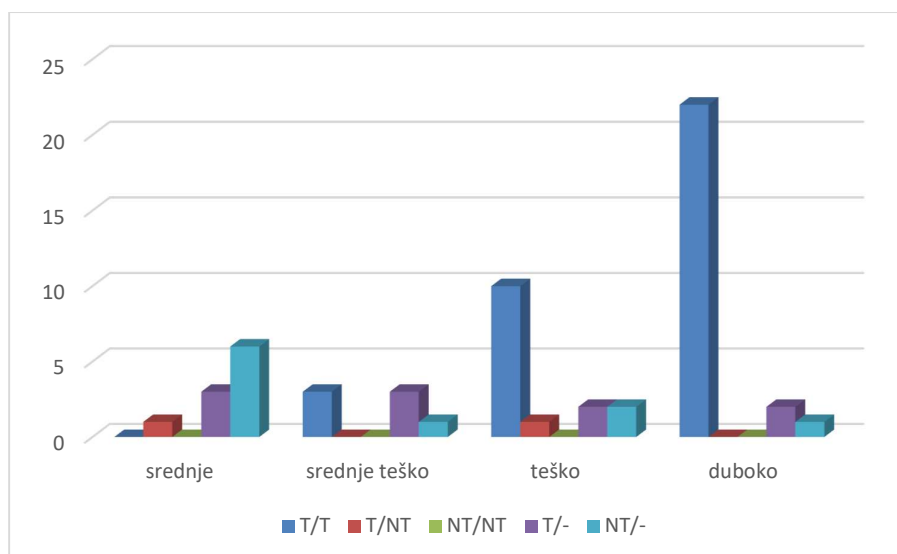
| Varijanta       | Efekat na protein * |
|-----------------|---------------------|
| c.35delG        | T                   |
| c.313_326del    | T                   |
| c.71G>A         | T                   |
| c.269T>C        | NT                  |
| c.380G>A        | NT                  |
| c.101T>C        | NT                  |
| c.457G>A        | NT                  |
| c.269insT       | T                   |
| c.247-249delTTC | T                   |
| c.670A>C        | NT                  |
| c.79G>A         | NT                  |

\*T: “truncating” mutacije; NT: “nontruncating” mutacije

Poređenje genotipova ovako svrstanih identifikovanih varijanti sa stepenom oštećenja sluha prikazano je u Tabeli 24 i na Slici 42. Homozigotni genotipovi T/T su kod najvećeg broja pacijenata imali duboko oštećenje sluha (62,86%). U grupi složenih heterozigota je jednako zastupljeno srednje i teško oštećenje sluha. U ispitivanoj grupi heterozigotnih pacijenata sa genotipom T/- jednako su zastupljeni stepeni oštećenja sluha. Kod obolelih heterozigota sa genotipom NT/- najčešće se javlja srednje oštećenje sluha (30%). Nijedan pacijent ove analizirane grupe nema umereno oštećenje sluha. Genotip NT/NT nije detektovan u analiziranom uzorku (Slika 43). Primenom statističke metode Kruskal-Wallis test pokazana je ukupna statistička značajnost, odnosno asocijacija između opisanih genotipova i stepena oštećenja sluha (Tabela 24). U Tabeli 25 su pokazani rezultati poređenja parova svih detektovanih genotipova. Statistički značajna razlika je detektovana poređenjem stepena oštećenja sluha između genotipova T/T sa T/-, kao i između T/T sa T/NT (bez *Bonferroni* korekcije) (Tabela 25).

Tabela 24. Genotipovi podeljeni prema efektu identifikovanih varijanti na koneksin 26 i stepen oštećenja sluha u grupi od 57 pacijenata sa NSAROS

| Genotip                    |      | Stepen oštećenja sluha (broj pacijenata i njihova učestalost u grupi (N°, %)) |            |               |                   |                | Ukupno       |
|----------------------------|------|---|------------|---------------|-------------------|----------------|--------------|
|                            |      | Umereno   | Srednje    | Srednje teško | Teško             | Duboko         |              |
| Homozigoti                 | T/T  | 0<br>(0%)   | 0<br>(0%)  | 3<br>(8,57%)  | 10<br>(28,57%)    | 22<br>(62,86%) | 35<br>(100%) |
| Složeni heterozigoti       | T/NT | 0<br>(0%)   | 1<br>(50%) | 0<br>(0%)     | 1<br>(50%)        | 0<br>(0%)      | 2<br>(100%)  |
| Heterozigoti               | T/-  | 0<br>(0%)   | 3<br>(15%) | 3<br>(15%)    | 2<br>(10%)        | 2<br>(10%)     | 20<br>(100%) |
|                            | NT/- | 0<br>(0%)   | 6<br>(30%) | 1<br>(5%)     | 2<br>(10%)        | 1<br>(5%)      |              |
| <b>Ukupno pacijenata</b>   |      |   |            |               |                   |                | <b>57</b>    |
| <b>Kruskal-Wallis test</b> |      |   |            |               | <b>p&lt;0,001</b> |                |              |



**Slika 43.** Grafički prikaz povezanosti genotipova podeljenih prema efektu identifikovanih varijanti na koneksin 26 sa stepenom oštećenja sluha u grupi od 57 pacijenata sa NSAROS

Tabela 25. Rezultati statističkog poređenja stepena oštećenja sluha među genotipovima u zavisnosti od njihovog efekta

|   | p vrednost | p vrednost (nakon <i>Bonferroni</i> korekcije) |
|---|------------|--|
| <b>Genotip 1: T/NT</b><br><b>Genotip 2: T/-</b> | 0,964      | 1,000  |
| <b>Genotip 1: T/T</b><br><b>Genotip 2: T/-</b>  | <0,001     | <0,001   |
| <b>Genotip 1: T/T</b><br><b>Genotip 2: T/NT</b> | 0,057      | 0,171  |

#### 4.4. Genetičko savetovanje visoko rizičnih porodica - izbor pravilne strategije genetičkog testiranja

Na osnovu preporuka evropskih vodiča dobre prakse (EMQN) (Hoefsloot et al, 2013), kada se klinički postavljena dijagnoza potvrdi na genetičkom nivou (patogena varijanta/varijante identifikovana kod osobe obolele od NSAROS), indikovano je uraditi određivanje statusa nosioca kod bliskih članova porodice. U ovom radu, ukupno je analizirano 160 zdravih osoba (roditelji, braća, sestre, bliski rođaci i njihovi partneri).

##### 4.4.1. Određivanje statusa nosioca u visoko rizičnim porodicama

Skrining na nosioce je urađen kod ukupno 152 roditelja. U zavisnosti od varijante identifikovane kod deteta koje boluje od NSAROS, korišćene su metode direktne detekcije varijanti PCR-ARMS, PCR-RFLP i sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2*. U 74 slučaja rezultati analize su pokazali da su oba roditelja heterozigotni nosioci mutacija koje su detektovane kod deteta. Na taj način je i potvrđena homozigotnost, odnosno složena heterozigotnost kod pacijenata sa bialelskim varijantama. Porodici je objašnjen način nasleđivanja bolesti, dat savet za prenatalnu dijagnostiku i skrining na nosioce bliskih članova porodice. Genotipovi identifikovani kod roditelja su prikazani u Tabeli 26.

U grupi od 78 roditelja nakon primene svih dostupnih metoda mutacije uzročnici bolesti u porodici su ostale neidentifikovane. Porodicama je objašnjen složen način nasleđivanja bolesti, sa naglaskom da bi određivanje statusa nosioca bilo moguće tek kada se utvrdi molekularna osnova bolesti.



Tabela 26. Rezultati potvrđenih statusa nosioca kod roditelja pacijenata obolelih od NSAROS

| Genotip                   | Roditelji |           |
|---------------------------|-----------|-----------|
|                           | Očevi     | majke     |
| c.[35delG];[35=]          | 18        | 21        |
| c.[79G>A];[79=]           | 5         | 4         |
| c.[313 326del];[313 326=] | 1         | 2         |
| c.[269T>C];[269=]         | 1         | 2         |
| c.[269insT];[269=]        | 0         | 1         |
| c.[670A>C];[670=]         | 0         | 1         |
| c.[79G>A];[79=]           | 1         | 0         |
| c.[=];[=]                 | 50        | 45        |
| <b>Ukupno</b>             | <b>76</b> | <b>76</b> |

Određivanje statusa nosioca bliskih rođaka pacijenata sprovedeno je kod tri zdrave osobe. Sva tri pacijenta, čiji su rođaci ispitivani, su bili homozigoti za varijantu c.35delG gena *GJB2*. Rezultati genetičkog testiranja su pokazali da su dva ispitanika (brat i ujak obolelih) bili heterozigotni nosioci porodične mutacije (Tabela 27).

Tabela 27. Rezultati određivanja statusa nosioca kod bliskih rođaka obolelih

| Ispitanici |            | Genotip          | Status                          |
|------------|------------|------------------|---------------------------------|
| 1          | Polusestra | c.[=];[=]        | nije nosilac porodične mutacije |
| 2          | Brat       | c.[35delG];[35=] | heterozigotni nosilac           |
| 3          | Ujak       | c.[35delG];[35=] | heterozigotni nosilac           |

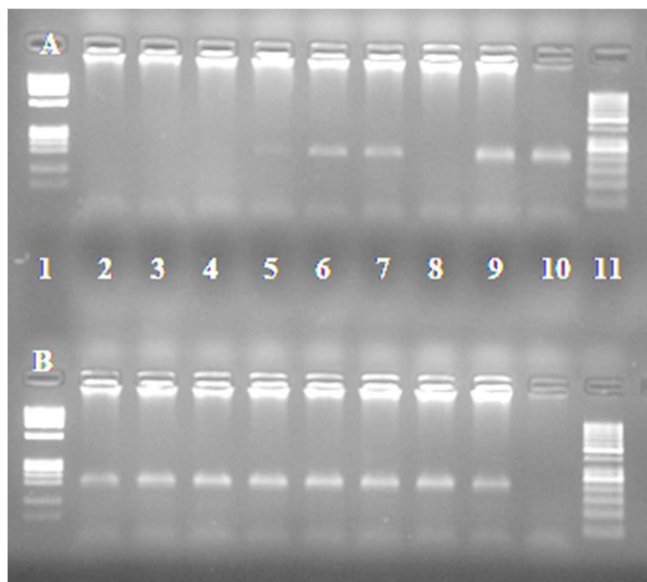
Ista analiza je urađena i kod njihovih partnera, u cilju procene rizika za dobijanje obolelog potomstva. Kod oba ispitivana partnera nije detektovana varijanta c.35delG gena *GJB2*. Primenom Bayesove teoreme (senzitivnost testa 70%, učestalost nosioca u opštoj populaciji 3%) njihov finalni rizik da budu nosioci neke druge patogene varijante u genu *GJB2* je i teoretski smanjen i iznosio je oko 0,9%. U takvim slučajevima nema indikacije za prenatalnu dijagnostiku NSAROS uzrokovanog mutacijama u genu *GJB2*.

#### 4.4.2. Prenatalna dijagnostika NSAROS

S obzirom na autozomno-recesivni način nasleđivanja, roditelji koji su heterozigotni nosioci imaju rizik od 25% da dobiju dete obolelo od NSAROS u svakoj sledećoj trudnoći. Genetičkom savetovalištu IMD-a se zbog prenatalne dijagnostike obratila jedna porodica. Oboleli član ispitivane porodice bio je homozigot za patogenu varijantu c.35delG gena *GJB2*, a roditelji su bili potvrđeni heterozigotni nosioci.

Prenatalna analiza je sprovedena na fetalnom uzorku dobijenom biopsijom horionskih resica (CVS) (engl. *chorionic villus sample*) primenom metode PCR-ARMS za direktnu detekciju varijante c.35delG. Najpre je ispitivana senzitivnost metode na eventualno prisustvo majčinog tkiva u

dobijenom uzorku koje bi moglo da značajno utiče na tačnost rezultata (dobijanje lažno negativnog rezultata heterozigotnog nosioca). Rezultati analize su pokazali da bi PCR-ARMS metodom bilo moguće uočiti maternalnu kontaminaciju ukoliko bi majčino tkivo bilo zastupljeno sa više od 10% u dobijenom uzorku (Slika 44).



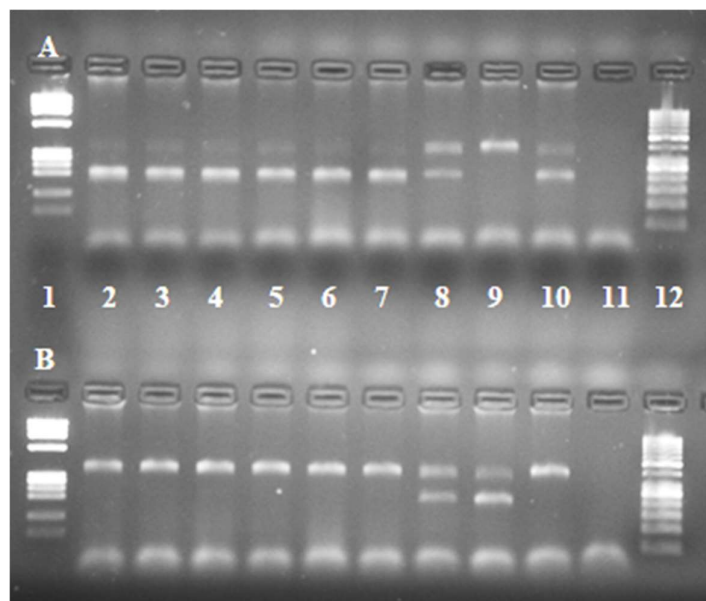
**Slika 44.** PCR-ARMS produkti direktne detekcije varijante c.35delG (dužine 202 bp) prilikom ispitivanja senzitivnosti metode na prisustvo maternalne kontaminacije mešanjem uzoraka (mutirani homozigot/heterozigot); 2% agarozni gel; 85V, 45min.

A. PCR reakcija za detekciju normalnog alela, B. PCR reakcija za detekciju mutiranog alela.

kolona 1: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*); kolona 2: mešani uzorci sa 1% kontaminacije; kolona 3: mešani uzorci sa 2% kontaminacije; kolona 4: mešani uzorci sa 5% kontaminacije; kolona 5: mešani uzorci sa 10% kontaminacije; kolona 6: mešani uzorci sa 20% kontaminacije; kolona 7: mešani uzorci sa 50% kontaminacije; kolona 8: kontrolni uzorak sa homozigotnom delecijom; kolona 9: kontrolni uzorak sa heterozigotnom delecijom; kolona 10: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*); kolona 11: DNK marker (*GeneRuler 1kb DNA ladder*)

Nakon određene senzitivnosti metode, urađena je validacija prenatalne analize, pošto je ovo bila prva prenatalna analiza za detekciju varijante c.35delG u genu *GJB2* koja je urađena u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMD, ujedno i u Srbiji. Promenjena koncentracija fetalne DNK i pronađeni optimalni PCR uslovi omogućili su dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata.

Kada je urađena validacija metode, prenatalna analiza je sprovedena. Rezultat analize je pokazao da fetus nije nosilac varijante c.35delG u genu *GJB2* i samim tim da nema rizik da oboli od NSAROS uzrokovane ovom mutacijom (Slika 45).



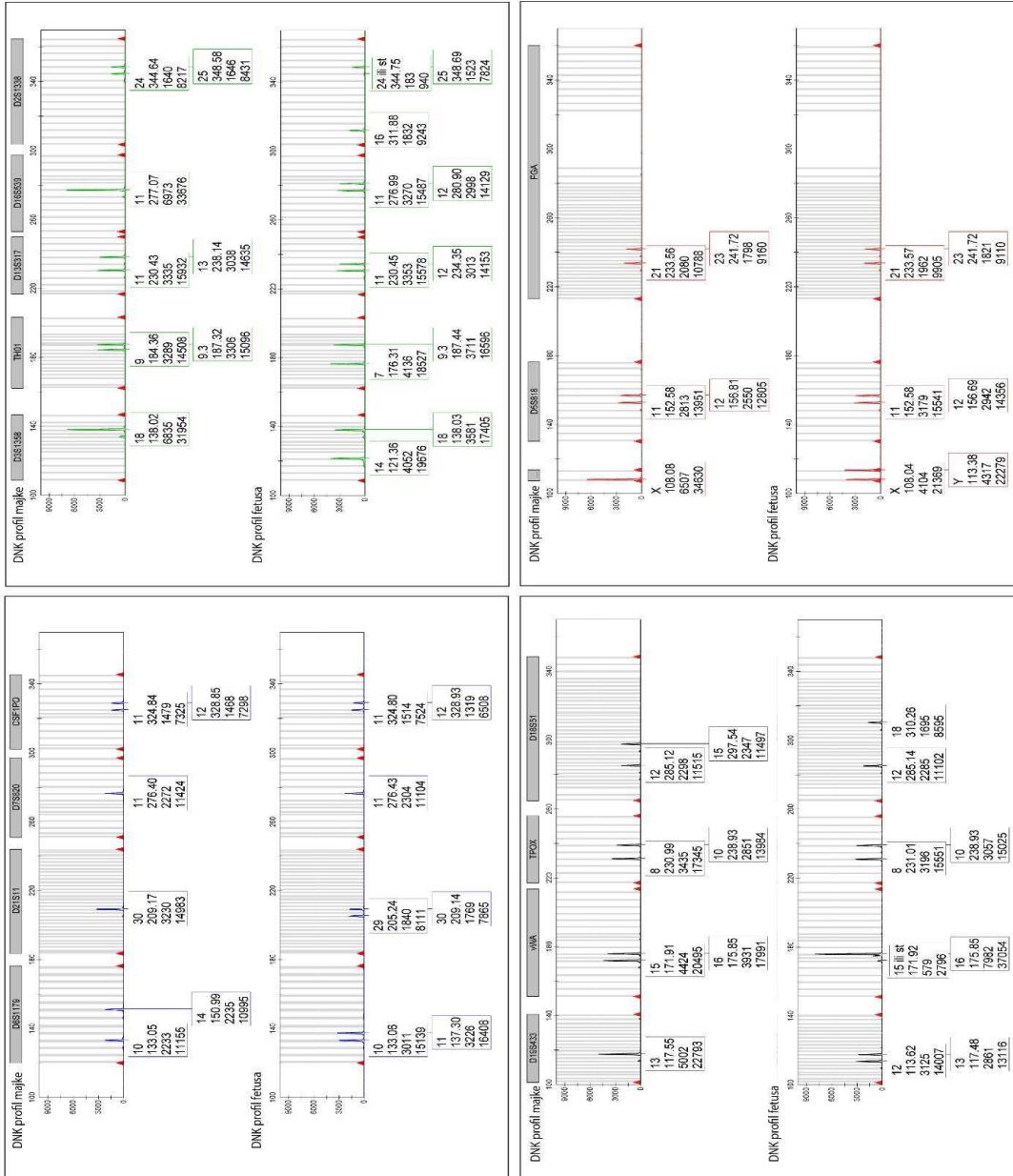
**Slika 45.** PCR-ARMS produkti direktne detekcije varijante c.35delG (dužine 202 bp) sa internom kontrolom (amelogenin, 360 bp) prilikom sprovođenja prenatalne dijagnostike; 2% agarozni gel; 85V, 45min.

