

Анализ гена *SLC26A4* и его генетического окружения у пациентов с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия в Бурятии

Чердонова А.М.¹, Борисова Т.В.¹, Пшенникова В.Г.², Терютин Ф.М.², Кларов Л.А.², Никанорова А.А.², Романов Г.П.¹, Соловьев А.В.¹, Федорова С.А.¹, Барашков Н.А.²

1 – ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»
677000, г.Якутск, ул. Белинского, д. 58

2 – ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем»
677000, г. Якутск, ул. Ярославского, д. 6/3

Патогенные варианты гена *SLC26A4* ассоциированы как с аутосомно-рецессивной глухотой 4 типа (DFNB4, OMIM #600791), так и с синдромом Пендреда (PS, OMIM #274600). В настоящей работе проведен поиск каузативных вариантов гена *SLC26A4* и анализ его генетического окружения (гаплотип CEVA) у шести пациентов из Бурятии с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия (EVA), которые в части случаев были сочетаны с кистозными аномалиями улитки (IP-1 и IP-2) и с нарушением тиреоидной функции. Исследование включало клинко-аудиологический анализ порогов слуха, компьютерную томографию височных костей, анализ гормонов гипофизарно-тиреоидной системы (ТТГ, св.Т3 и св.Т4), прямое секвенирование по Сэнгеру кодирующих районов гена *SLC26A4* (21 экзон) и генотипирование 12 SNP-маркеров, составляющих гаплотип CEVA. В целом, у обследованных пациентов доля *SLC26A4* биаллельных (M2) и моноаллельных случаев в сочетании с CEVA-гаплотипом в транс-положении (M1+CEVA) составила 83,3% (5 из 6 пациентов). При этом, у пациентов бурятской этногруппы доля случаев с M2 составила 100% (3 из 3 пациентов), в то время как у русских пациентов доля случаев с M2 и M1+CEVA составила 66,6% (2 из 3 пациентов). Высокий мутационный вклад гена *SLC26A4* у пациентов бурятской этногруппы может быть связан с распространенностью в регионе озера Байкал мажорных вариантов этого гена с.919-2A>G (IVS7-2A>G) и с.2027T>A p.(Leu676Gln), характерных для ряда регионов Сибири и Восточной Азии. Идентификация гаплотипа CEVA в транс-положении у одного русского пациента с моноаллельным вариантом гена *SLC26A4* (M1+CEVA), свидетельствует об актуальности дальнейшей оценки диагностической значимости CEVA-гаплотипа в когортах российских пациентов с нарушениями слуха.

Ключевые слова: потеря слуха, аномалии внутреннего уха, расширение водопровода преддверия (EVA), неполное разделение улитки (IP-1 и IP-2), нарушение тиреоидной функции, синдром Пендреда, ген *SLC26A4*, CEVA-гаплотип, Бурятия.

Для цитирования: Чердонова А.М., Борисова Т.В., Пшенникова В.Г., Терютин Ф.М., Кларов Л.А., Никанорова А.А., Романов Г.П., Соловьев А.В., Федорова С.А., Барашков Н.А. Анализ гена *SLC26A4* и его генетического окружения у пациентов с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия в Бурятии. *Медицинская генетика* 2023; 22(7): 51-60.

Автор для корреспонденции: Барашков Н.А.; e-mail: barashkov2004@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии в популяциях Республики Саха (Якутия) и Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2023-0003).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.07.2023

Analysis of the *SLC26A4* gene including its genetic background in patients with hearing impairments and an enlarged vestibular aqueduct from Buryatia

Cherdonova A.M.¹, Borisova T.V.¹, Pshennikova V.G.², Teryutin F.M.², Klarov L.A.², Nikanorova A.A.², Romanov G.P.¹, Solovyev A.V.¹, Fedorova S.A.¹, Barashkov N.A.²

1 – North-Eastern Federal University
58 Belinsky st., Yakutsk, 677000, Russian Federation

2 – Yakut Science Centre of Complex Medical Problems
6/3 Yaroslavsky st., Yakutsk, 677018, Russian Federation

Pathogenic variants of the *SLC26A4* gene are associated with both autosomal recessive deafness type 4 (DFNB4, OMIM #600791) and Pendred syndrome (PS, OMIM #274600). In this work, we searched for causative variants of the *SLC26A4* gene and its genetic background (CEVA haplotype) in six patients in Buryatia with hearing impairments and an enlarged vestibular aqueduct (EVA), which in some cases was combined with cystic cochlear anomalies (IP-1 and IP-2) and with impaired thyroid function. The study included clinical and audiological analyses of hearing thresholds, computed tomography of the temporal bones, analysis of hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (TSH, free T3 and free T4), direct Sanger sequencing of the coding regions of the *SLC26A4* gene (21 exons) and genotyping of 12 SNPs markers of the CEVA haplotype. In general, among the studied patients, the proportion of *SLC26A4* biallelic (M2) and monoallelic cases in combination with the CEVA haplotype in trans-position (M1+CEVA) was 83.3% (5 of 6 cases). At the same

time, in Buryat patients, the proportion of cases with M2 was 100% (3 out of 3 cases), while in Russian patients, the proportion of cases with M2 and M1 + CEVA was 66.6% (2 out of 3 cases). The high contribution of the *SLC26A4* gene in Buryat patients may be associated with the prevalence of the major variants of this gene c.919-2A>G (IVS7-2A>G) and c.2027T>A p.(Leu676Gln) common for regions of Siberia and Eastern Asia. Identification of the CEVA haplotype in trans-position in one Russian patient with a monoallelic variant of the *SLC26A4* gene (M1+CEVA) indicates the relevance of further assessment of the diagnostic significance of the CEVA haplotype in cohorts of Russian patients with hearing impairments.