A. PCR reakcija za detekciju normalnog alela, B. PCR reakcija za detekciju mutiranog alela.

kolona 1: DNK marker (*ΦX174 DNA-Hae III Digest DNA ladder*); kolone 2,3,4,5,6 i 7: fetalni uzorci u različitim razblaženjima- delecije nije detektovana (engl. *wild type*); kolona 8: kontrolni uzorak sa heterozigotnom delecijom; kolona 9: kontrolni uzorak sa homozigotnom delecijom; kolona 10: kontrolni uzorak bez mutacije (engl. *wild type*); kolona 11 blank - bez uzorka; kolona 12: DNK marker (*GeneRuler 1kb DNA ladder*)

Iako je pokazano da fetus nije nosilac analizirane porodične patogene varijante, eventualno prisustvo maternalne kontaminacije je dodatno isključeno i analizom markera kratkih tandemskih ponovaka (STR) (engl. *short tandem repeat*), poređenjem DNK profila majke i fetusa. Rezultati su pokazali odsustvo maternalne kontaminacije u dobijenom uzorku na osnovu informativnosti šest STR markera (Slika 46).

**Slika 46.** Isključivanje prisustva maternalne kontaminacije u uzorku fetusa analizom STR markera. Elektroferogrami DNK profila majke (gornji red) i fetusa (donji red).



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Identifikacija varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* i određivanje njihove učestalosti kod obolelih od NSAROS u Srbiji

Do sada izučavanje genetičke osnove NSAROS nije rađeno u Srbiji. Važnost izučavanja ovog tipa oštećenja sluha je kako u identifikaciji varijanti, tako i u njihovoj distribuciji i fenotipskoj varijabilnosti u našoj zemlji. Koneksini 26 i 30, kodirani genima *GJB2* i *GJB6*, čija je funkcija u formiranju pukotinastih veza u međucelijskoj komunikaciji predstavljaju dominantne izoforme u kohlei. Najveću ulogu u međucelijskoj komunikaciji u unutrašnjem uvu ima proteinski produkt gena *GJB2*, pa shodno tome mutacije u koneksinu 26 izazivaju oštećenje sluha sa veoma velikom učestalošću u odnosu na druge gene. Ovakva uloga koneksina 26 je osnovni razlog za ispitivanje i identifikaciju varijanti u genu *GJB2*. Mutacije u genu *GJB2* su najčešći uzrok NSAROS u mnogim populacijama širom sveta.

Takođe, pokazano je da ukoliko se ne eksprimira konekson 26, a postoji i deficijencija koneksina 30, doći će do gubitka sluha. Veće parcijalne delecije gena *GJB6* su identifikovane kao druga patogena mutacija sa već poznatom varijantom u genu *GJB2*, kod obolelih od NSAROS. Iz svih pomenutih razloga je rađeno i ispitivanje i detekcija varijanti gena *GJB6*.

#### 5.1.1. Direktna detekcija varijante c.35delG u genu *GJB2*

U ovoj studiji, s obzirom da je prvi put rađena kod obolelih od NSAROS u Srbiji, korišćene su smernice aktuelnog vodiča dobre prakse evropskog udruženja za kontrolu kvaliteta molekularno genetičkih analiza (Hoefsloot i sar, 2013). U skladu sa njim, prva analiza koja je sprovedena na svim pacijentima u ovom radu bila je detekcija varijante c.35delG, s obzirom na njenu visoku učestalost u populaciji belaca. Za direktnu detekciju varijante c.35delG gena *GJB2* kod NSAROS pacijenata korišćena je delimično modifikovana PCR-ARMS metoda opisana ranije (Scott i sar, 1998; Lucotte i sar, 2001). Promene originalnih metoda su podrazumevale modifikacije koncentracija sastojaka smeše i uslova PCR reakcije i omogućile dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata, radi postizanja jasno razdvojenih traka na gelu bez nespecifičnih produkata. Sledeći korak je bila verifikacija metode, korišćenjem kontrolnih uzoraka za koje je već bilo poznato da imaju ovu varijantu u homozigotnom/heterozigotnom obliku, kao i normalnih kontrolnih uzoraka. Pored kontrolnih uzoraka korišćena je i negativna kontrola kako bi se proverila uspešnost PCR reakcije i isključila mogućnost kontaminacije. Ova metoda je jednostavna, racionalna i ekonomična, istovremeno detektuje homozigotne, ali i heterozigotne nosioce varijante c.35delG (Slika 21). Zbog opisanih karakteristika i uspešne verifikacije, metoda je zadovoljila kriterijume potrebne za njenu rutinsku primenu u svakodnevnoj laboratorijskoj dijagnostici.

Varijanta c.35delG (p.Gly12Valfs, ranije poznata pod nazivom Gdel35) predstavlja deleciju jedne baze guanina u nizu od 6 guanina, na nukleotidnoj poziciji 35 egzona 2 gena *GJB2* i ima za posledicu prevremeno formiranje stop kodona na 12. kodonu (Zelante, 1997; Dragomir i sar, 2015). Ova varijanta ima patogeni efekat, pripada tzv. *truncating* mutacijama, jer dovodi do pomeranja okvira čitanja, što rezultuje inaktivacijom proteina, koneksina 26 (Zelante, 1997; Dragomir i sar, 2015). Varijanta c.35delG je identifikovana kao najčešća uzročna varijanta kod obolelih od NSAROS

u populaciji Kavkazijanaca sa učestalošću od 70% patogenih alela (Gasparini i sar, 2000; Lucotte i sar, 2001; Snoeckx i sar, 2005; Tekin i sar, 2010; Battellino i sar, 2011; Hall i sar, 2012; Hoefsloot i sar, 2013). Posmatrajući zemlje Evrope, prema mnogobrojnim objavljenim studijama, postoji jasno ispoljen opadajući gradijent učestalosti varijante c.35delG idući od jugoistoka ka severozapadu, sa najvećom učestalošću u području Mediterana i južne Evrope (Zelante i sar, 1997; Gasparini i sar, 2000; Van Laer i sar, 2001; Medica i sar, 2005; Lucotte i sar, 2007). Smatra se da je ova varijanta nastala negde u području Bliskog Istoka, a da se potom, efektom osnivača, proširila na delove Evrope (Gasparini i sar, 2000; Van Laer i sar, 2001).

U ovom radu, od ukupno 238 analiziranih alela (svih 119 pacijenata sa dijagnozom NSAROS), kod 63 (26,47%) je detektovana varijanta c.35delG (Tabela 14). Ukupna učestalost je u saglasnosti sa prethodno objavljenim učestalostima u uzorcima pacijenata sa istom dijagnozom okolnih zemalja: Hrvatska, Slovenija, Češka, Mađarska, Makedonija, Grčka, Italija (sa učestalostima od 22%-46%) (Toth i sar, 2001; Pampanos i sar, 2002; Medica i sar, 2005; Seeman i sar, 2005; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Cama i sar, 2009; Battellino i sar, 2011). Velika studija sprovedena na 506 pacijenata iz Nemačke pokazala je nešto veću učestalost alela varijante c.35delG od 58,3% od do sada objavljivanih (Burke i sar, 2016). Takođe, postoji veliki broj istraživanja učestalosti ove varijante na američkom području. Studija Pandya i saradnika 2003. godine, istraživala je distribuciju mutacija kod 1 400 NSAROS pacijenata različitog porekla. Rezultati ove studije su pokazale sledeće vrednosti: 25,4% u populaciji belaca, 11,5% u ispitivanoj grupi Meksikanaca, 6,8% kod Afroamerikanaca i 3,7% u grupi pacijenata poreklom iz Azije. Nešto kasnije sprovedena studija na manjem broju pacijenata iz Amerike pokazala je nižu učestalost ispitivane varijante od 9,84%, ali se u njoj ne navode podaci o poreklu pacijenata (Thang i sar, 2006).

Međutim, u mnogim studijama je računata učestalost alela varijante c.35delG samo u grupi pacijenata sa detektovanim mutacijama. U Tabeli 28 su predstavljene učestalosti alela u grupi pacijenata sa kompletno identifikovanim genotipom, u različitim zemljama Evrope. Upoređivanjem dobijenih učestalosti vidi se i opadajući gradijent od juga ka severu.

Tabela 28. Učestalosti alela varijante c.35delG u grupama pacijenata sa identifikovanim varijantama u različitim populacijama

| Populacija              | Studija               | Učestalost alela u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama (%) |
|-------------------------|-----------------------|---|
| Grčka                   | Pampanos i sar, 2002  | 95,2  |
| Italija                 | Rabionet i sar, 2000  | 88,0  |
| Kipar                   | Neocleous i sar, 2014 | 81,7  |
| Austrija                | Janecke i sar, 2002   | 76,9  |
| Multinacionalna studija | Snoeckx i sar, 2005   | 72,44   |
| Francuska               | Marlin i sar, 2005    | 69,0  |
| Litvanija               | Mikstiene i sar, 2016 | 64,7  |
| Španija                 | Rabionet i sar, 2000  | 55,0  |

Ukoliko bi se na ovakav način računala učestalost alela u ovoj studiji, prema podacima iz Tabele 16 ta učestalost bi iznosila 74,32% (54/74 alela). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa prethodno objavljenim učestalostima, posebno ukoliko se razmatra geografski položaj Srbije i poredi sa lokacijama ostalih populacija navedenih u Tabeli 28.

Poznavanje učestalosti varijante c.35delG kod obolelih u određenoj populaciji je od izuzetnog značaja jer je nosi najveći broj ispitivanih pacijenata kod kojih je detektovana varijanta ispitivanih gena *GJB2* i *GJB6*. To je pokazano i rezultatima ovog rada, koji je prva studija u našoj populaciji koja ispituje učestalost varijanti u genima *GJB2* i *GJB6* lokusa DFNB1 kod obolelih od NSAROS. Samim tim opravdana je rutinska primena molekularno genetičkih metoda za direktnu detekciju varijante c.35delG (kao prvog koraka), kod svakog pacijenta obolelog od NSAROS. Senzitivnost metode bi iznosila ~26% i omogućila bi da petina rizičnih porodica već u startu bude potpuno informativna za prenatalnu dijagnostiku.

### 5.1.2. Direktna detekcija varijante c.71G>A u genu *GJB2*

Nakon detekcije varijante c.35delG, svim pacijentima koji nisu bili homozigoti za ovu varijantu ili su bili heterozigotni nosioci (identifikovani samo na jednom alelu) je rađen skrining na varijantu c.71G>A u genu *GJB2*. Direktna detekcija omogućena je primenom PCR-ARMS metode prema delimično modifikovanoj metodi Scotta i saradnika (Scott i sar, 1998). Ova metoda istovremeno detektuje homozigotne, ali i heterozigotne nosioce. Modifikacije su podrazumevale promene koncentracija sastojaka smeše i uslova PCR reakcija kako bi se omogućilo dobijanje

adekvatnih koncentracija PCR produkata. Kao i prethodna i ova metoda je uspešno verifikovana upotrebom kontrolnih uzoraka (poznatih homozigotnih i heterozigotnih nosioca, kao i uzoraka bez varijante) i negativne kontrole (Slika 23).

Varijanta c.71G>A (p.Trp24Ter, stari naziv W24Ter) detektovana je prvi put u studiji Kelsell i saradnika (1997). Ova varijanta je mutacija bez smisla koja dovodi do zamene baza (G u A) u 71. poziciji nukleotida u kodirajućem regionu gena *GJB2*, što rezultuje prevremenim formiranjem stop kodona tokom sinteze koneksina 26 (Kelsell i sar, 1997; Dragomir i sar, 2015). Pripada tzv. *truncating* mutacijama sa patogenim efektom, jer kada se javi u homozigotnom obliku ne dolazi do sinteze funkcionalnog koneksina 26. Najveća učestalost varijante c.71G>A je pokazana kod pacijenata u zemljama južne Azije (Indija, Pakistan i Bangladeš) i iznosi od 40-67,2% (Kelsell i sar, 1997; Kudo i sar, 2000; Maheshwari i sar, 2003; Bouwer i sar, 2007; Hashemzadeh Chaleshtori i sar, 2008; Tsukada i sar, 2015). Smatra se da je u populaciji Indije sa preračunatim vremenom nastanka od pre 7 880 godina i da se njena učestalost povećala kao posledica efekta osnivača (RamShankar i sar, 2003; Joseph i sar, 2009). Ova varijanta se javlja sa srednjom učestalošću u zemljama Evrope, ali nije detektovana u afričkim populacijama, niti u populacijama istočne Azije (Tsukada i sar, 2015). U evropskim zemljama je najčešće identifikovana u porodicama Roma iz Slovačke (Minarik i sar, 2003) i Španije (Alvarez i sar, 2005).

U analiziranom uzorku od 238 alela (119 pacijenata) u ovoj studiji, varijanta c.71G>A je detektovana kod pet pacijenata (kod tri pacijenta u homozigotnom obliku, dok su preostala dva bili složeni heterozigoti) sa ukupnom učestalošću od 3,36% (8/238 ispitivanih alela) (Tabela 14). Ova patogena varijanta je detektovana i u susednim zemljama, u kojima njena učestalost među obolelim dosta varira (Tabela 29) (Minarik i sar, 2003; Toth i sar, 2004; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Lazar i sar, 2010; Dragomir i sar, 2015; Burke i sar, 2016). Pošto je ova mutacija najčešće detektovana u porodicama Roma, smatra se da se njeno javljanje u Evropi može pripisati migraciji Roma iz južne Azije (Sukarova Stefanovska i sar, 2009).

Tabela 29. Učestalosti alela varijante c.71G>A kod obolelih u različitim zemljama

| Populacija | Studija                                   | Učestalost alela varijante c.71G>A (%) |
|------------|---|--|
| Slovačka   | Minarik i sar, 2003                       | 23,2                                   |
| Makedonija | Sukarova Stefanovska i sar, 2009          | 6,1                                    |
| Rumunija   | Dragomir i sar, 2015<br>Lazar i sar, 2010 | 5,3                                    |
| Mađarska   | Toth i sar, 2004                          | 4,3                                    |
| Nemačka    | Burke i sar, 2016                         | 2,7                                    |

Podaci o učestalosti alela c.71G>A su u nekim objavljenim istraživanjima predstavljeni procentualno na osnovu učestalosti varijanti samo u grupi pacijenata kod kojih su detektovane varijante DFNB1 lokusa. U velikoj multinacionalnoj studiji iz 2005. godine učestalost ove varijante preračunata na takav način je iznosila 1,53% (Snoeckx i sar, 2005), dok je u studiji sprovedenoj na populaciji Austrije iznosila 7,7% (Frei i sar, 2002). Učestalost varijante c.71G>A u analiziranoj grupi pacijenata ove studije u tom slučaju bi iznosila 10,81% (8/74 alela) (prema podacima iz Tabele 16), što je nešto više u odnosu na rezultate pomenutih studija i opravdava direktnu detekciju i ove mutacije u rutinskoj kliničkoj dijagnostici.



### 5.1.3. Direktna detekcija varijante c.101T>C u genu *GJB2*

Svim pacijentima koji nisu imali varijantu c.35delG na jednom ili oba alela, dalje je rađena direktna detekcija i varijante c.101T>C gena *GJB2* pomoću PCR-RFLP metode na osnovu prisustva/odsustva specifičnog mesta sečenja restrikcionog enzima BclI. Korišćena je delimično modifikovana PCR-RFLP metoda opisana ranije (Perea i sar, 2007; Al Achkar i sar, 2011). Kao i prethodno pomenute metode, i ova metoda je uspešno verifikovana upotrebom poznatih kontrolnih uzoraka (heterozigotnih nosioca i uzoraka koji nisu nosioci) i negativne kontrole (Slika 25).

Varijanta c.101T>C (p.Met34Thr, stari naziv M34T) predstavlja varijantu promenjenog smisla zamene baza (T u C) na nukleotidnoj poziciji 101 u egzonu 2 gena *GJB2*, što dovodi do zamene aminokiseline metionina sa treoninom na poziciji 34. aminokiseline u polipeptidnom lancu koneksina 26 (Coco i sar, 2013). Većina autora ispitivanu varijantu c.101T>C klasifikuje prema svom efektu kao kontroverznu, bez još uvek jasne interpretacije (Hoefsloot i sar, 2013). Najpre je varijanta c.101T>C gena *GJB2* klasifikovana kao autozomno-dominantna mutacija (Kelsell i sar, 1997; Griffith i sar, 2000; Thonissen i sar, 2002). Nakon toga, prema različitim autorima, ova varijanta je klasifikovana kao recesivna ili dominantna uzročna mutacija, ali kasnije sprovedene studije pokazuju da se ova varijanta najverovatnije može opisati kao hipomorfni recesivni alel (Kelsell i sar, 1997; Scott i sar 1998; Wilcox i sar, 2000; Griffith, 2001; Griffith i Friedman, 2002; Kupka i sar, 2002; Zoll i sar, 2003; Feldmann i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005; de Castro i sar, 2013; Hoefsloot i sar, 2013). Dodatna potvrda da se varijanta c.101T>C može klasifikovati kao hipomorfni recesivni alel jeste i visoka učestalost nosioca ove varijante u populaciji belaca (Hoefsloot et al, 2013). Ukoliko se detektuje u homozigotnom obliku ili kod složenih heterozigota kod pacijenata sa umerenim oštećenjem sluha, onda se smatra da je ova varijanta uzrok oštećenja sluha; međutim, ukoliko je stepen oštećenja sluha mnogo teži (duboko oštećenje sluha), ova varijanta se ne može smatrati uzrokom (Roux i sar, 2004; Hall i sar, 2012; Löppönen i sar, 2012; de Castro i sar, 2013; Hoefsloot i sar, 2013). Prema vodiču dobre prakse Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku/Asocijacije za molekularnu patologiju, efekat ispitivane varijante se klasifikuje u patogene sa nepotpunom penetrabilnošću (Oza i sar, 2018). Interpretacija i promena klasifikacije efekta varijante c.101T>C je zasnovana na rezultatima statističkih i funkcionalnih analiza u najnovijim studijama rađenim pomoću panela za oštećenje sluha (Shen i sar, 2019). Međutim, ove studije su takođe pokazale da ukoliko se ispitivana varijanta detektuje u homozigotnom obliku i/ili kod složenih heterozigota, stepen oštećenja sluha je najčešće umeren. Ovo je glavni razlog zašto veliki broj autora i dalje varijantu c.101T>C opisuje kao kontroverznu, odnosno kao hipomorfni recesivni alel.

U analiziranom uzorku obolelih od NSAROS ove studije, varijanta c.101T>C je identifikovana kod dva pacijenta u heterozigotnom obliku, sa ukupnom učestalošću alela od 0,84% (2/238) (Tabela 14). Dostupni podaci u literaturi o učestalosti ove varijante veoma variraju. U velikoj studiji sprovedenoj na nemačkoj populaciji dobijen je visok procenat ove varijante (5,3%) (Burke i sar, 2016). Međutim, istraživanja američkih populacija, pokazuju dosta manju učestalost od 1,05-1,56% što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije (Pandya i sar, 2003; Thang i sar, 2006).

Za upoređivanje učestalosti c.101T>C hipomorfno recesivnog alela u ovom radu i dostupnih studija (iz Litvanije i jedne multinacionalne studije), bilo je neophodno preračunati učestalost samo u grupi pacijenata sa detektovanim mutacijama. Prema podacima iz Tabele 16, ovako preračunata učestalost varijante c.101T>C iznosi 2,70% (2/74 alela). Rezultati studije iz Litvanije pokazuju učestalost ove varijante od 2,3% (Mikstiene i sar, 2016), što je gotovo isti rezultat dobijen kao u ovoj studiji. Rezultati multinacionalne studije iz 2005. Godine (Snoeckx i sar) pokazuju učestalost od 4,01%, koja je nešto viša od učestalosti dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji.

#### 5.1.4. Sekvenciranje egzona 2 gena *GJB2*

Sledeća genetička analiza, sekvenciranje kodirajućeg regiona, egzona 2, gena *GJB2*, sprovedena je na uzorku od 97 pacijenata. Ovu grupu pacijenata činili su svi oni kod kojih je varijanta c.35delG detektovana u heterozigotnom obliku (19 obolelih) i pacijenti kod kojih ova varijanta nije detektovana (78 obolelih). Izbor metode sekvenciranja egzona 2 je takođe bio prema preporukama evropskih vodiča dobre prakse (EMQN), jer se ~95% do danas identifikovanih mutacija lokusa DFNB1 uzročnika NSAROS nalazi upravo u ovom regionu gena *GJB2* (Hoefsloot i sar, 2013). Rezultati sekvenciranja su potvrdili već identifikovane varijante c.71G>A i c.101T>C, detektovane ranije opisanim metodama (Slika 23, Slika 25). Takođe, kod 19 heterozigotnih nosioca varijante c.35delG potvrđeno je prisustvo ove varijante i sekvenciranjem je otkrivena druga uzročna varijanta kod 10 pacijenata. Pored toga, ovom metodom je otkriveno još 8 različitih varijanti gena *GJB2*.

Varijanta c.313\_326del (p.Lys105Glyfs, stari naziv 313del14) predstavlja deleciju 14 bp počevši od pozicije nukleotida 313 u egzonu 2 gena *GJB2* i dovodi po formiranja stop kodona na poziciji 110. kodona prilikom sinteze koneksina 26 (Kupka i sar, 2002). Ova varijanta dovodi do pomeranja okvira čitanja i ima patogeni efekat. Pokazano je da ova delecija eliminiše glavne funkcionalne domene koneksina 26 (dva transmembranska, jedan ekstracelularni (E2) i C-terminus) i pretpostavlja se da oštećuje topologiju ovih polipeptida (Kelley i sar, 1998).

Ova delecija je prvi put identifikovana 90-tih godina, a potom je i detektovana u više studija (Denoyelle i sar, 1997; Kelley i sar, 1998; Denoyelle i sar, 1999). Delecija c.313\_326del je identifikovana i u pojedinim populacijama centralne i istočne Evrope: Austrija, Poljska, Mađarska, Nemačka (Gabriel i sar, 2001; Loffler i sar, 2001; Toth i sar, 2001; Wiszniewski i sar, 2001; Frei i sar, 2002; Janecke i sar, 2002). Nažalost, u ovim studijama precizna učestalost c.313\_326del nije prikazana. Učestalost je izračunata samo u studiji Burke i saradnika (2016), na uzorku pacijenata iz populacije Nemačke i iznosi 2,7%.

U ovom radu, u analiziranom uzorku od 119 pacijenata obolelih od NSAROS identifikovana je kod 9 alela sa ukupnom učestalošću od 3,78% (9/238) (Tabela 14, Slika 27), što je u saglasnosti sa rezultatima pomenute studije iz Nemačke (Burke i sar, 2016).

Kao i kod prethodno opisanih varijanti, neke studije su računale učestalost varijante samo u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama. U Tabeli 30 su predstavljene tako izračunate učestalosti varijante c.313\_326del publikovane u tri različite studije (Marlin i sar, 2005; Snoeckx i sar, 2005; Mikstiene i sar, 2016).

Tabela 30. Učestalosti alela varijante c.313\_326del u različitim populacijama u grupi pacijenata sa identifikovanim varijantama

| Populacija              | Studija               | Učestalost alela u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama (%) |
|-------------------------|-----------------------|---|
| Litvanija               | Mikstiene i sar, 2016 | 28,3  |
| Francuska               | Marlin i sar, 2005    | 2,9   |
| Multinacionalna studija | Snoeckx i sar, 2005   | 1,70  |

Ukoliko bi se na taj način preračunala učestalost ispitivane delecije u našem ispitivanom uzorku, prema podacima iz Tabele 18, njena učestalost bi iznosila 12,16% (9/74 alela). Ovako

dobijena učestalost je nešto niža od vrednosti iz studije iz Litvanije, a dosta veća od ispitivanih u multinacionalnoj studiji i studiji francuske populacije (Tabela 30).

Varijanta c.269T>C (p.Leu90Pro, stari naziv L90P) predstavlja varijantu promenjenog smisla, substitucije baza (T u C) na 269. nukleotidnoj poziciji, što dovodi do zamene aminokiseline, leucina prolinom, u kodonu 90 polipeptidnog lanca koneksina 26 (Loffler i sar, 2001). Ova varijanta utiče na transmembranski domen koneksina 26 i većina autora je povezuje sa uzročnom mutacijom kod obolelih od autozomno-recesivnog oštećenja sluha (Rabionet i sar, 2000; Kupka i sar, 2002). Smatra se da je ova varijanta nastala u centralnoj Evropi i da se njena učestalost povećala efektom osnivača (Janecke i sar, 2002).

Učestalost ove varijante varira među obolelim različitim populacija. U Tabeli 31 su predstavljene učestalosti varijante c.269T>C pokazane u tri studije (Pandya i sar, 2003; Thang i sar, 2006; Burke i sar, 2016).

Tabela 31. Učestalost varijante c.269T>C u grupama pacijenata sa identifikovanim varijantama u populacijama Nemačke i Amerike

| Populacija                        | Studija            | Učestalost varijante c.269T>C u grupi pacijenata (%) |
|-----------------------------------|--------------------|--|
| Nemačka                           | Burke i sar, 2016  | 1,6  |
| Amerika                           | Thang i sar, 2006  | 0,6  |
| Južna Amerika (populacija belaca) | Pandya i sar, 2003 | 0,29   |

U analiziranom uzorku u ovoj studiji, varijanta c.269T>C je identifikovana kod 3 alela (3/119) sa ukupnom učestalošću od 1,26% (Tabela 14, Slika 28). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa dobijenom učestalošću studije sprovedene na uzorku obolelih nemačke populacije, što je i bilo očekivano, zbog geografskog položaja Srbije i Nemačke.

Prema podacima mnogobrojnih studija koje su u svojim istraživanjima detektovale pomenutu varijantu, učestalost je predstavljena samo u grupi pacijenata kod kojih je detektovana bilo koja NSAROS uzročna varijanta (Tabela 32).

Tabela 32. Učestalosti alela varijante c.269T>C u različitim populacijama u grupi pacijenata sa identifikovanim varijantama

| Populacija              | Studija               | Učestalost alela u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama (%) |
|-------------------------|-----------------------|---|
| Austrija                | Loffler i sar, 2001   | 16,7  |
|                         | Janecke i sar, 2002   | 9,8   |
|                         | Frei i sar, 2002      | 3,8   |
| Australija              | Wilcox i sar, 2000    | 10  |
| Francuska               | Marlin i sar, 2005    | 2,6   |
| Litvanija               | Mikstiene i sar, 2016 | 2,3   |
| Multinacionalna studija | Snoeckx i sar, 2005   | 1,86  |

Kada se prema podacima iz Tabele 18 u uzorku od 119 obolelih od NSAROS izračuna učestalost alela varijante c.269T>C samo u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama (na isti način kao u Tabeli 32), dobija se učestalost od 4,05% (3/74 alela). Ovako dobijena vrednost je u saglasnosti sa gore opisanim učestalostima. U populacijama Mediterana opseg učestalosti alela varijante c.269T>C ide od 0,7%-4%, što su približne vrednosti u odnosu na dobijenu u ovoj studiji (Estivill i sar, 1998; Denoyelle i sar, 1999; Murgia i sar, 1999; Rabionet i sar, 2000). U nekim populacijama, poput Japana, ova varijanta nije detektovana (Rabionet i sar, 2000).

Varijanta c.380G>A (p.Arg127His, stari naziv R127H) egzona 2 gena *GJB2* predstavlja varijantu promenjenog smisla, baznu zamenu (G u A) na poziciji nukleotida 380, što u kodonu 127 koneksina 26 dovodi do zamene aminokiseline arginina histidinom (Rabionet i sar, 2000). Efekat ove varijante je kontroverzan. Ranije publikovane studije su varijantu c.380G>A označavale kao nepatogenu (Estivill i sar, 1998; Rabionet i sar, 2000). Prema literaturnim podacima, neki od autora ovu varijantu smatraju polimorfizmom jer funkcionalnim analizama nije pokazan nikakav efekat varijante c.380G>A na funkciju koneksina 26. Takođe, smatra se polimorfizmom zato što je u nekim populacijama detektovana visoka učestalost nosioca (Thonnissen i sar, 2002; Minarik i sar, 2003; RamShankar i sar, 2003; Wang i sar, 2003; Roux i sar, 2004; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Dragomir i sar, 2015). Međutim, podaci drugih sprovedenih funkcionalnih studija, ukazuju da varijanta c.380G>A ipak može da utiče na funkciju koneksina 26, na različitim nivoima ekspresije (Estivill i sar, 1998; D'Andrea i sar, 2002; Wang i sar, 2003; Toth i sar, 2004; Palmada i sar, 2006).

Ispitivana varijanta c.380G>A je detektovana u mnogim studijama obolelih različitih populacija Evrope i Amerike (Janecke i sar, 2002; Pandya i sar, 2003; Snoeckx i sar, 2005; Thang i sar, 2006; Dragomir i sar, 2015; Burke i sar, 2016). U najvećem broju studija nije naznačena precizna učestalost ove varijante – dostupni podaci su pokazani u Tabeli 33.

Tabela 33. Učestalost varijante c.380G>A u grupama pacijenata sa identifikovanim varijantama u populacijama Evrope i Amerike

| Populacija                        | Studija             | Učestalost varijante c.380G>A u grupi pacijenata (%) |
|-----------------------------------|---------------------|--|
| Nemačka                           | Burke i sar, 2016   | 4,3  |
| Amerika                           | Thang i sar, 2006   | 0,6  |
| Južna Amerika (populacija belaca) | Pandiyai sar, 2003  | 0,1  |
| Multinacionalna studija           | Snoeckx i sar, 2005 | 0,07   |

U analiziranom uzorku obolelih od NSAROS u ovom radu, varijanta c.380G>A je detektovana kod ukupno kod 3 alela, sa učestalošću od 1,26% (3/238), što je u saglasnosti sa dostupnim podacima iz literature (Tabela 14, Slika 29).

Varijanta c.457G>A (p.Val153Ile, raniji naziv V153I) predstavlja varijantu promenjenog smisla supstitucije nukleotida (G u A) na 457 poziciji kodirajućeg egzona 2 gena *GJB2*. Ova supstitucija rezultuje u zameni aminokiselina valina izoleucinom u kodonu 153 koneksina 26 i smatra se polimorfizmom.

Identifikovan je u mnogim studijama kod obolelih u populacijama Evrope, Azije i Amerike (Frei i sar, 2002; Snoeckx i sar, 2005; Thang i sar, 2006; Hashemi i sar, 2012; Burke i sar, 2016) (Tabela 34).

Tabela 34. Učestalost varijante c.457G>A kod obolelih u različitim populacijama

| Populacija               | Studija             | Učestalost varijante c.457G>A kod obolelih (%) |
|--------------------------|---------------------|--|
| Nemačka                  | Burke i sar, 2016   | 4,3  |
| Austrija*                | Frei i sar, 2002    | 3,8  |
| Multinacionalna studija* | Snoeckx i sar, 2005 | 0,16   |
| Amerika                  | Thang i sar, 2006   | 0,1  |
| Iran                     | Hashemi i sar, 2012 | 0,03   |

\*Navedene studije su računale učestalost polimorfizma u grupi ispitanika sa detektovanim varijantama DFNB1 lokusa

U analiziranom uzorku od 119 obolelih od NSAROS u ovom radu, varijanta c.457G>A je detektovana kod 2 alela, sa ukupnom učestalošću od 0,84% (2/238) (Tabela 14, Slika 30), što je u saglasnosti sa studijama iz Irana i Amerike, a niža u odnosu na veliku studiju sprovedenu na nemačkoj populaciji. Da bi se uporedila učestalost sa multinacionalnom studijom, kao i studijom iz Austrije, neophodno je bilo preračunati učestalost alela samo u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama. Prema podacima iz Tabele 16 to je grupa od 74 alela, tako da ovako preračunata učestalost c.457G>A polimorfizma iznosi 2,70% (2/74 alela), što je približno vrednosti opisanoj u populaciji Austrije, 2002. godine (Tabela 34).

Varijanta c.269insT (p.Val91fs) predstavlja inserciju timina na poziciji nukleotida 269 egzona 2 gena *GJB2* (Denoyelle i sar, 1999). Ova varijanta dovodi do pomeranja okvira čitanja. Prema svom

efektu na protein, klasifikuje se u grupu tzv. *truncating* mutacija, jer dovodi do prevremenog zaustavljanja translacije koneksina 26. Zbog prisustva ove varijante, poslednjih 136 aminokiselina se ne ugrađuje u polipeptidni lanac, što rezultuje ili formiranjem skraćenog proteina ili ne dolazi uopšte do sinteze proteina (Pandya i sar, 2003; Snoeckx i sar, 2005; Gravina i sar, 2010). Prema novijoj klasifikaciji ova patogena varijanta se obeležava kao c.269dupT (p.Val91SerfsX11). Ipak, u većini publikacija se i dalje koristi stari naziv jer se smatra da je ova varijanta insercija, a ne duplikacija jednog baznog para, kao što je opisano u novoj klasifikaciji.

Prvi put je opisana u studiji Denoyelle i saradnika (1999). U literaturi nema puno podataka o učestalosti ove mutacije - u Tabeli 35 su predstavljene dobijene vrednosti kod pacijenata u nekim populacijama (Pandya i sar, 2003; Snoeckx i sar, 2005; Marlin i sar, 2005).

Tabela 35. Učestalost varijante c.269insT kod obolelih u različitim populacijama

| Populacija                        | Studija             | Učestalost varijante c.269insT kod obolelih (%) |
|-----------------------------------|---------------------|---|
| Južna Amerika (populacija belaca) | Pandya i sar, 2003  | 0,29  |
| Multinacionalna studija*          | Snoeckx i sar, 2005 | 0,23  |
| Francuska*                        | Marlin i sar, 2005  | 0,2   |

\*U navedenim studijama je računata učestalost polimorfizma u grupi ispitanika sa detektovanim varijantama DFNB1 lokusa

U analiziranoj grupi od 119 pacijenata u ovoj studiji, identifikovana je kod samo jednog pacijenta sa ukupnom učestalošću alela od 0,42% (1/238) (Tabela 14, Slika 31), što je u saglasnosti sa pokazanom učestalošću u populaciji belaca na području južne Amerike. Kada se učestalost ove varijante preračuna po uzoru na multinacionalnu studiju i studiju iz Francuske, samo u grupi pacijenata sa detektovanim varijantama, ona iznosi 1,35% (1/74 alela) (Tabela 16), što je nešto više od opisivanih (Tabela 35).

Varijanta c.247-249delTTC (p.Phe83del) predstavlja deleciju tri nukleotida (TTC) u nukleotidnoj poziciji 247 do 249 egzona 2 gena *GJB2*, što dovodi do pomeranja okvira čitanja, i delecije aminokiseline fenilalanin na poziciji 83 proteinskog produkta, koneksina 26 (Petersen i sar, 2012). Jedini dostupni podaci u literaturi o ovoj deleciji su da je prvi put identifikovana u jednoj grčkoj porodici, kod dva člana obolela od NSAROS i pretpostavlja se da je njen efekat patogen (Petersen i sar, 2012).

Varijanta c.247-249delTTC je u ovoj studiji detektovana kod jednog pacijenta u heterozigotnom obliku, tj. u jednom alelu sa učestalošću 0,42% (1/238) (Tabela 14, Slika 32). Upoređivanje dobijene učestalosti je moguće samo sa podacima iz jednog rada, pa se može zaključiti da se najverovatnije radi o retkoj, familijarnoj varijanti.

Varijanta c.670A>C (p.Lys224Gln, stari naziv K224Q) predstavlja supstituciju baza (A u C) u 670. nukleotidu, koja dovodi do zamene aminokiselina lizina glutaminom u koneksinu 26 na aminokiselinskoj poziciji 224 (Antoniadi i sar, 2000). Ova varijanta pripada *missense* varijantama, sa još uvek nedefinisanim (nepoznatim) efektom. Smatra se da ima efekat na C terminus koneksina 26 i to na pH vrednost u kanalima pukotinastih veza. Detektovana je prvi put u sporadičnom slučaju u jednoj grčkoj porodici, gde otac koji je nosilac ove varijante nema oštećenje sluha (Antoniadi i sar, 2000). S obzirom na ovaj podatak, smatra se da nema patogeni efekat. Ova varijanta je identifikovana i u velikoj studiji sprovedenoj na pacijentima iz južne Amerike sa različitim poreklom, sa učestalošću od 0,1% (Pandya et al, 2003).

U analiziranoj grupi pacijenata u ovom radu, detektovana je na jednom alelu (1/238), sa ukupnom učestalošću od 0,42% (Tabela 14, Slika 33). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa dobijenim vrednostima iz prethodno pomenutih studija (Pandya i sar, 2003).

Varijanta c.79G>A (p.Val27Ile, stari naziv V27I) predstavlja supstituciju baza (G u A) na poziciji 79. nukleotida, što rezultuje zamenom aminokiseline valina izoleucinom u 27. kodonu koneksina 26. (Kelley i sar, 1998). Ova varijanta spada u grupu varijanti promenjenog smisla, a prema njenom efektu se klasifikuje u benigne varijante (polimorfizam). Polimorfizam c.79G>A je vrlo čest u azijskim populacijama (Kelley i sar, 1998; Abe i sar, 2000; Park i sar, 2000; Shi i sar, 2004; Posukh i sar, 2005; Tang i sar, 2006). U nekim studijama je pokazano da se varijanta c.79G>A nasleđuje zajedno sa c.341A>G (p.Glu114Gly, stari naziv E114G) varijantom na istom alelu (Kudo i sar, 2000; Tekin i sar, 2010). Iako je ranijim ispitivanjima i funkcionalnim studijama na model sistemu oocita *Xenopus*-a pokazan patogeni efekat kada se ove dve varijante nalaze na istom alelu, studija sprovedena na mongolskoj populaciji nije potvrdila prethodna ispitivanja pošto je ovaj genotip identifikovan i u kontrolnim uzorcima (Tekin i sar, 2010). Ranije opisani patogeni efekat ove dve varijante je verovatno posledica postojanja dodatne mutacije u regulatornom delu gena *GJB2* (Tekin i sar, 2010).

Varijanta c.79G>A je identifikovana u jednoj studiji pacijenata u populaciji Kine sa prilično visokom učestalošću od 25,1% i u američkoj studiji 5,24% (Zheng i sar, 2015; Thang i sar, 2006). Kao što je već rečeno, ova varijanta je česta i u drugim azijskim populacijama - pored Kine detektovana je i u Japanu i Koreji (Abe i sar, 2000; Park i sar, 2000; Shi i sar, 2004). U studiji koja je proučavala populaciju Brazila detektovana je visoka učestalost ovog alela od 15,58% (de Castro i sar, 2013). Smatra se da je ovako visoka učestalost identifikovanog polimorfizma verovatno zbog povećanog doprinosa američko-indijskih gena u populaciji južnog Brazila (de Castro i sar, 2013).

U analiziranoj grupi ove studije kod obolelih od NSAROS u Srbiji c.79G>A je identifikovana u heterozigotnom obliku kod jednog pacijenta, sa ukupnom alelskom učestalošću od 0,42% (1/238 alela) (Tabela 14, Slika 34). Učestalost dobijena u ovoj studiji je znatno niža u odnosu na dostupne literaturne podatke, što je i očekivano s obzirom na geografski položaj naše zemlje u odnosu na populaciju Azije, kao i različite populacione istorije Srbije i azijskih zemalja.

Nakon primenjenih metoda za direktnu detekciju varijanti kao i sekvenciranja egzona 2 gena *GJB2*, kod ukupno 82 pacijenta nisu detektovane bialelske mutacije (Tabela 15, Tabela 16). Na osnovu već pomenutih preporuka, ovim pacijentima je rađen dalji skrining van kodirajućeg regiona gena *GJB2*, detekcija četiri varijante: c.-23+1G>A, dve parcijalne delecije gena *GJB6* i mitohondrijske varijante m.1555A>G. Od svih do sada detektovanih patogenih varijanti van egzona 2 gena *GJB2*, ove četiri se javljaju sa većom učestalošću u nekim populacijama, najčešće u kombinaciji sa varijantama kodirajućeg regiona gena *GJB2*.

### **5.1.5. Direktna detekcija varijante c.-23+1G>A gena *GJB2***

Direktna detekcija varijante c.-23+1G>A je rađena pomoću PCR-RFLP metode na osnovu prisustva/odsustva specifičnog mesta sečenja restriktionog enzima HphI. Korišćena metoda je originalna metoda odeljenja molekularne genetike, funkcije i terapije, Instituta za neurologiju i genetiku Kipra, Nikozija, Kipar, gde je ova analiza i urađena prema već datom protokolu (Neocleous i sar, 2014). Metoda je uspešno verifikovana upotrebom kontrola (poznati uzorci sa heterozigotnom

varijantom i bez varijante, engl. *wild type*) i negativne kontrole (blank) kojom se proverava uspešnost reakcije (Slika 35).

Varijanta c.-23+1G>A (stari nazivi: IVS1+1G>A i -3170G>A) je prvi put otkrivena i prijavljena u studiji Denoyelle i saradnika (1999). Predstavlja tačkastu *splajs* varijantu nekodirajućeg egzona 1 gena *GJB2* sa patogenim efektom jer dovodi do remećenja jednog od procesa primarnih obrada transkripta (*splajsovanja*), što rezultuje nemogućnošću formiranja informacione RNK (Shanin i sar, 2002).

*Splajs* mutacija nekodirajućeg egzona 1 je identifikovana u velikom broju populacija sa različitim kontinenta: u Aziji (Sibir, Mongolija i Kina), u Africi (Alžir), u SAD-u, u južnoj Americi (u populaciji Brazila) i Evropi (Rumunija, Češka, Mađarska) (Green i sar, 1999; Snoeckx i sar, 2005; Seeman i Sakmaryova, 2006; Toth i sar, 2007; da Silva-Costa i sar, 2009; Mahdieh i sar, 2010; Tekin i sar, 2010; Gandía i sar, 2013; Hoefsloot i sar, 2013, Dragomir i sar, 2015). Nedavno je ustanovljeno da je istočni Sibir region sa najvećom akumulacijom ove mutacije. Zbog veoma velike učestalosti heterozigotnih nosioca c.-23+1G>A varijante u izolovanoj populaciji Jakuta u istočnom Sibiru (11,7%), smatra se da je ovaj region upravo mesto nastanka mutacije, sa procenjenom starošću od 800 godina (Barashkov i sar, 2014; Barashkov i sar, 2014a). Visoka učestalost varijante c.-23+1G>A u Evropi detektovana je u populacijama Češke i Holandije. U Češkoj ova mutacija je druga, a u Holandiji treća po učestalosti varijanti uzročnika NSAROS lokusa DFNB1 (Santos ar, 2005; Seeman i Sakmaryova, 2006).

Zbog visoke učestalosti *splajs* mutacije c.-23+1G>A u populacijama poput Češke i Holandije, koje su na sličnom geografskom položaju kao Srbija, detekcija ove varijante je izabrana u ovom radu. Međutim, na ispitivanom uzorku od 82 pacijenta (svi pacijenti bez identifikovanih bialelskih varijanti), varijanta c.-23+1G>A nije detektovana ni kod jednog pacijenta. Detekcija ove mutacije ne spada u česte procedure prilikom dijagnostike obolelih od NSAROS, pa nije rađena u mnogim susednim zemljama. Prema dostupnim podacima iz literature, ispitivana mutacija takođe nije detektovana ni u većim studijama na populacijama Austrije i Velike Britanije (Gunther i sar, 2003; Hutchin i sar, 2005). Može se zaključiti da ova varijanta nije karakteristična za naš region, i samim tim njena direktna detekcija ne mora biti deo rutinske kliničke dijagnostike.

### 5.1.6. Direktna detekcija delecija u genu *GJB6*

Direktna detekcija dve parcijalne delecije gena *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854), rađena je dvema odvojenim multipleks PCR reakcijama, sa delimično izmenjenim originalnim uslovima (Wu i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005). Modifikacije originalnih metoda su podrazumevale male izmene u koncentraciji sastojaka smeše i uslova PCR reakcije i omogućile dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata. Metode su uspešno verifikovane korišćenjem poznatih kontrolnih uzoraka (uzoraka sa jednom ili drugom delecijom, kao i uzoraka bez delecija, engl. *wild type*) i negativne kontrole (blank) (Slika 36, Slika 37).

Parcijalne delecije gena *GJB6* mogu uzrokovati NSAROS, najčešće kod pacijenata heterozigotnih nosioca neke od uzročnih varijanti u genu *GJB2* prema digenskom načinu nasleđivanja (Pallares-Ruiz i sar, 2002; del Castillo I i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005).

Delecija del(*GJB6*-D13S1830) predstavlja parcijalnu deleciju gena *GJB6* veličine 309 kb sa patogenim efektom. Studije koje su se bavile analizom haplotipova vezanih za ovu 309kb deleciju, pokazale su njeno zajedničko poreklo u populacijama zapadne Evrope, najverovatnije nastalu u područjima južne Španije ili Francuske (del Castillo I i sar, 2003). Sa visokom učestalošću ova delecija je detektovana upravo kod obolelih u populacijama zapadne Evrope, Španije (7,6-9,7%), Velike Britanije (5,9%) i Francuske (5%) (del Castillo I i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005; Marlin



i sar, 2005). Takođe, u populaciji Izraela ova delecija ima veliku učestalost od 6-7,1% (del Castillo I i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005). Nešto niža učestalost (1,4%) uočena je u studijama sprovedenim u južnoj Italiji, Belgiji, SAD-u i Australiji (del Castillo I i sar, 2003; Gualandi i sar, 2004).

Ova delecija nije detektovana u velikom broju studija sprovedenih na sledećim populacijama: Poljske, Turske, Kine, grčkog dela Kipra, jugozapadnog Irana i u nekim delovima Italije (Liu i sar, 2002; Wiszniewska i sar, 2002; del Castillo I i sar, 2003; Tekin i sar, 2003; Uyguner i sar, 2003; del Castillo i sar, 2005; Seeman i sar, 2005; Esmaeilli i sar, 2007; Neocleous i sar, 2014).

U ispitivanom uzorku od 82 obolela od NSAROS u ovom radu, nije identifikovana del(*GJB6*-D13S1830) delecija ni u jednom slučaju. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima već pomenutih populacija. Posebno je važno naznačiti da u studijama populacija suseda Srbije poput Hrvatske, Slovenije i Austrije takođe nije detektovan ni jedan pacijent sa ovom delecijom (Gunther i sar, 2003; Medica i sar, 2005; Battellino i sar, 2011).

Druga ispitivana parcijalna delecija gena *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1854) je veličine 232 kb i zahvata deleciju od introna 2 gena *GJB6* do introna 4 gena *CRYL1*. Prema dostupnim podacima iz literature, jednoj multinacionalnoj sprovedenoj studiji, ova delecija je isključivo detektovana kod pacijenata obolelih od NSAROS sa već poznatom jednom varijantom gena *GJB2* (del Castillo FJ i sar, 2005). Identifikovana je sa najvećom učestalošću u studijama na populaciji Španije (25,5%) (del Castillo I i sar, 2002; del Castillo I i sar, 2003; del Castillo FJ i sar, 2005). Ova delecija je još detektovana i u populaciji Velike Britanije (22,2%), Brazila (6,3%) i Italije (1,9%) (del Castillo FJ i sar, 2005). Kod pacijenata poreklom iz SAD-a, Francuske, Belgije i Australije, del(*GJB6*-D13S1854) nije identifikovana (del Castillo FJ i sar, 2005).

Kod pacijenata analiziranih u ovom radu (82 pacijenta) nije identifikovana ova delecija. Prema podacima studija susednih zemalja, ni jedna od njih se nije bavila identifikacijom del(*GJB6*-D13S1854). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ove dve delecije nisu specifične za naš region i trebalo bi razmotriti opravdanost njihove direktne detekcije kod genetičkog testiranja obolelih od NSAROS u Srbiji.

### 5.1.7. Direktna detekcija mitohondrijske varijante m.1555A>G

Kao poslednji korak, u grupi od 82 obolela od NSAROS (pacijenti bez bialelskih varijanti) urađena je analiza na prisustvo mitohondrijske varijante m.1555A>G gena *MTRNR1* pomoću PCR-RFLP metode i prisustva/odsustva restrikcionog mesta za enzim BsmAI (Neocleous i sar, 2014). Metoda je, kao i sve korišćene metode u ovom radu, uspešno validirana i verifikovana upotrebom poznatih kontrolnih uzoraka (heterozigotnog nosioca varijante i uzorka bez varijante) i negativne kontrole (Slika 38).

Varijanta m.1555A>G (stari naziv A1555G) gena *MTRNR1* predstavlja nukleotidnu zamenu (A u G) na 1555. poziciji mitohondrijske DNK. Gen *MTRNR1* ima ulogu u sintezi RNK manje ribozomske subjedinice, 12sRNK (Kokotas i sar, 2007). Ima patogeni efekat jer značajno smanjuje tačnost translacije u ribozomima, što razultuje promenama u proteinu koji se sintetiše i dovodi do gubitka sluha (Hobble i sar, 2008).

Prema podacima iz literature, mitohondrijska varijanta m.1555A>G je identifikovana kod obolelih od NSAROS u kombinaciji sa mutacijama u genu *GJB2* (Hutchin i Cortopassi, 2000; Kenneson i sar, 2002). Detektovana je u etnički vrlo različitim populacijama poput Azije, Afrike, Japana, Grčke, Velike Britanije, Italije, Španije, Kube i Vijetnama što opravdava njen skrining kod obolelih (Usami i sar, 1998).

U ispitivanoj grupi od 82 pacijenta u ovom radu, ova varijanta nije identifikovana. Zbog odsustva podataka u literaturi o učestalosti ispitivane mitohondrijske varijante, nije moguće uporediti dobijeni rezultat.

## 5.2. Određivanje distribucije detektovanih varijanti i genotipova u genima *GJB2* i *GJB6* kod obolelih od NSAROS u Srbiji

U grupi od 119 pacijenata ukupno je identifikovano 11 različitih varijanti (Tabela 14). Sve detektovane varijante se nalaze u kodirajućem regionu, egzonu 2, gena *GJB2*, što je u saglasnosti sa podacima dobijenim u svetu, jer se varijante gena *GJB2* smatraju najčešćim uzrocima NSAROS (Kellsell i sar, 1997; Hall i sar, 2012; Tsukada i sar, 2015; Zheng i sar, 2015).

U analiziranom uzorku, najveću učestalost je imala varijanta c.35delG - 26,47% (63/238 alela). Ovakva učestalost je bila očekivana i u saglasnosti je sa vrednostima dobijenim u populacijama naših suseda. Nešto je viša od učestalosti kod populacija severo-zapada Evrope, a niža u odnosu na populacije jugo-istoka, što je takođe bilo očekivano, s obzirom na gradijent distribucije ove varijante u Evropi.

Druga po učestalosti ispitivana varijanta je c.313\_326del - 3,78% (9/238 alela). Poput dobijenih rezultata u populacijama Litvanije i Bugarske, ova varijanta predstavlja takođe drugu varijantu po učestalosti, posle c.35delG varijante (Popova i sar, 2012; Mikstiene i sar, 2016). Najčešće je detektovana u zemljama istočne i centralne Evrope, što je u saglasnosti sa dobijenim vrednostima ove studije, s obzirom na geografski položaj Srbije.

U ispitivanom uzorku, treća po učestalosti je varijanta c.71G>A - 3,36% (8/238 alela). Dobijena učestalost je u saglasnosti sa vrednostima populacija bliskih suseda, poput Makedonije, Mađarske i Rumunije (Toth i sar, 2004; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Lazar i sar, 2010; Dragomir i sar, 2015). Ispitivanjem populacije Roma u Slovačkoj, ova varijanta je prva po učestalosti (Minarik i sar, 2003).

Preostalih 8 varijanti detektovanih u ovom radu se javljaju sa učestalošću manjom od 1,5% i zajedno su činile 5,88% alela u uzorku pacijenata iz Srbije. Četiri varijante su detektovane i u pojedinim zemljama našeg regiona: Austrija (c.269T>C, c.380G>A, c.457G>A), Litvanija (c.269T>C, c.101T>C), Nemačka (c.101T>C, c.380G>A, c.457G>A), Rumunija (c.380G>A) (Frei i sar, 2002; Janecke i sar, 2002; Dragomir i sar, 2015; Mikstiene i sar, 2016; Burke i sar, 2016).

Tri varijante su, na osnovu dostupne literature, do sada detektovane samo kod pojedinačnih pacijenata u Grčkoj (c.247-249delTTC i c.670A>C) i Francuskoj (c.269insT) (Antoniadi i sar, 2000; Marlin i sar, 2005; Petersen i sar, 2012).

Varijanta c.79G>A je u ispitivanom uzorku detektovana na jednom alelu. Ova mutacija nije identifikovana u evropskim populacijama, ali je vrlo česta u Aziji (Posukh i sar, 2005; Tang i sar, 2006). Trebalo bi razmotriti poreklo pacijenta kod koga je uočena pomenuta varijanta, kako bi se mogla diskutovati njena detekcija u ovoj studiji, što nam nije bilo dostupno.

Na osnovu broja detektovanih varijanti, može se zaključiti da je molekularna osnova nesindromskog autozomno-recesivnog oštećenja sluha u Srbiji heterogena, slično kao što je uočeno u drugim zemljama Evrope. Dobijeni podaci potvrđuju prisustvo zajedničkih varijanti gena *GJB2* naroda slovenskog porekla iz zemalja centralne i istočne Evrope, kao i uticaj populacija iz Mediterana. Identifikovane su četiri varijante koje pripadaju grupi retkih, familijarnih mutacija, prisutnih samo kod pojedinačnih slučajeva u svetu. Sličnosti sa etnički različitim zemljama mogu se objasniti intenzivnim migracijama i mešovitim brakovima, karakterističnim za zemlje našeg regiona (Minarik i sar, 2003; Toth i sar, 2004).

Primenom opisanih metoda ukupno je identifikovano 39,50% analiziranih alela. Detektovane varijante su formirale 16 različitih genotipova. Od 119 analiziranih pacijenata obolelih od NSAROS, kod 57 su detektovane varijante na jednom ili na oba alela sa ukupnom učestalošću od 47,90%. Bialelske varijante (homozigoti/složeni heterozigoti) su detektovane sa učestalošću od 31,09% (37/119 pacijenata). Kod 20 pacijenata je identifikovana samo jedna varijanta (16,81%). Kod preostala 62 pacijenta (učestalost - 52,10%) nisu identifikovane varijante ni na jednom alelu (Tabela 15, Tabela 16).

U Tabelama 36 i 37 su prikazane učestalosti genotipova dobijene iz studija različitih zemalja.

Tabela 36: Učestalosti genotipova sa identifikovanim varijantama na jednom ili na oba alela kod obolelih u zemljama širom sveta

| Populacija | Studija                          | Broj pacijenata (N <sup>0</sup> ) | Učestalost genotipova sa identifikovanim varijantama (%) |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| Grčka      | Antoniadi i sar, 2000            | 26                                | 61,50  |
| Bugarska   | Popova i sar, 2012               | 51                                | 55,00  |
| Rumunija   | Dragomir i sar, 2015             | 125                               | 53,60  |
| Brazil     | de Castro i sar, 2013            | 77                                | 40,00  |
| Makedonija | Sukarova Stefanovska i sar, 2009 | 33                                | 36,36  |
| Kina       | Zheng i sar, 2015                | 1067                              | 34,96  |
| Hrvatska   | Medica i sar, 2005               | 63                                | 33,30  |
| Slovenija  | Battellino i sar, 2011           | 218                               | 33,00  |
| Iran       | Hashemi i sar, 2012              | 50                                | 30,00  |
| Austrija   | Frei i sar, 2002                 | 57                                | 29,00  |
|            | Loffler i sar, 2001              | 48                                | 26,00  |
|            | Janecke i sar, 2002              | 204                               | 15,20  |
| Kipar      | Neocleous i sar, 2014            | 146                               | 27,40  |
| Nemačka    | Burke i sar, 2016                | 506                               | 23,50  |
|            | Gabriel i sar, 2001              | 134                               | 22,00  |
| Kuvajt     | Al-Sebeih i sar, 2014            | 100                               | 15,00  |

Rezultati učestalosti genotipova sa identifikovanim varijantama lokusa DFNB1 u ispitivanom uzorku u ovom radu (47,90%) su u saglasnosti sa rezultatima studija u zemljama regiona, poput Bugarske, Rumunije, Makedonije, Hrvatske i Slovenije (Medica i sar, 2005; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Battellino i sar, 2011; Popova i sar, 2012; Dragomir i sar, 2015). Ovakva saglasnost je bila očekivana zbog geografske bliskosti koja rezultuje uglavnom migracijama ljudi i postojanju mešovitih brakova među pomenutim populacijama. Studija sprovedena na grčkoj populaciji pokazuje najvišu učestalost, ali je treba uzeti sa rezervom zbog malog broja ispitivanih pacijenata (Antoniadi i sar, 2000).

Tabela 37: Učestalosti genotipova kod pacijenata sa identifikovanim bialelskim varijantama u zemljama širom sveta

| Populacija | Studija                | Broj pacijenata (N <sup>0</sup> ) | Učestalost genotipova sa bialelskim varijantama (%) |   |
|------------|------------------------|-----------------------------------|---|---|
|            |                        |                                   | Homozigoti (% u odnosu na celu studiju)             | Složeni heterozigoti (% u odnosu na celu studiju) |
| Litvanija  | Mikstiene i sar, 2016  | 158                               | 57,50   |   |
| Francuska  | Denoyelle i sar, 1999  | 140                               | ~50,00  |   |
| Rumunija   | Dragomir i sar, 2015   | 125                               | 41,60   | 4,80  |
| Palestina  | Shanin i sar, 2002     | 48                                | 23,00   |   |
| Slovenija  | Battellino i sar, 2011 | 218                               | 26,60   |   |
| Kipar      | Neocleous i sar, 2014  | 146                               | 14,38   | 6,16  |
| Kina       | Zheng i sar, 2015      | 1067                              | 14,34   | 5,91  |
| Nemačka    | Burke i sar, 2016      | 506                               | 9,40  | 5,00  |
| Mongolija  | Tekin i sar, 2010      | 534                               | 4,50  |   |

U analiziranom uzorku u ovom radu, od 119 obolelih od NSAROS kod 31,09% pacijenata su detektovane bialelske varijante. Homozigotni nosioci se javljaju sa učestalošću od 21,85%, a učestalost složenih heterozigota iznosi 9,24% (Tabela 16). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz pojedinih zemalja našeg regiona, poput opisanih u populacijama Rumunije i Slovenije (Battellino i sar, 2011; Dragomir i sar, 2015).

Varijanta c.35delG je najčešći uzrok NSAROS u populaciji Kavkazijanaca, bilo da se javlja u homozigotnom obliku ili kod složenih heterozigota sa drugom mutacijom gena *GJB2* ili *GJB6* (Gasparini i sar, 2000; Hoefsloot i sar, 2013), što je potvrđeno i u najvećem broju već pomenutih evropskih studija.

U ispitivanoj grupi obolelih od NSAROS u ovoj studiji, najveći broj pacijenata je takođe bio homozigotni nosilac c.35delG varijante (22/119 pacijentata) sa učestalošću od 18,49%. Ova varijanta je identifikovana na jednom alelu kod 19 pacijenata, od kojih su 10 (10/119) bili složeni heterozigoti, sa učestalošću od 8,40%. Upoređivanjem ovih rezultata u odnosu na dobijene učestalosti genotipova u susednim zemljama, može se zaključiti da su u saglasnosti, što je i bilo očekivano s obzirom na geografski sličan položaj (Tabela 38) (Toth i sar, 2001; Pampanos i sar, 2002; Medica i sar, 2005; Seeman i sar, 2005; Sukarova Stefanovska i sar, 2009; Battellino i sar, 2011; Dragomir i sar, 2015).

Tabela 38. Učestalosti varijante c.35delG u detektovanim genotipovima kod obolelih u drugim populacijama

| Populacija | Studija                          | Broj pacijenata (N <sup>0</sup> ) | c.35delG homozigotni nosioci (% u odnosu na celu studiju) | c.35delG složeni heterozigoti (% u odnosu na celu studiju) |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Rumunija   | Dragomir i sar, 2015             | 125                               | 36.8  | 4.8  |
| Mađarska   | Toth i sar, 2001                 | 194                               | 35.6  | 12.6   |
| Grčka      | Pampanos i sar, 2002             | 210                               | 30  | 6.2  |
| Češka      | Seeman i sar, 2005               | 156                               | 28.8  | 5.1  |
| Hrvatska   | Medica i sar, 2005               | 63                                | 25.4  | 7.9  |
| Makedonija | Sukarova Stefanovska i sar, 2009 | 33                                | 21.2  | 3  |
| Slovenija  | Battellino i sar, 2011           | 218                               | 21.1  | 10.5   |

### 5.3. Ispitivanje fenotipske varijabilnosti identifikovanih varijanti - asocijacija genotipova sa stepenom oštećenja sluha

#### 5.3.1. Rezultati audioloških ispitivanja

Kod obolelih od NSAROS sa identifikovanim bialelskim varijantama gena *GJB2* je pokazan različit stepen oštećenja sluha koji varira od umerenog do dubokog (Wingard i Zhao, 2015).

U ovom radu, od 119 pacijenata, sa najvećom učestalošću su pacijenti sa teškim i dubokim oštećenjem sluha. Teško oštećenje sluha je detektovano kod 39 pacijenata sa ukupnom učestalošću od 32,77%, dok je kod 41 obolelog, audiološkim analizama pokazano duboko oštećenje sluha (34,45%). Samo kod jednog obolelog je identifikovano umereno oštećenje. Pošto su najveći broj obolelih od NSAROS činili pedijatrijski pacijenti, visoka zastupljenost težih oblika oštećenja sluha je bila i očekivana. Ova učestalost je i potvrđena primenom statističke metode (Fisherovog testa tačne verovatnoće), kojom je pokazano postojanje statističke značajne razlike u zastupljenosti tipova oštećenja sluha u analiziranoj grupi pacijenata ( $P < 0,05$ ) (Tabela 18).

#### 5.3.2. Ispitivanje asocijacije detektovanih genotipova varijante c.35delG sa stepenom oštećenja sluha

Najučestalija varijanta u ovoj studiji, c.35delG, je zastupljena u čak 50% identifikovanih genotipova (8/16 različitih genotipova). Od ukupno 26 homozigota detektovanih u ovom radu, genotip c.[35delG];[35delG] je identifikovan kod čak 22 pacijenta. Od tog broja, 13 pacijenata su bili sa dubokim oštećenjem sluha, 6 sa teškim oštećenjem sluha, dok su tri pacijenta homozigota

c.35delG varijante imala srednje oštećenje sluha. Očigledno je da osobe sa identičnim genotipom imaju blago variranje u stepenu oštećenja sluha. Ova studija nije jedina u kojoj su ovakve razlike uočene. Ispitivanja multinacionalne studije na velikom broju ispitanika poreklom iz različitih zemalja sveta, pokazala su varijacije u stepenu oštećenja sluha kod pacijenata sa istim genotipom (Snoeckx i sar, 2005). Funkcionalne studije su objasnile ovu varijabilnost dejstvom faktora sredine i/ili gena modifikatora, iako se prema nekim stavovima njihov doprinos smatra manje važnim (Cryns i sar, 2004; Hilgert i sar, 2009).

Tabela 39. Stepenu oštećenja sluha kod pacijenata homozigota za varijantu c.35delG u različitim zemljama

| Populacija              | Studija                | Stepenu oštećenja sluha |         |               |       |        |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------|---------------|-------|--------|
|                         |                        | Umereno                 | Srednje | Srednje teško | Teško | Duboko |
| Rumunija                | Dragomir i sar, 2015   | 1                       | 1       | /             | 2     | 42     |
| Hrvatska                | Medica i sar, 2005     | /                       | 2       | /             | 1     | 16     |
| Austrija                | Janecke i sar, 2002    | /                       | /       | 1             | 3     | 14     |
| Egipat                  | El Barbary i sar, 2015 | /                       | /       | /             |       | 4      |
| Litvanija               | Mikstiene i sar, 2016  | /                       | 2       | /             | 5     | 30     |
| Multinacionalna studija | Snoeckx i sar, 2005    | 9                       | 89      | /             | 222   | 569    |

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u saglasnosti sa rezultatima stepena oštećenja sluha kod c.35delG homozigotnih nosioca u različitim zemljama, što je bilo i očekivano jer je već pokazano da razlike u nacionalnoj i/ili etničkoj pripadnosti ne utiču na razlike u težini oštećenja sluha (Tabela 39) (Cryns i sar, 2004).

Varijanta c.35delG je u grupi pacijenata složenih heterozigota detektovana kod 10 pacijenata (sa ukupno 6 različitih genotipova): 6 su imali duboko oštećenje, 3 teško, a jedan pacijent je bio sa srednjim oštećenjem sluha. Rezultati studija okolnih zemalja pokazali su slične rezultate upoređivanjem težine oštećenja sluha u grupi pacijenata složenih heterozigota sa jednom c.35delG varijantom. U populaciji Rumunije svi pacijenti složeni heterozigoti su imali duboko oštećenje sluha (Dragomir i sar, 2015). Na populaciji Hrvatske su dobijeni rezultati skoro ista rezultatima u ovoj studiji: tri pacijenta sa ovakvim genotipom bila su sa dubokim, jedan sa teškim i jedan sa srednjim oštećenjem sluha (Medica i sar, 2005). Primenom statističke analize upoređivanja stepena oštećenja sluha između homozigotnih i složenih heterozigotnih pacijenata nije pokazana asocijacija ( $p > 0,05$ ) (Tabela 20). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima, gde je pokazano da nema statistički značajne razlike između audioloških parametara kod obolelih sa homozigotnom c.35delG varijantom i složenih heterozigota sa c.35delG mutacijom na jednom alelu i tzv. *truncating* mutacijom (T) na drugom alelu (Cryns i sar, 2004). U grupi složenih heterozigota sa c.35delG varijantom identifikovanih u ovom radu (ukupno 10), 8 pacijenata je imalo T mutaciju na drugom alelu, dok su dva pacijenta imala patogenu ali tzv. *non-truncating* mutaciju.

Kod devet pacijenata analiziranih u ovom radu varijanta c.35delG je identifikovana na samo jednom alelu. Njihov fenotip je prilično jednako raspoređen, od srednjeg do dubokog oštećenja sluha. Ovo se može objasniti ili efektom druge neidentifikovane varijante, ili, što je manje verovatno, genima modifikatorima i/ili faktorima sopoljašnje sredine. Sprovedene statističke analize poređenja stepena oštećenja sluha heterozigota sa homozigotima i složenim heterozigotima pokazale su prisustvo statističke značajnosti ( $p=0,016$  i  $p=0,038$  redom) (Tabela 20). Poređenjem heterozigota i složenih heterozigota, nakon Bonfferoni korekcije, p vrednost je veća od 0,05. Dobijeni rezultati statističkih analiza su očekivani, jer pacijente sa detektovanim bi-alelskim patogenim mutacijama

karakteriše teži oblik oštećenja sluha u odnosu na pacijente sa jednom identifikovanom patogenom varijantom.

### 5.3.3. Ispitivanje asocijacije svih detektovanih genotipova sa stepenom oštećenja sluha

Ukoliko se posmatra čitava grupa analiziranih 119 pacijenata, a ne samo izolovana grupa genotipova sa varijantom c.35delG, bialelske mutacije su nadjene kod 37 pacijenata, jedna varijanta je detektovana kod 20 pacijenata, dok kod 62 obolela nisu detektovane mutacije u analiziranim genima, odnosno delovima gena. U grupi pacijenata sa bialelskim varijantama, 26 homozigota i 11 složenih heterozigota, najzastupljenije je bilo duboko oštećenje sluha sa učestalošću od 60% (22/37 pacijenata) (Tabela 21). Srednje oštećenje sluha je najčešće detektovano u grupi pacijenata sa jednom identifikovanom varijantom (45%), dok su pacijenti bez detektovanih varijanti imali najčešće teško i duboko oštećenje (Tabela 21). Ukupna p vrednost primenom Kruskal-Wallis testa pokazala je prisustvo asocijacije ( $p < 0,001$ ) (Tabela 21). Asocijacija stepena oštećenja sluha među dobijenim genotipovima uočena je poređenjem heterozigota sa svakim drugim tipom genotipa ponaosob. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa već postojećim literaturnim podacima, tj. da su pacijenti sa jednom identifikovanom varijantom blažeg stepena oštećenja sluha od onih sa varijantama na oba alela. Iako nije očekivano, postojanje statistički značajne razlike između heterozigotnih i ispitanika bez detektovanih varijanti se može objasniti ukupnim malim uzorkom pacijenata. Uzrok odsustva statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ) (Tabela 22) između homozigota i heterozigota jesu identifikovane varijante i kod jednih i kod drugih genotipova. To su najčešće varijante koje pripadaju T mutacijama, pa je bilo i očekivano da razlike u stepenu oštećenja sluha između ove dve grupe nema.

### 5.3.4. Ispitivanje asocijacije stepena oštećenja sluha i identifikovanih varijanti u odnosu na njihov efekat na koneksin 26

Mutacije lokusa DFNB1, kome pripadaju geni *GJB2* i *GJB6* predstavljaju uzrok NSAROS u više od 50% slučajeva. Oštećenje sluha kod pacijenata sa mutacijama u DFNB1 lokusu je generalno neprogresivno, a stepen oštećenja sluha varira od umerenog do dubokog (Snoeckx i sar, 2005; Gandía i sar, 2013; Hoefsloot i sar, 2013). Podatak da su za nesindromsko oštećenje sluha najodgovornije promene detektovane u pomenutom lokusu, objašnjava velika zastupljenost i funkcija proteinskih produkata gena *GJB2* i *GJB6*, koneksina 26 i 30, u unutrašnjem uhu. Kao što je već rečeno, koneksini 26 i 30 su dominantne izofome koneksina u kohlei (Martinez i sar, 2009; Wingard i Zhao, 2015). Njihova funkcija je u formiranju kanala pukotinastih veza kako u epitelijalnoj ćelijskoj mreži (između potpornih ćelija u Kortijevom organu), tako i u vezivno tkivnoj mreži (između ćelija vezivnog tkiva u kohlearnom lateralnom zidu - lat. *stria vascularis*) (Kikuchi i sar, 1995; Martinez i sar, 2009). Visok nivo ekspresije gena *GJB2* i *GJB6* u različitim delovima kohlearnog sistema objašnjava zašto su mutacije u ovim genima najčešći uzrok NSAROS. Koneksini formiraju koneksone, a dva koneksiona na plazma membrani stvaraju pukotinaste veze za međućelijsku komunikaciju. Sposobnost formiranja različitih formi koneksonskih kanala (homotipičnih, heterotipičnih, homomeričnih i/ili heteromeričnih) među potpornim ćelijama i ćelijama vezivnog tkiva, rezultuje velikim brojem različitih kanala sa različitim nivoom propustljivosti među ćelijama (Zhao, 2000; Zhao i Santos-Sacchi, 2000). Shodno tome, kao što je već rečeno, mutacija u jednom genu koneksina može uticati na formiranje različitih tipova koneksonskih kanala, a samim tim može rezultirati i u varijetetu fenotipova (Martinez i sar, 2009; Srinivas i sar, 2018).

Mutacije gena *GJB2* su mnogo češće nego u svim ostalim genima kod obolelih od oštećenja sluha, što se može objasniti samom funkcijom koneksina 26 i selektivnošću pukotinastih veza. Naime,

ovaj koneksin je propustljiv i za anjonske i katjonske jone, ali pošto je visoko eksprimiran koneksin 30 propustljiv samo za katjonske molekule, osnovna funkcija koneksina 26 je propustljivost anjonskih molekula. Većina ćelijskih signalnih molekula su anjoni, tako da koneksin 26 ima najveću ulogu u međućelijskoj komunikaciji u kohlei, a samim tim i promene u ovom genu imaju veliku učestalost.

Poznato je da većina varijanti gena *GJB2* dovodi do promene strukture ili funkcije (češće) proteina koneksina 26, i to na različitim nivoima (Martinez i sar, 2009; Dragomir i sar, 2015; Srinivas i sar, 2018):

- a) nemogućnost sinteze koneksina u endoplazmatičnom retikulumu,
- b) formiranje koneksina ali nemogućnost njihove oligomerizacije u konekson,
- c) formiranje koneksiona ali bez transporta do plazma membrane,
- d) pozicioniranje koneksiona na plazma membranu ali bez formiranja koneksonskog kanala
- e) mogućnost spajanja koneksiona sa formiranjem kanala pukotinastih veza sa vrlo izmenjenom propustljivošću i funkcijom.

Efekat gubitka funkcije koneksina poreklom od mutacija u genu *GJB2* jeste narušavanje homeostaze nekoliko manjih molekula i jona. Najčešća posledica je narušavanje recikliranja jona  $K^+$ . Ukoliko se dogodi mutacija u genu *GJB2*, epitelijalne potporne ćelije u kojima se eksprimira koneksin 26 ne propuštaju  $K^+$  i dolazi do lokalnog nagomilavanja visoke koncentracije  $K^+$  oko unutrašnjih senzornih ćelija (Cohen-Salmon i sar, 2002 ; Kikuchi i sar, 2000). Ovako povišen nivo jona  $K^+$  oko unutrašnjih senzornih ćelija i njihovih potpornih ćelija dovodi do aktiviranja glutamatskog transportera. U normalnim okolnostima transporter ima funkciju uklanjanja glutamata iz ekstracelularnog prostora, dok se pri postojanju mutacije dešava suprotan proces, dodatna sekrecija glutamata, koji dovodi do ćelijske smrti (Cohen-Salmon i sar, 2002). Međutim, postojanjem mutacija gena *GJB2* nije samo recikliranje jona  $K^+$  narušeno. Mutacije dovode i do narušavanja propustljivosti inozitol-tri-fosfata (IP3) (koji mobilise jone  $Ca^{2+}$ ), što rezultuje u inhibiciji stvaranja endokohlearnog potencijala (Beltramello i sar, 2005). Iako je recikliranje jona  $K^+$  jedna od osnovnih funkcija koneksina 26, pokazano je da određene patogene varijante gena *GJB2* imaju sposobnost formiranja funkcionalnog kanala sa normalnim transportom jona  $K^+$ , kao i *wild type* koneksin 26 (Martinez i sar, 2009). Ovakav podatak sugerise da do oštećenja sluha dolazi narušavanjem transporta i nekih drugih metabolita. Nedavne funkcionalne studije su pokazale da uloga koneksina 26 nije esencijalna za transport jona  $K^+$  u senzornom epitelu, već recirkulacija manjih metabolita i sekundarnih glasnika kao što su glukoza i IP3, koji doprinose integritetu senzitivnog epitela i normalnom funkcionisanju senzornih ćelija (Srinivas i sar, 2018).

Velika multinacionalna studija Snoeckx i saradnika, koja se bavila asocijacijom genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od NSAROS, pokazala je da su mutacije u genu *GJB2* koje inaktiviraju protein koneksin 26, u asocijaciji sa većim stepenom oštećenja sluha, nego one varijante koje ne dovode do inaktivacije proteina (Snoeckx i sar, 2005). Ovo je jedna od prvih studija koja se bavila analizom odnosa genotipa i fenotipa. Kako je navedeno u uvodu, varijante gena *GJB2* koje dovode do sinteze skraćenog proteina (formiranjem prevremnog stop kodona) ili koje ne dovode do translacije proteina uopšte se nazivaju *truncating* mutacije (T). Varijante koje omogućavaju translaciju proteina i ne dovode do njegove inaktivacije nazivaju se *non-truncating* mutacije (NT). Bez obzira što ovaj tip varijanti omogućava formiranje proteina, ipak ovakav koneksin ne može stvoriti funkcionalne koneksonske kanale, ili nastaju delimično funkcionalni kanali sa izmenjenom propustljivošću (Apps i sar, 2007).

U Tabeli 25 u ispitivanom uzorku od 119 pacijenata iz Srbije obolelih od NSAROS, data je podela identifikovanih varijanti na T i NT prema njihovom efektu na koneksin 26. U literaturi nema puno podataka o pojedinačnom efektu varijanti na gubitak funkcije koneksina. Prema različitim funkcionalnim studijama, poznato je da c.35delG ne dovodi do ekspresije koneksina 26 (T mutacija) (Tabela 23) (Cryns i sar, 2004). Varijante c.269T>C i c.380G>A dovode do formiranja kanala, ali



samo sa egzogenom, a ne i međućelijskom komunikacijom (NT varijante) (Tabela 25) (Martin i sar, 1999; D'Andrea i sar, 2002; Bruzzone i sar, 2003; Martinez i sar, 2009). Varijanta c.457G>A je ispitivana na oocitama model sistema *Xenopus* i pokazano je da dovodi do gubitka funkcije kanala pukotinastih veza jer onemogućava ili pozicioniranje kanala na plazma membranu ili je onemogućen transport koneksiona do membrane (NT varijanta) (Tabela 23) (Bruzzone i sar, 2003; Mese i sar, 2004; Palmada i sar, 2006). Varijanta c.269T>C je veoma kontroverzna u svom efektu na fenotip. Ovo je poznata patogena varijanta, očekivalo bi se da je asocirana sa većim stepenom oštećenja sluha. Međutim po svom efektu pripada NT mutacijama, što je i pokazano u studijama ispitivanja asocijacije genotipa i težine oštećenja sluha (Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005).

Rezultati studija koje su ispitivale asocijaciju genotipa i fenotipa pokazale su da je stepen oštećenja sluha uglavnom determinisan specifičnom kombinacijom mutacija gena *GJB2* (Cryns i sar, 2004). Ukoliko su kod pacijenata identifikovane T (inaktiviraju koneksin 26) bialelske varijante (T/T genotip), oštećenje sluha će biti mnogo teže nego kod pacijenata sa NT/NT genotipom; kao što je već rečeno, efekat genotipova je bio isti ili sličan bez obzira na geografsko i/ili etničko poreklo pacijenata (Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005).

Da bi se lakše uporedile audiološke karakteristike sa genotipovima, ali i dobijene vrednosti sa drugim studijama, svi genotipovi su podeljeni prema svom efektu na sledeće kategorije:

1. genotip T/T: dve *truncating* varijante
2. genotip T/NT: na jednom alelu *truncating*, a na drugom "non-truncating" varijanta
3. NT/NT: genotip sa dve *non-truncating* varijante
4. T/-: heterozigotni nosilac *truncating* varijante
5. NT/-: heterozigotni nosilac *non-truncating* varijante

U poglavlju Rezultati (4.3.4) prema Tabeli 24, u analiziranom uzorku genotip T/T je imalo 35 pacijenata homozigota (NT/NT genotip nije identifikovan). Grafički prikaz dobijenih rezultata (Slika 41) pokazuje da je najveći broj pacijenata genotipa T/T imao teško do duboko oštećenje sluha. Dva pacijenta, složeni heterozigoti, su imala T/NT genotip, jedan sa srednjim, a drugi sa teškim oštećenjem sluha. Kod 20 pacijenata heterozigotnih nosioca polovina njih je imala genotip T/-, a ostatak NT/-. Heterozigotni nosioci genotipa T/- su imali relativno ravnomerno raspoređeno srednje do duboko oštećenje sluha, dok se genotip NT/- najčešće javljao kod pacijenata sa srednjim oštećenjem sluha.

Upoređivanjem dobijenih genotipova i stepena oštećenja sluha sa drugim studijama koje su ispitivale ovakav vid asocijacije, uočava se saglasnost. Naime, sve studije asocijacije su pokazale da je kod T/T genotipova stepen oštećenja sluha viši nego u bilo kojoj drugoj grupi, što je slučaj i u ovom radu (Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005; Marlin i sar, 2006; Chan i sar, 2010; Kenna i sar, 2010). U ovoj studiji T mutacije su dobro poznate patogene varijante koje dovode do prevremenog formiranja STOP kodona i inaktivacije koneksina 26. Varijante koje su detektovane i kategorisane u T mutacije su sledeće: c.35delG, c.313\_326del, c.71G>A. Varijanta c.269insT je takođe kategorisana u T mutacije, mada se o njenoj učestalosti i efektu na oštećenje sluha jako malo zna (Marlin i sar, 2006). Identifikovana je kod jednog pacijenta u kombinaciji sa c.35delG varijantom. Ovaj pacijent ima duboko oštećenje sluha, što se i moglo očekivati jer pripada T/T kategoriji genotipa.

U ovoj studiji su samo dva pacijenta imala T/NT genotip. Genotip T/NT se često javlja sa srednjim do teškim oštećenjem sluha, što je u jednoj studiji na populaciji Austrije pokazano (Janecke i sar, 2002). Ovakav rezultat je možda najbliži dobijenim u ovoj studiji.

Rezultati statističkih analiza sprovedenih u ovom radu su pokazali graničnu statistički značajnu razliku poređenjem stepena oštećenja sluha između genotipova T/T i T/NT ( $p=0,057$ ) (Tabela 25). Ukoliko se analizira korigovana p vrednost (nakon *Bonferroni* korekcije), asocijacije više nema ( $p>0,05$ ). Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Kod genotipa T/NT u multinacionalnim studijama pokazano je znatno slabije oštećenje sluha nego u grupi T/T

genotipova, odnosno postojanje statističke značajnosti između ove dve grupe genotipova (Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar 2005; Putch a sar, 2007; Kenna i sar, 2010).

Prema studiji Crynsa i saradnika, pokazana je velika razlika u oštećenju sluha kod genotipova sa c.35delG varijantom, u odnosu na druge T/T genotipove. U ovoj studiji to nije slučaj. Sa gotovo istom učestalošću se javlja teško do duboko oštećenje sluha kod svih T/T genotipova. Razlika u rezultatima bi se mogla objasniti činjenicom da je u ovom radu identifikovano najviše T/T genotipova, dok je u studiji Crynsa i saradnika najveći broj pacijenata nosio c.35delG varijantu ali je, pored T/T, detektovan veliki broj genotipova T/NT kao i NT/NT.

Varijanta c.269T>C je identifikovana kod pacijenata sa bialelskim mutacijama kod dva pacijenta i oba imaju fenotip T/NT. Pošto pomenuta varijanta spada u NT mutacije, sa patogenim efektom, fenotip koji je asociiran sa c.269T>C i drugom T mutacijom je kontroverzan. Većina studija pokazuje umereno do srednje oštećenje sluha, mada je prema literaturi pokazano i teško i duboko oštećenje sluha kod bialelskih pacijenata nosioca pomenute varijante (Janecke i sar, 2002; Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005; Martinez i sar, 2009; Kenna i sar, 2010). Bialelski pacijenti nosioci ove varijante su imali srednje i teško oštećenje sluha, što je u saglasnosti sa nešto težim oštećenjem sluha kao u studiji Janecke i saradnika (2002).

Upoređivanje stepena oštećenja sluha sa heterozigotnim genotipovima T/- ili NT/- nije moguće sa pomenutim multinacionalnim studijama asocijacije, zato što su ove studije isključivo analizirale oštećenje sluha kod bialelskih pacijenata (Cryns i sar, 2004; Snoeckx i sar, 2005; Burke i sar, 2016). U ispitivanoj grupi pacijenata u ovom radu sve *missense* varijante sa nepoznatim, kontroverznim ili efektom polimorfizma se javljaju kao heterozigoti. To su sledeće varijante: c.380G>A, c.457G>A, c.79G>A, c.101T>C, c.670A>C. Varijanta delecije tri bazna para sa najverovatnije patogenim efektom, c.247-249delTTC, detektovana je kod jednog pacijenta u heterozigotnom obliku. S obzirom da je ova mutacija veoma retka (nađena samo u jednoj grčkoj porodici), smatra se da inaktivira koneksin 26, ali njen efekat nije moguće proceniti, niti je moguće dati objašnjenje da li je ona zaista odgovorna za gubitak sluha. Potrebne su funkcionalne analize koje bi dale pouzdano objašnjenje o efektu ove delecije.

Statističkim analizama upoređivanja stepena oštećenja sluha između genotipova formiranih na osnovu efekta na koneksin 26, dobijena je statistički značajna razlika između T/- i T/T genotipova. I u ovom slučaju nije moguće uporediti dobijeni rezultat sa drugim genotip-fenotip studijama zato što su one analizirale pacijente sa isključivo bialelskim varijantama (Cryns i sar, 2004; Putch a sar, 2007; Burke i sar, 2016). Oštećenje sluha dobijeno u ovoj grupi pacijenata ne može se objasniti isključivo efektom ovih varijanti na jednom alelu. Razlog za oštećenje sluha je najverovatnije ili u neispitivanim regionima gena *GJB2* i *GJB6*, ili u drugim genima.

U ovom radu nije bilo moguće uraditi statističke analize stepena oštećenja sluha kod svakog genotipa zbog ograničenog broja ispitanika. Sveobuhvatna analiza genotip-fenotip asocijacija se radi na velikom broju ispitanika, pa su zato i jedini objavljeni statistički podaci iz multinacionalnih studija sprovedeni na velikom uzorku.

Veliki broj pacijenata (62/119) je bez detektovanih varijanti. Sledeći korak bi bile dalje genetičke analize, poput različitih dostupnih panela za oštećenje sluha pomoću sekvenciranja nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing* - NGS). Ovom metodom je omogućen brz skrining velikog broja drugih gena koji se dovode u vezu sa NSAROS.

Na kraju, i pored urađenih brojnih studija, mehanizam kojim varijante gena *GJB2* uzrokuju oštećenje sluha je i dalje kontroverzan i nepoznat. Predviđanje efekta *missense* varijanti na koneksin 26, kao i postojanje mnogih varijanti sa kontroverznim ili još uvek nepoznatim efektom dovodi do velikog broja neobjašnjenih genotip-fenotip asocijacija, što samo potvrđuje veliku multilokusnu heterogenost. Mnoge funkcionalne studije pokazuju efekat varijanti na funkciju koneksina, ali ipak se *in vitro* uslovi eksperimenata ne moraju poklapati sa stvarnim mehanizmom delovanja. Kako bi se

razjasnile pomenute kontroverze, neophodno je nastaviti istraživanja funkcije koneksina i u budućnosti.

#### **5.4. Genetičko savetovanje visoko rizičnih porodica - izbor pravilne strategije genetičkog testiranja**

##### **5.4.1. Određivanje statusa nosioca kod bliskih članova porodice obolelih od NSAROS**

Oštećenje sluha predstavlja najčešće senzorno oštećenje u populacijama širom sveta i javlja se sa učestalošću od 1 u 700/1 000 novorođenčadi (Zheng i sar, 2015). Nakon što su određene varijante detektovane sa velikom učestalošću kod obolelih od NSAROS u različitim populacijama, sprovedeno je testiranje zdravih osoba. Rezultati su pokazali da učestalost heterozigotnih zdravih nosioca varijante c.35delG u populaciji belaca iznosi 1%-3% (Battellino i sar, 2011; Hall i sar, 2012; Hoefsloot i sar, 2013). Učestalost heterozigotnih nosioca varijante c.167delT u aškenazi jevrejskoj populaciji iznosi 4% (Shahin i sar, 2002; Snoeckx i sar, 2005; Tekin i sar, 2010; Hoefsloot i sar, 2013). Varijanta c.235delC se javlja u populacijama istočne Azije i Japana, sa učestalošću nosioca 1%-2% (Abe i sar, 2000; Kudo i sar, 2000).

Zbog visoke učestalosti nosioca pomenutih čestih varijanti u genu *GJB2* u različitim populacijama, određivanje statusa nosioca u porodicama sa povećanim rizikom je od suštinske važnosti za procenu rizika za dobijanje obolelog deteta.

Danas je dostupan veliki broj metoda za pouzdano testiranje statusa nosioca kod bliskih članova porodice. U ovom radu su korišćene metode direktne detekcije varijanti PCR-ARMS i PCR-RFLP, kao i metoda sekvenciranja. Izbor metode je vršen na osnovu identifikovanog genotipa obolelog člana porodice. Analizirano je ukupno 160 zdravih osoba iz Srbije sa pozitivnom porodičnom anamnezom NSAROS i oni su podeljeni u 2 grupe.

Prvu grupu su činili roditelji obolelih od NSAROS, ukupno 152 uzorka. Određivanje statusa nosioca članova porodice pacijenata sa bialelskim varijantama je neophodan korak u procesu genetičkog savetovanja, kako bi se homozigotni ili status složenog heterozigota obolelog potvrdio. Potvrda statusa nosioca kod roditelja bialelskih pacijenata, omogućava davanje adekvatnog genetičkog saveta vezanog za prenatalnu dijagnostiku. Kod roditelja pacijenata sa jednom ili bez identifikovanih varijanti, potrebna je detekcija druge (ili obe) uzročne varijante kako bi se pružio precizan odgovarajući genetički savet.

U 74 slučajeva rezultati analize su pokazali da su roditelji heterozigotni nosioci mutacija koje su detektovane kod deteta. Na taj način je i potvrđena homozigotnost ili složena heterozigotnost kod obolelog i prethodno ispitivanog člana porodice. Svakoj porodici je objašnjen način autozomno-recesivnog načina nasleđivanja bolesti i da je rizik za dobijanje obolelog deteta 25%. Dat je savet u vezi mogućnosti prenatalne dijagnostike u svakoj sledećoj trudnoći. Takođe, porodicama je preporučeno i skrining na nosioce bliskih rođaka. U grupi od 78 roditelja, mutacije uzročnici bolesti su ostale neidentifikovane. Porodicama je objašnjen složen način nasleđivanja bolesti, sa naglaskom da bi određivanje statusa nosioca bilo moguće tek kada se utvrdi molekularna osnova bolesti.

Određivanje statusa nosioca bliskih članova porodice je indikovano na osnovu aktuelnih vodiča dobre prakse. Oni su činili drugu grupu ispitanika: tri rođaka obolelih sa jasno definisanim bialelskim varijantama (svi su bili homozigoti za varijantu c.35delG) i njihovi partneri sa kojima su

planirali potomstvo. Status nosioca 6 ispitivanih osoba rađen je direktnom detekcijom c.35delG varijante pomoću PCR-ARMS metode.

Bliski rođaci pacijenata sa NSAROS su bili polusestra po majci, brat i ujak. Rezultati analize su pokazali da su brat i ujak heterozigotni nosioci porodične varijante c.35delG. Polusestra nije nosila ispitivanu varijantu.

S obzirom na dobijenu najveću učestalost varijante c.35delG kod obolelih od NSAROS u Srbiji u ovom radu, opravdano je partnere nosioca familijarnih mutacija, koji nemaju porodičnu anamnezu NSAROS, testirati u rutinskoj praksi samo na ovu varijantu. Dobijeni negativan nalaz teoretski smanjuje rizik dovoljno da se isključi postojanje medicinske indikacije za prenatalnu dijagnostiku NSAROS u ovim slučajevima. U ovom radu skrining na status nosioca varijante c.35delG urađen kod partnera je pokazao da nijedan ispitanik nije bio nosilac. Primenom Bayesove teoreme (senzitivnost testa 70%, učestalost nosioca u opštoj populaciji 3%) izračunat je finalni rizik za partnere da budu nosioci neke druge patogene varijante u genu *GJB2* i iznosio je oko 0,9%. U ovakvim slučajevima nema indikacije za prenatalnu dijagnostiku NSAROS uzrokovanog c.35delG, ali ni drugim mutacijama u genu *GJB2*, jer se ona radi samo kod parova koji su potvrđeni heterozigotni nosioci, što je opšte pravilo za prenatalnu dijagnostiku autozomno-recesivno nasleđenih oboljenja. S obzirom da je statistički izračunat konačni rizik za dobijanje bolesnog potomstva navedenim slučajevima bio nizak, smanjena je zabrinutost parova koji su se obratili za savet.

#### 5.4.2. Prenatalna dijagnostika

Poznato je da je NSAROS autozomno-recesivno nasledno oboljenje, što znači da postoji rizik od 25% za ponovno dobijanje obolelog deteta ukoliko su oba roditelja heterozigotni nosioci mutacije. S obzirom na težinu bolesti i ozbiljan sociološki hendikep ove dece, prema aktuelnim vodičima dobre prakse je opravdano sprovođenje prenatalne dijagnostike u ovim porodicama. U cilju uvođenja ove analize u rutinsku kliničku praksu, ovo istraživanje je obuhvatilo i prenatalnu analizu u jednoj porodici iz Srbije, informativnoj za varijantu c.35delG.

Prenatalna dijagnostika je sprovedena korišćenjem PCR-ARMS metode za direktnu detekciju prisustva/odsustva pomenute patogene varijante gena *GJB2*. Dijagnostika je rađena u 11. nedelji trudnoće na fetalnom uzorku dobijenom biopsijom horionskih resica (CVS). S obzirom da je ovo prva prenatalna dijagnostika rađena u našoj zemlji, bilo je neophodno odrediti senzitivnost PCR-ARMS metode na eventualno prisustvo kontaminacije uzorkom majke u dobijenom fetalnom uzorku, koje bi moglo značajno da utiče na tačnost rezultata. Metoda je uspešno validirana i verifikovana za dalju primenu detekcije varijante c.35delG u budućim prenatalnim dijagnostikama. Pokazano je da na tačnost rezultata ne utiče eventualno prisustvo kontaminacije uzorkom majke do 10% (Slika 44, Slika 45). Prenatalna dijagnostika je pokazala da fetus nije nosilac porodične mutacije. U okviru rada genetičkog savetovališta IMD-a, porodici je objašnjen rezultat i dat savet za prenatalnu dijagnostiku u svakoj sledećoj trudnoći, zbog postojanja visokog rizika za dobijanje obolelog deteta od NSAROS.

Na osnovu dobijenih podataka, pokazano je da je PCR-ARMS metoda za direktnu detekciju varijante c.35delG u ovakvim slučajevima metoda izbora jer omogućava brzu, jasnu i preciznu molekularno-genetičku dijagnostiku.

S obzirom da je ovo prva prenatalna dijagnostika rađena u Srbiji i da je gore pomenuta metoda PCR-ARMS validirana i verifikovana u laboratoriji, veliki značaj ove doktorske disertacije je upravo u uvođenju prenatalne dijagnostike za detekciju varijante c.35delG u rutinsku praksu. Svim porodicama sa poznatim genotipom obolelog, kao i sa identifikovanim statusom nosioca varijante c.35delG, biće omogućeno sprovođenje prenatalne dijagnostike.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz dobijenih rezultata ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Primenom različitih metoda se mogu uspešno detektovati varijante analiziranih gena. Delimično modifikovane PCR-ARMS metode se mogu primeniti za uspešnu direktnu detekciju varijanti c.35delG i c.71G>A gena *GJB2* kod NSAROS pacijenata. Metodom PCR-RFLP uspešno su direktno detektovane varijante c.101T>C i c.23+1G>A gena *GJB2* kao i m.1555A>G gena *MTRNR1*. Multipleks PCR-om nisu detektovane dve parcijalne delecije gena *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1830) i del(*GJB6*-D13S1854). Sekvenciranjem kodirajućeg regiona, egzona 2 gena *GJB2* identifikovane su varijante c.313\_326del, c.269T>C, c.380G>A, c.457G>A, c.269insT, c.247-249delTTC, c.670A>C i c.79G>A.

- S obzirom na to da su sve korišćene metode validirane i verifikovane, potvrđeno je da se sve navedene metode mogu koristiti u svakodnevnoj laboratorijskoj dijagnostici NSAROS.

- Opravdana je rutinska primena molekularno genetičkih metoda za direktnu detekciju varijante gena *GJB2* c.35delG kao prvog koraka kod svakog pacijenta obolelog od NSAROS. Senzitivnost metode bi iznosila ~26% i omogućila bi da petina rizičnih porodica već nakon prvog koraka genetičkog testiranja bude potpuno informativna za prenatalnu dijagnostiku.

- Na osnovu broja detektovanih varijanti i genotipova, u analiziranom uzorku od 119 pacijenata i primenom opisanih metoda, može se zaključiti da je molekularna osnova nesindromskog autozomno-recesivnog oštećenja sluha u Srbiji heterogena, slično kao što je uočeno u drugim zemljama Evrope. Dobijeni podaci potvrđuju prisustvo zajedničkih varijanti gena *GJB2* naroda slovenskog porekla iz zemalja centralne i istočne Evrope, kao i uticaj populacija iz Mediterana. Identifikovane su četiri varijante koje pripadaju grupi retkih, familijarnih mutacija, prisutnih samo kod pojedinačnih slučajeva u svetu što ukazuje na postojanje tzv. privatnih mutacija i u našoj zemlji.

- Pacijenti sa NSAROS u Srbiji ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji imaju oštećenja sluha različitog stepena, što ukazuje na postojanje heterogenosti izučavanog fenotipa.

- Na osnovu rezultata povezanosti genotipa sa alelom c.35delG i stepena oštećenja sluha, može se zaključiti da postoji veza između genotipa i fenotipa. S obzirom da pacijenti sa homozigotnim i složenim heterozigotnim genotipom imaju češće duboko oštećenje sluha, to može biti rezultat opisanog funkcionalnog efekta c.35delG varijante u genu *GJB2*.

- Na osnovu rezultata povezanosti svih ostalih identifikovanih genotipova i stepena oštećenja sluha može se takođe zaključiti da postoji veza između genotipa i fenotipa. Povezanost stepena oštećenja sluha među dobijenim genotipovima pokazana je poređenjem heterozigota sa svakim drugim tipom genotipa ponaosob. Kao što je i očekivano, heterozigoti su češće povezani sa oštećenjem sluha srednje teškog stepena, odnosno prisustvo samo jedne patogene varijante je povezano sa blažim stepenom oštećenja sluha.

- Povezanost genotipa i fenotipa je utvrđena i na osnovu rezultata asocijacije genotipova predstavljenih prema efektu varijante na sintezu proteina i stepena oštećenja sluha. Pacijenti sa T/T genotipom imaju češće duboko oštećenje sluha, što je rezultat funkcionalnog efekta varijanti koje čine T/T genotipove.

- Na osnovu identifikovanog genotipa obolelog člana porodice bi trebalo izvršiti izbor metode (PCR-ARMS, PCR-RFLP ili metode sekvenciranja) prilikom određivanja statusa nosioca i prenatalne dijagnostike.

- Opravdano je najpre odrediti status nosioca oba roditelja, kako bi se potvrdila homozigotnost ili složena heterozigotnost kod obolelog člana porodice kao i kako bi se dao precizan savet u vezi mogućnosti prenatalne dijagnostike u svakoj sledećoj trudnoći.

- Opravdano je određivanje statusa nosioca kod bliskih članova porodice i njihovih partnera sa kojima eventualno planiraju potomstvo. Prvi korak je testiranje rođaka na prisustvo porodične varijante, nakon čega se partneri nosioca familijarnih mutacija, koji nemaju porodičnu anamnezu NSAROS, testiraju na prisustvo c.Gdel35 mutacije, kao najčešće u našoj populaciji. Primenom Bayesove teoreme se dodatno smanjuje rizik dovoljno da se isključi postojanje medicinske indikacije za prenatalnu dijagnostiku NSAROS.

- Na osnovu rezultata prenatalne dijagnostike jedne porodice u Srbiji iznešene u ovoj doktorskoj disertaciji, može se zaključiti da PCR-ARMS metoda predstavlja metodu izbora za brzu, jasnu i preciznu molekularno genetičku prenatalnu dijagnostiku varijante c.35delG NSAROS.

## 7. LITERATURA

- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. 2000 *J Med Genet*;37:41–3
- Al-Achkar W, Moassass F, Al-Halabi B, Al-Ablog A. Mutations of the Connexin 26 gene in families with non-syndromic hearing loss. *Mol Med Rep*. 2011 Mar-Apr;4(2):331-5
- Al-Sebeih K, Al-Kandari M, Al-Awadi SA, Hegazy FF, Al-Khamees GA, Naguib KK, Al-Dabbous RM. Connexin 26 Gene Mutations in Non-Syndromic Hearing Loss Among Kuwaiti Patients. *Med Princ Pract* 2014;23:74–9
- Alvarez A, del Castillio I, Villamar M, Aguirre LA, Gonzalez-Neira A, Lopez-Nevot A, Moreno-Pelayo MA, Moreno F. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*) in Spanish Romani (Gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 2005;137A(3):255-8
- Angeli S. Phenotype/genotype correlations in a *DFNB1* cohort with ethnical diversity. *The Laryngoscope* 2008;118(11):2014-23
- Antoniadis T, Grønskov K, Sand A, Pampanos A, Brøndum-Nielsen K, Petersen MB. Mutation analysis of the *GJB2* (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 2000;16(1):7-12
- Apps SA, Rankin WA, Kurmis AP. Connexin 26 mutations in autosomal recessive deafness disorders: A review. *International Journal of Audiology* 2007;46(2):75-81
- Arnos KS, Cunningham M, Israel J, Marazita ML. Innovative approach to genetic counseling services for the deaf population. *American Journal of Medical Genetics* 1992;44(3):345-51
- Arnos KS. The implications of genetic testing for deafness. *Ear & Hearing* 2003;24(4):324-31
- Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL, Prasad S, Taggart RT, del Castillo I, et al. *GJB2*: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Human Mutation* 2004;24(4):305-11
- Babić B. (2007). *Audiologija i vestibulologija za studente surdologije i logopedije*. Beograd: Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju.
- Bai D, Wang AH, Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility. *Biochem. J*. 2014;458: 1–10
- Barashkov NA, Solovyev AV, Teryutin FM, Pshennikova VG, Klarov LA, Romanov GP, Nakhodkin SS, Savvinova KE, Gotovtsev NN, Solovyeva NA, Kozhevnikov AA, Vasilyeva LM, Fedotova EE, Pak MV, Lekhanova SN, Zakharova EV, Rafailov AM, Luginov NV, Alexeev AN, Posukh OL, Dzhemileva LU, Khusnutdinova EK, Fedorova SA. Extremely High Carrier Frequency of the *GJB2* Splice Site IVS1+1G>A Mutation in Eastern Siberia is Comparable to the Carrier Frequency of the Sickle Cell Anemia in Africa. *J Genet Genome Res* 2014a,1:1 ISSN:2378-3648
- Barashkov NA, Teryutin FM, Pshennikova VG, Solovyev AV, Klarov LA, Solovyeva NA, Kozhevnikov AA, Vasilyeva LM, Fedotova EE, Pak MV, Lekhanova SN, Zakharova EV, Savvinova KE, Gotovtsev NN, Rafailo AM, Luginov NV, Alexeev AN, Posukh OL, Dzhemileva LU, Khusnutdinova EK, Fedorova SA. Age-Related Hearing Impairment (ARHI) Associated with *GJB2* Single Mutation IVS1+1G.A in the Yakut Population Isolate in Eastern Siberia. 2014. *PLoS ONE* 9(6):e100848. doi:10.1371/journal.pone.0100848
- Battellino S, Rudolf G, Zargi M, Trebusak Podkrajsek K, Peterlin B. Connexin 26 (*GJB2*) and connexin 30 del(*GJB6-D13S1830*) mutations in Slovenians with prelingual non-syndromic deafness. *Int. Adv. Otol*. 2011;7(3):372-8

- Beltramello M, Bicego M, Piazza V, Ciubotaru CD, Mammano F, D'Andrea P. Permeability and gating properties of human connexins 26 and 30 expressed in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;305:1024–33
- Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, Pozzan T, Mammano F, 2005. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat. Cell Biol.* 2005;7:63-9
- Beurg M, Evans MG, Hackney CM, Fettiplace R. A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *Journal of Neuroscience* 2006;26(43):10992-1000
- Bottema C, Sarkar G, Cassady JD, Li S, Dutton CM, Sommer SS. Polymerase Chain Reaction Amplification of Specific Alleles: A General Method of Detection of Mutations, Polymorphisms, and Haplotypes. *Methods Enzymol.* 1993;218:388-402
- Boulay AC, del Castillo FJ, Giraudet F, Hamard G, Giaume C, Petit C, et al. Hearing is normal without connexin30. *J. Neurosci.* 2013;33:430–4
- Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. *Genet Test.* 2007 Winter;11(4):455-8
- Brandt A, Striessnig J, Moser T. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *Journal of Neuroscience* 2003;23(34):10832-40
- Branka Mikić. Uticaj rane rehabilitacije na evocirane potencijale dece sa teškim oštećenjem sluha (doktorska disertacija). Beograd: Medicinski fakultet, 1995.
- Bruzzone R, Veronesi V, Gomes D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'Andrea P, and White TW (2003) Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Lett* 2003;533:79–88
- Burke WF, Warnecke A, Schoner-Heinisch A, Lesinski-Schiedat A, Maier H, Lenarz T. Prevalence and audiological profiles of GJB2 mutations in a large collective of hearing impaired patients. *Hearing Research* 2016;333: 77-86
- Cama E, Melchionda S, Palladino T, Carella M, Santarelli R, Genovese E, et al. Hearing loss features in GJB2 biallelic mutations and GJB2/GJB6 digenic inheritance in a large Italian cohort. *Int.J Audiol.* 2009;48:12-7
- Chan DK, Schrijver I, Chang KW. Connexin-26–associated deafness: Phenotypic variability and progression of hearing loss. *Genetics IN Medicine.* Volume 12, Number 3: 174-81
- Chen J, Chen J, Zhu Y, Liang C, Zhao HB. Deafness induced by connexin 26 (GJB2) deficiency is not determined by endocochlear potential (EP) reduction but is associated with cochlear developmental disorders. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;448:28–32
- Clayton T, Buckelton J. Forensic DNA evidence interpretation. In: Buckelton J, editor. *Mixtures.* CRC Press. 2005;325-83
- Coco M, Salvinelli F, Greco F, Trivelli M, D'Emidio L, Mesoraca A, Giorlandino C, Raffio R, Coco C. Significance of heterozygosis M34T mutation of GJB2 gene in non-syndromic congenital deafness. Retrospective analysis of 12,472 samples of amniotic fluid. *J Prenat Med.* 2013 Oct-Dec;7(4):56–8
- Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K, Petit C. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol. CB* 2002;12:110611
- Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, et al. (2002). Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* 2002;12:1106–11



- D'Adamo P, Guerci VI, Fabretto A et al: Does epidermal thickening explain GJB2 high carrier frequency and heterozygote advantage? *Eur J Hum Genet* 2009;17:284–6
- D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, Gasparini P. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:685–91
- da Silva-Costa SM, Coeli FB, Lincoln-de-Carvalho CR, Marques-de-Faria AP, Kurc M, Pereira T, Pomilio MC, et al. Screening for the GJB2 c.-3170 G>A (IVS 1+1 G>A) mutation in Brazilian deaf individuals using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009;13(5):701-4
- Dalamon V, Beheran A, Diamante F, Pallares N, Diamante V, Elgoyhen A B. Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hear.Res.* 2005;207:43-9
- D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(3):685-91
- Davies A R. Clinical and audiometric assessment of hearing. In: Linda Luxon editor. *Textbook of Audiological Medicine – Clinical aspects of hearing and balance*. 1st ed. London: Martin Dunitz Taylor Francis Group, 2003. p.349-73
- de Castro LSS, Marinho ANR, Rodrigues EMR, Marques GCT, de Carvalho TAA, da Silva LCS, dos Santos SEB. A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon region. *Braz J Otorhinolaryngol. Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(1):95-9
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*. 2002;346:243-9
- del Castillo FJ, del Castillo I (2011) The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci* 2011;16:3252-74
- del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E et al. (2005) A novel deletion involving the connection-30 gene, del(*GJB6*-D13S1854), found in *trans* with mutations in the *GJB2* gene (connection-26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005;42:588-94
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243-9
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El Zir E, Aubois A, Joannard A and Petit C. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997;6:2173-7
- Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabedian, E. N., & Petit, C. (1999). Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *The Lancet* 1999; 353(9161):1298-303
- Dragomir C, Stan A, Stefanescu DT, Sarafoleanu C, Severin E, Savu L. GJB2 Gene Testing, Etiologic Diagnosis and Genetic Counseling in Romanian Persons With Prelingual Hearing Loss. *Int J Clin Pediatr*. 2015;4(1):121-6
- El Barbary NE, El Belbesy MF, Asal SI, Kholeif SF. Detection of 35delG, 167delT mutations in the connexin 26 gene among Egyptian patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss. *The Egyptian Journal of Otolaryngology* 2015,31:42–6

- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 1995;129:805–17
- Esmaili M, Bonyadi M, Nejadkazem M. Common mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in affected families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss from Iran: simultaneous detection of two common mutations (35delG/del(GJB6-D13S1830)) in the DFNB1-related deafness. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2007;71:869-73
- Essammak BF, Ashour MJ, Sharif FA. Non-Syndromic autosomal recessive deafness in Gaza strip: A study of five *GJB2* Gene mutations. *International Journal of Genetics and Genomics* 2014;2(5):92-6
- Essenfelder GM, Larderet G, Waksman G, Lamartine J. Gene structure and promoter analysis of the human GJB6 gene encoding connexin 30. *Gene* 2005;350(1):33-40
- Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998;351:394–8
- Evans FE. Physiology of the auditory system, In: Linda Luxon editor. *Textbook of Audiological Medicine – Clinical aspects of hearing and balance.* 1st ed. London: Martin Dunitz Taylor Francis Group, 2003. p.157–79
- Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, et al. Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(4):279-84
- Feldmann D, Le Maréchal C, Jonard L, Thierry P, Czajka C et al. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet* 2009;52: 195–200
- Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J. Comp. Neurol.* 2003;467:207–31
- Forge A, Jagger DJ, Kelly JJ, Taylor RR. Connexin30-mediated intercellular communication plays an essential role in epithelial repair in the cochlea. *J. Cell Sci.* 2013;126:1703–12
- Frei K, Szuhai K, Lucas T, Weipoltshammer K, Schofer C, Ramsebner R, Baumgartner WD, Raap AK, Bittner R, Wachtler FJ, Kirschhofer K. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *European Journal of Human Genetics* 2002;10:427 – 32
- Gabriel H, Kupsch P, Sudendey J, et al. Mutations in the connexin26/*GJB2* gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat.* 2001;17:521-2
- Gacek RR, Gacek RM. Anatomy of the Auditory and Vestibular Systems, In Snow BJ, Ballenger JJ. editors *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 16th ed Hamilton Ontario: BC Decker Inc, 2003. p. 1 – 25
- Gandía M, del Castillo FJ, Rodríguez-Álvarez FJ, Garrido G, Villamar M, et al. A Novel Splice-Site Mutation in the *GJB2* Gene Causing Mild Postlingual Hearing Impairment. *PLoS ONE* 2013;8(9):73566
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 2000;8:19–23
- Gravina LP, Foncuberta ME, Prieto ME, Garrido J, Barreiro C, Chertkoff L. Prevalence of DFNB1 mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in GJB2. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Mar;74(3):250-4
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Sheffield VC, Smith RJH. Carrier rates in the midwestern United States of GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999: 281: 2211–6

- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genetics* 1999;23(1):16-8
- Griffith AJ, Chowdhry AA, Kurima K, Hood LJ, Keats B, Berlin CI, et al. Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet.* 2000;67(3):745-9
- Griffith AJ, Friedman TB: Auditory function and the M34T allele of connexin 26. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:94
- Griffith AJ: Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant. *J Med Genet* 2001;38:24
- Grillo AP, de Oliveira FM, de Carvalho GQ, Medrano RFV, da Silva-Costa SM, Sartorato EL, de Oliveira CA. Single Nucleotide Polymorphisms of the GJB2 and GJB6 Genes Are Associated with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *Biomed Res Int* 2015:318727
- Gualandi E, Ravani A, Berto A, et al. Occurrence of del(GJB6-D13S1830) mutation in Italian non-syndromic hearing loss patients carrying a single *GJB2* mutated allele. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004;552:29-34.
- Gunther B, Steiner A, Nekahm-Heis D et al. The 342-kb deletion in GJB6 is not present in patients with nonsyndromic hearing loss from Austria. *Hum Mutat* 2003;22(2):180
- 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;0:e001238/
- Hashemi SB, Ashraf MJ, Saboori M, Azarpira N, Darai M. Prevalence of GJB2 (CX26) gene mutations in south Iranian patients with autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Mol Biol Rep* 2012;39:10481–7
- Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Crosby AH, Farrokhi E, Pour Jafari H, Ghatreh Samani K, Safa Chaleshtori K, Kasiri M, Shahrani M, Mobini GR, Banitalebi M, Mansouri M, Modarresinia D, Jafari M. Molecular Pathology of 6 Novel GJB2 Allelic Variants Detected in Familial and Sporadic Iranian Non Syndromic Hearing Loss Cases. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(3):9-18
- Hilgert N, Smith RJH and Camp GV. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res.* 2009;681(2-3):189–96
- Hinchcliffe R. The threshold of hearing. In: Linda Luxon editor. *Textbook of Audiological Medicine – Clinical aspects of hearing and balance.* 1st ed. London: Martin Dunitz Taylor Francis Group, 2003:213–49
- Hobbie SN, Bruell CM, Akshay S, Kalapala SK, Shcherbakov D, Bottger EC. Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(9):3244-9
- Hoefsloot LH, Roux AF, Bitner-Glindzicz M (2013) EMQN Best Practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the DFNB1 locus. *Eur J Hum Genet* 21(11):1325–9
- Hutchin T, Coy N, Conlon H et al. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK – implications for genetic testing. *Clin Genet* 2005;68 (6):506–12
- Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1927–37
- Jagger DJ, Forge A. Compartmentalized and signal-selective gap junctional coupling in the hearing cochlea. *Journal of Neuroscience* 2006;26(4):1260-8

- Jagger DJ, Nickel R, Forge A. Gap junctional coupling is essential for epithelial repair in the avian cochlea. *J. Neurosci.* 2014;34:15851–60
- Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Utermann B, Muller T, Loffler J et al. Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations—phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. *Hum. Genet.* 2002;111:145–53
- Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Utermann B, Muller T, Loffler J, Utermann G, et al. Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations—phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. *Human Genetics* 2002;111(2):145-53
- Joseph AY, Rasool TJ. High frequency of connexin26 (*GJB2*) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala, India. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73:437-43
- Jovana Ječmenica. Učestalost i karakteristike senzorneuralnog oštećenja sluha usled infektivnih bolesti kod dece. Beograd: Medicinski fakultet, 2016.
- Jovanović Simić N, Duranović M, Babac S. Sluh. Univerzitet u Istočnom Sarajevu Medicinski fakultet Foča, 2018.
- Jovanović VS, Jeličić AN Anatomija čoveka glava i vrat. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1989.
- Karademir LB, Aoyama H, Yue B, Chen H, Bai D. Engineered Cx26 variants established functional heterotypic Cx26/Cx43 and Cx26/Cx40 gap junction channels, *Biochem. J.* 2016;473: 1391–403
- 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. *Am J Hum Genet.* 1998 Apr;62(4):792-9
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, and Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997;387(6628):80-3
- Kenna MA, Feldman HA, Neault MW, Frangulov A, Wu BL, Fligor B, Rehm HL. Audiologic Phenotype and Progression in *GJB2* (Connexin 26) Hearing Loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 January;136(1):81–7
- Kenneson A, Naarden Braun KV and Boyle C. *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. *Genet Med* 2002;4(4):258–74
- Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 1997;199:165-71
- Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med. Electron Microsc. Off. J. Clin. Electron Microsc. Soc. Jpn.* 2000;33:51-6
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol* 1995;191:101–18
- Kokotas H, Petersen MB, Willems J. Mitochondrial deafness. *Clinical Genetics* 2007;71(5):379-91
- Koval M, Molina SA, Burt JM. Mix andmatch: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues, *FEBS Lett* 2014;588:1193–204
- Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000;90:141–5

- Kupka S, Braun S, Aberle S, Haack B, Ebauer M, Zeißler U, Zenner HP, Blin N, Pfister M. Frequencies of *GJB2* Mutations in German Control Individuals and Patients Showing Sporadic Nonsyndromic Hearing Impairment. *Hum Mutat* 2002;20(1):77-8
- Lazar C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, et al. Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the *GJB2* gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010;74(4):3515.
- LeMasurier M, Gillespie PG. Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron* 2005;48(3):403-15
- Liang C, Zhu Y, Zong L, Liu GJ, Zhao HB. Cell degeneration is not a primary cause for Cx26 deficiency associated hearing loss. *Neurosci. Lett.* 2012;528:36–41
- Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, et al. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. *Hum Genet.* 2002;111:394–7
- Liu, X. Z., Pandya, A., Angeli, S., Telischi, F. F., Arnos, K. S., Nance, W. E., et al. (2005). Audiological features of *GJB2* (connexin 26) deafness. *Ear & Hearing* 2005;26(3):, 361-369.
- Liu, Y. P., and Zhao, H. B. (2008). Cellular characterization of connexin26 and connexin30 expression in the cochlear lateral wall. *Cell Tissue Res* 2008;. 333:., 395–403. doi:10.1007/s00441-008-0641-5
- Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Menzel HJ, Utermann G, Janecke AR. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Europ. J. Hum. Genet.* 2001;9:226-30
- Löppönen T, Dietz A, Väisänen ML, Valtonen H, Kosunen A, Hyvärinen A, et al. Homozygous M34T mutation of the *GJB2* gene associates with an autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing impairment in Finnish families. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(8):862-73
- Lucotte G, Mercier G. Meta-analysis of *GJB2* mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test* 2001;5:149–52
- Lucotte G. High prevalences of carriers of the 35delG mutation of connexin 26 in the Mediterranean area. *Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol.* 2007;71: 741-6
- Mahdih N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *J Hum Genet.* 2010;55(10):639-48
- Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in *GJB2* gene: Indian scenario. *Am J Med Genet A.* 2003;120A(2):180-4
- Man YK, Trollove C, Tattersall D et al: A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro. *J Membr Biol* 2007;218:29–37
- Manthey D, Banach K, Desplantez T, Lee CG, Kozak CA, Traub O, et al. Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels. *J. Membr. Biol.* 2001;181:137–48
- Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, Chauvin P, Garabédian EN, Couderc R, Odent S, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Lemarechal C, Dollfus H, Eliot MM, Delaunoy JL, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Goizet C, Duriez F, Fellmann F, Hélias J, Vigneron J, Montaut B, Matin-Coignard D, Faivre L, Baumann C, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. *GJB2* and *GJB6* Mutations: Genotypic and Phenotypic Correlations in a Large Cohort of Hearing-Impaired Patients. *ARCH OTOLARYNGOL HEAD NECK SURG* JUNE 2005;131
- Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, and Evans WH. Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 1999;8:2369–76
- Martínez AD, Acuña R, Figueroa V, Maripillan J, Nicholson B. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(2):309-22

- Matos TD, Caria H, Simões-Teixeira H, Aasen T, Nickel R et al. A novel hearing loss-related mutation occurring in the *GJB2* basal promoter. *J Med Genet* 2007;44:721–5
- Medica I, Rudolf G, Balaban M, Peterlin B. C.35delG/ *GJB2* and del(*GJB6-D13S1830*) mutations in Croatians with prelingual non-syndromic hearing impairment. *BMC Ear Nose Throat Disord* 2005;5:11
- Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, and White TW. Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* 2004;115:191–9
- Mikstiene V, Jakaitiene A, Byckova J, Gradauskiene E, Preiksaitiene E, Burnyte B, Tumiene B, Matuleviciene A, Ambrozaityte L, Uktveryte L, Domarkiene I, Rancelis T, Cimbalistiene L, Lesinskas E, Kucinskas V, Utkus A. The high frequency of *GJB2* gene mutation c.313\_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population. *BMC Genetics* 2016;17:45
- Minarik G, Ferak V, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L. High frequency of *GJB2* mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen Physiol Biophys* 2003;22(4):549-56
- Mistrik P, Ashmore J. The role of potassium recirculation in cochlear amplification. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2009,17:394–9
- Moller AR. *Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system* Oxford: Academic Press. 2006, 2nd ed. p. 328.
- Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998;339:1500–5
- Moser T, Beutner D. Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(2):883-8
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 1999;36:829–32
- Neocleous V, Aspris A, Shahpenterian V, Nicolaou V, Panagi C, Ioannou I *et al.* High frequency of 35delG *GJB2* mutation and absence of del(*GJB6-D13S1830*) in Greek Cypriot patients with nonsyndromic hearing loss. *Genet. Test.* 2006;10:285–9
- Neocleous V, Costi C, Shammas C, Spanou E, Anastasiadou E, Tanteles GA, Phylactou LA (2014) Spectrum of *GJB2* mutations in Cypriot nonsyndromic hearing loss subjects. *J Genet* 93(2):471-6
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM<sup>®</sup>. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: \* 604418: 10/10/2014 World Wide Web URL: <https://omim.org/entry/604418>
- Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Human mutation.* 2018;39(11):1593–613
- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur. J. Hum. Genet.* 2002;10: 72–6
- Palmada M, Schmalisch K, Bohmer C, Schug N, Pfister M, Lang F, Blin N. Loss of function mutations of the *GJB2* gene detected in patients with *DFNB1*-associated hearing impairment. *Neurobiol Dis.* 2006;22(1):112-8
- Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N et al. Prevalence of *GJB2* mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2002;65:101–8

- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, Garcia Sanchez G, et al. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genetics in Medicine* 2003;5(4):295-303
- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, Sanchez GG, Liu XZ, Morell R, Nance WE. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genetics IN Medicine*. July/August 2003 ;5 :4
- Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope*. 2000;110(9):1535-8
- Perea Y, Mato J, Amores I, Ferreira R. Study of six mutations in the gjb2 gene in Cuban patients with nonsyndromic sensorineural deafness. *Biotecnología Aplicada* 2007;24:241-5
- Petersen MB, Grigoriadou M, Koutroumpe M, Kokotas H. The novel c.247\_249delTTC (p.F83del) GJB2 mutation in a family with prelingual sensorineural deafness. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2012;76: 969–71
- Popova DP, Kaneva R, Varbanova S, Popov TM. Prevalence of GJB2 mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269:1589–92
- Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, Osipova L, Claustres M, Roux AF. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Med Genet*. 2005;6:12
- Putcha GV, Bejjani BA, Bleoo S, Booker JK, Carey JC, Carson N, Das S, et al. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genetics in Medicine* 2007;9(7):413-26
- Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agsuma 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):40-4
- RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar HM, Jalvi R, Rangasayee R, Avraham KB, Anand A. Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genet* 2003;40:68
- Ricci AJ, Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R. The transduction channel filter in auditory hair cells. *Journal of Neuroscience* 2005;25(34):7831-9
- Robert JN. The Assessment of Hearing and Middle Ear Function in Children, In: Bluestone CD. Ed. *Pediatric Otolaryngology*, 4th ed. Philadelphia: Elsevier Science 2003;. p.187–230
- Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, Artieres F, et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Medical Genetics* 2004;5:5
- Salvi JR, Boettcher AF, Evans NB. Electrophysiology of the Peripheral Auditory System, In: Paparella MM, ed. *Otolaryngology*, 2 nd ed, Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1991;. p. 219–55
- Santos RL, Aulchenko YS, Huygen PL et al. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;69(2):165–74
- Santos-Sacchi J. Cell coupling in the organ of Corti. *Brain Res. Brain Res. Rev* 2000;32:167–71
- Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJ. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998;391(6662):32
- Seeman P, Bendova O, Raskova D, Malikova M, Groh D, Kabelka Z. Double heterozygosity with mutations involving both the GJB2 and GJB6 genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population. *Ann.Hum.Genet*. 2005; 69: 9-14
- Seeman P, Sakmaryova I. High prevalence of the IVS 1  $\beta$  1 G to A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of GJB2. *Clin Genet* 2006;69:410–3

- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002;110:284–9
- Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. 1999 Feb 14 [Updated 2017 Jul 27]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>, from September 2021
- Shen J, Oza AM, Del Castillo I, Duzkale H, Matsunaga T, Pandya A, Kang HP, Mar-Heyming R, Guha S, Moyer K, Lo C, Kenna M, Alexander JJ, Zhang Y, Hirsch Y, Luo M, Cao Y, Wai Choy K, Cheng YF, Avraham KB, Hu X, Garrido G, Moreno-Pelayo MA, Greinwald J, Zhang K, Zeng Y, Brownstein Z, Basel-Salmon L, Davidov B, Frydman M, Weiden T, Nagan N, Willis A, Hemphill SE, Grant AR, Siegert RK, DiStefano MT, Amr SS, Rehm HL, Abou Tayoun AN. Consensus interpretation of the p.Met34Thr and p.Val37Ile variants in GJB2 by the ClinGen Hearing Loss Expert Panel. ClinGen Hearing Loss Working Group. *Genet Med*. 2019 Nov;21(11):2442-52
- Shi GZ, Gong LX, Xu XH, Nie WY, Lin Q, Qi YS. GJB2 gene mutations in newborns with non-syndromic hearing impairment in Northern China. *Hear Res*. 2004;197(1-2):19-23
- Simpson C, Kelsell DP, Marche's O. Connexin 26 facilitates gastrointestinal bacterial infection in vitro. *Cell Tissue Res* 2013;351:107–16
- Sirmaci A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *Journal of Genetics* 2006;85(3):213-6
- Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview- GeneReviews™ - NCBI Bookshelf
- Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2005;77:945–57
- Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000;106:50–7
- Spicer SS, Schulte BA. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hearing Research* 1998;118(1-2):1-12
- Srinivas M, Verselis VK, White TW. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochimica et Biophysica Acta* 2018;1860:192–201
- Stauffer EA, Holt JR. Sensory transduction and adaptation in inner and outer hair cells of the mouse auditory system. *Journal of Neurophysiology* 2007;98(6):3360-9
- Sukarova Stefanovska E, Momirovska A, Cakar M, Efremov GD. GJB2 mutations in non syndromic hearing loss in the Republic of Macedonia. *BJMG* 2009;12/2:11-6
- Šumarac Pavlović D i Mijić M. *Elektroakustika*. Univerzitet u Beogradu:Elektrotehnički fakultet, 2017.
- Sun Y, Tang W, Chang Q, Wang Y, Kong W, Lin X. Connexin30 null and conditional connexin26 null mice display distinct pattern and time course of cellular degeneration in the cochlea. *J. Comp. Neurol.* 2009;516:569–79
- Tang HY, 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. *Am J Med Genet A*. 2006 November 15;140(22):2401–15



- Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat.* 2003;21:552–3
- Tekin M, Xia XJ, Erdenetungalag R, Cengiz FB, White TW, Radnaabazar J, Dangaasuren B, et al. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann Hum Genet.* 2010;74(2):155-64
- Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J. Homo sapiens gene GJB2, encoding gap junction protein, beta 2, 26kDa. AceView: integrative annotation of cDNA-supported genes in human, mouse, rat, worm and Arabidopsis. 2010. Retrieved April 13, 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&term=GJB2>
- Thonissen E, Rabionet R, Arbones ML, Estivill X, Willecke K, Ott T. Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet.* 2002;111(2):190-7
- Toth T, Kupka S, Esmer H, et al. Frequency of the recessive 30delG mutation in the *GJB2* gene in Northeast-Hungarian individuals and patients with hearing impairment. *Int J Mol Med.* 2001;8:189-92
- Toth T, Kupka S, Haack B, Fazakas F, Muszbek L, Blin N, Pfister M, et al. Coincidence of mutations in different connexin genes in Hungarian patients. *Int J Mol Med.* 2007;20(3):315-21
- Toth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, Zenner H P, Muszbek L, Blin N, Pfister M, Sziklai I. GJB2 mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Northeastern Hungary. *Hum. Mutat.* 2004;23:631-2
- Tsukada K, Nishio S, Hattori M and Usami S. Ethnic-Specific Spectrum of *GJB2* and *SLC26A4* Mutations: Their Origin and a Literature Review. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 2015;124(5S): 61S–76
- Usami SI, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: Special reference to the A1555G mutation. *Journal of Communication Disorders* 1998;31(5):423-35
- Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet.* 2003;64:65–9
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. <https://hereditaryhearingloss.org>, from September 2021
- Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, Chamberlin GP, Houseman M, Taylor GR, Van de Heyning CM, Franssen E, Rowland J, Cucci RA, Smith RJ, Van Camp G. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001;38:515–8
- Vinken M. Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology, *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72:2775–8
- Vuckovic D, Dallapiccola B, Franze A, Mauri L, Perrone MD, Gasparini P. Connexin 26 variant carriers have a better gastrointestinal health: is this the heterozygote advantage? *European Journal of Human Genetics* 2015;23:563–4
- Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH, Wu CY, Chen MS, Huang PC. Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem* 2003;84(4):735-42
- Wang Y, Chang Q, Tang W, Sun Y, Zhou B, Li H, et al. Targeted con-nexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of corti. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2009;385:33–7
- Wangemann P. K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hearing Research* 2002;165(1-2):1-9

- Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *The Journal of Physiology* 2006;576(1):11-21
- White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL. Goodenough, Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins, *J. Cell Biol.* 1994;125: 879–92
- Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A et al. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cisregulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. *Clin Genet* 2010;78:267-74
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. *Hum Genet* 2000;106:399–405.
- Willecke K, Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: \* 604418: 10/10/2014 World Wide Web URL: <https://omim.org/entry/604418>
- Wingard JC and Zhao HB. Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss – a common hereditary deafness. *Front. Cell. Neurosci.* 2015;9:202
- Wiszniewska J, Wiszniewski W, Bal J. The principles of molecular diagnosis of recessive forms of prelingual non-syndromic hearing loss. *Med. Wieku. Rozwoj* 2002;6:309-18
- Wiszniewski W, Sobieszczanska-Radoszewska L, Nowakowska-Szyrwinska E, et al. High frequency of *GJB2* gene mutations in Polish patients with prelingual nonsyndromic deafness. *Genet Test* 2001;5:147-8
- Wu BL, Kenna M, Lip V, Irons M, Platt O. Use of a multiplex PCR/sequencing strategy to detect both connexin 30 (*GJB6*) 342 kb deletion and connexin 26 (*GJB2*) mutations in cases of childhood deafness. *Am J Med Genet A* 2003;121A(2):102–8
- Yan D, Park HJ, Ouyang XM, Pandya A, Doi K, Erdenetungalag R, Du LL, Matsushiro N, Nance WE, Griffith AJ, Liu XZ. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of *GJB2* (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet* 2003;114:44–50
- Yuan Y, You Y, Huang D, Cui J, Wang Y, Wang Q, Yu F, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. *Journal of Translational Medicine* 2009;7:79
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997;6(9):1605-9
- Zhao HB and Santos-Sacchi J. Voltage gating of gap junctions in cochlear supporting cells: evidence for nonhomotypic channels. *J. Membr. Biol.* 2000;175:17–24
- Zhao HB and Yu N. Distinct and gradient distributions of connexin26 and connexin30 in the cochlear sensory epithelium of guinea pigs. *J. Comp. Neurol.* 2000;499:506–8
- Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, White TW. Gap Junctions and Cochlear Homeostasis. *J Membr Biol.* 2006;209(2-3):177–86
- Zhao HB, Yu N, Fleming CR. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:18724–9
- Zhao HB. Directional rectification of gap junctional voltage gating between Deiters cells in the inner ear of guinea pig. *Neurosci. Lett.* 2000;296:105–8
- Zheng J, Ying Z, Cai Z, Sun D, He Z, Gao Y, Zhang T, Zhu Y, Chen Y, Guan MX. *GJB2* Mutation Spectrum and Genotype- Phenotype Correlation in 1067 Han Chinese Subjects with Non-Syndromic Hearing Loss. *PLoS One* 2015;10(6):e0128691

- Zoll B, Petersen L, Lange K, Gabriel P, Kiese-Himmel C, Rausch P, et al. Evaluation of Cx26/GJB2 in German hearing impaired persons: mutation spectrum and detection of disequilibrium between M34T (c.101T>C) and -493del10. *Hum Mutat* 2003;21(1):98

Internet strane:

- <http://davinci.crg.es/deafness> The Connexin - deafness Homepage (pristupljeno 2019.godine)
- <https://hereditaryhearingloss.org> Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage (pristupljeno september 2021. godine)
- <https://omim.org/entry/604418> Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: \* 604418: 10/10/2014 (pristupljeno 2022. godine)
- <https://omim.org/entry/604418> Willecke K, Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: \* 604418: 10/10/2014 (pristupljeno 2022. godine)
- [https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select\\_db=GJB2](https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select_db=GJB2) LOVD- *Leiden Open Variation Database*. CCHMC Molecular Genetics Laboratory Mutation Database; gap junction protein, beta 2, 26kDa (GJB2) (pristupljeno 2019. godine)
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/> Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. 1999 Feb 14 [Updated 2017 Jul 27]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. (pristupljeno september 2021. godine)

## BIOGRAFIJA AUTORA

Bojana J. Dobrić je rođena 01.03.1986. godine u Smederevu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu u Beogradu (srednja ocena 8,06) u novembru 2011. godine, na studijskoj grupi: molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena genetika. Diplomski rad pod nazivom: „Detekcija delecije kratkog kraka hromozoma 1 kod bolesnika sa neuroblastomom”, odbranila je sa ocenom 10.

Od avgusta 2013. godine zaposlena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku Intituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije «Dr Vukan Čupić» (IMD), gde radi na poslovima postnatalne i prenatalne citogenetičke dijagnostike hromozomopatija, kao i prenatalnoj i postnatalnoj molekularno genetičkoj dijagnostici monogenskih oboljenja. Jedan je od članova Genetičkog savetovališta IMD-a.

Specijalističke akademske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu završila je u novembru 2014. godine (srednja ocena 10) na smeru Genetika. Specijalistički rad pod nazivom: „Citogenetička i molekularno genetička istraživanja uzroka muškog steriliteta u uzorku pacijenata iz Srbije”, odbranila je sa ocenom 10.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu upisala je 2014. godine u oblasti Biologije, modul: Genetika. Tokom oktobra 2017. godine se obučavala za izvođenje i interpretaciju rezultata genetičkih analiza primenom metode sekvenciranja na Odeljenju molekularne genetike, funkcije i terapije, Instituta za neurologiju i genetiku Kipra, Nikozija, Kipar.

Poster prezentacije radova iz oblasti dijagnostike hromozomopatija i molekularno genetičke dijagnostike monogenskih oboljenja imala je na 5 simpozijuma, dok je objavila jedan rad kao prvi autor iz oblasti genetičke osnove muškog steriliteta. Iz uže naučne oblasti objavila je dva rada u časopisima međunarodnog značaja u kojima se pojavljuje kao prvi autor.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бојана Добрић

Број индекса В3031/2014

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Учесталост варијанти у генима *GJB2* и *GJB6* и фенотипска варијабилност код оболелих од несиндромско аутозомно-рецесивног оштећења слуха у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 17.04.2023.г.

Bojana Dobric

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана Добрић

Број индекса В3031/2014

Студијски програм Биологија; Генетика

Наслов рада: Учесталост варијанти у генима *GJB2* и *GJB6* и фенотипска варијабилност код оболелих од несиндромско аутозомно-рецесивног оштећења слуха у Србији

Ментори др Данијела Радивојевић, проф. др Катарина Зељић

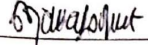
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 17.04.2023.г.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Учесталост варијанти у генима *GJB2* и *GJB6* и фенотипска варијабилност код оболелих од несиндромско аутозомно-рецесивног оштећења слуха у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 17.04.2023.г.