Keywords: hearing loss, inner ear anomalies, enlarged vestibular aqueduct (EVA), incomplete partition of the cochlea (IP-1 and IP-2), thyroid dysfunction, Pendred syndrome, *SLC26A4* gene, CEVA haplotype, Buryatia.

For citation: Cherdonova A.M., Borisova T.V., Pshennikova V.G., Teryutin F.M., Klarov L.A., Nikanorova A.A., Romanov G.P., Solovyev A.V., Fedorova S.A., Barashkov N.A. Analysis of the *SLC26A4* gene including its genetic background in patients with hearing impairments and an enlarged vestibular aqueduct from Buryatia. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(7): 51-60. (In Russ.)

Corresponding author: Barashkov N.A.; **e-mail:** barashkov2004@mail.ru

Funding. This work was supported by research work of the YSC CMP "Study of the genetic structure and burden of hereditary pathology in the populations of the Republic of Sakha (Yakutia)" and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (FSRG-2023-0003).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 03.07.2023

Введение

Аутосомно-рецессивная глухота 4 типа (DFNB4, OMIM #600791) — наследственное заболевание, характеризующееся сенсоневральной потерей слуха в сочетании со специфическими аномалиями внутреннего уха [1–6]. Одной из наиболее характерных для данной патологии мальформаций височной кости является расширение водопровода преддверия (EVA — Enlarge Vestibular Aqueduct) [7, 8]. В части случаев EVA может сочетаться с кистозными кохлеарными аномалиями, которые дифференцируются на два типа неполного разделения улитки (IP-1 и IP-2) [9, 10]. Принято считать, что патогенные варианты в гене *SLC26A4* ответственны не только за DFNB4 (OMIM #600791), но и за синдром Пендреда, который имеет неполную пенетрантность — около 40% (PS, OMIM #274600). Неполная пенетрантность PS выражается в том, что у части пациентов, врожденная сенсоневральная тугоухость, варьирующая от легкой степени до глухоты, может сочетаться с дефектом органификации йода, что со временем (подростковый возраст и старше) может приводить к значимым нарушениям тиреоидной функции (чаще к многоузловому зобу) [11, 12].

Ген *SLC26A4* расположен на 7 хромосоме в локусе 7q22–q31, содержит 21 экзон и кодирует трансмембранный белок, известный как пендрин (PDS), который экспрессируется во внутреннем ухе, щитовидной железе, почках и эпителии дыхательных путей [2, 13–18]. Пендрин состоит из 780 аминокислот, образующих 12–14 ТМ-сегментов, включая сегмент внутриклеточного функционального домена STAS (антагонист сульфатного пе-

реносчика и анти-сигма-фактора) [19, 20]. Считается, что патогенные варианты в гене *SLC26A4* приводят к потере функциональной активности белка PDS, что во время эмбрионального развития нарушает гомеостаз эндолимфатической жидкости во внутреннем ухе. Ионный дисбаланс создает разницу давления, что приводит не только к дегенерации сенсорных волосковых клеток, но и к антенатальному образованию EVA, которое связано с переполнением жидкостью эндолимфатического мешка, что давит на костные структуры водопровода преддверия и приводит к их расширению и иногда к деформациям улитки [21, 22].

Спектр и частота патогенных вариантов гена *SLC26A4* варьируют в разных популяциях [23–41]. Наименьшая распространенность патогенных вариантов гена *SLC26A4* выявлена в популяциях Восточной Азии (Монголия, Китай, Корея и Япония) [23, 24, 29–33, 35–37, 39–41]. Около 65–95% восточноазиатских пациентов с EVA имеют биаллельные патогенные варианты в гене *SLC26A4* [23, 24, 29, 31–33, 35–41]. Высокая распространенность некоторых вариантов гена *SLC26A4* в Восточной Азии, вероятно, объясняется эффектом основателя [23, 34, 35]. Распространенность патогенных вариантов гена *SLC26A4* в Европе и Северной Америке значительно ниже: около 28% всех случаев с EVA связаны с биаллельными вариантами гена *SLC26A4*, 19,5% приходится на моноаллельные случаи и 50% приходится на случаи, в которых не обнаруживаются клинически значимых изменений в нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4* [42, 43]. В ряде сообщений у пациентов с мо-

ноаллельными вариантами гена *SLC26A4* сочетания патогенных вариантов гена *SLC26A4* и генов *FOXI1/KCNJ10* были интерпретированы как случаи дигенного наследования [44, 45]. Однако последующие работы не подтвердили значимость данных дигенных сочетаний [46–50], а их вклад оценивается не более 1% среди всех пациентов с EVA [42, 43]. Недавно было опубликовано сообщение о дигенном наследовании вариантов генов *SLC26A4* и *EPHA2* при PS в Японии [52], однако вклад подобных случаев в мире пока не оценен.

Более вероятно, что относительно низкий мутационный вклад гена *SLC26A4* у пациентов из Западной Евразии (~28% биаллельных случаев) по сравнению с пациентами из Восточной Евразии (65–95% биаллельных случаев) может быть связан с различным генетическим окружением гена *SLC26A4* [42, 43]. Некоторые авторы предполагают, что у больных с моноаллельными вариантами гена *SLC26A4* может присутствовать неидентифицированный вариант в транс-положении с дефектным аллелем в регуляторной области гена *SLC26A4* [53–55]. В соответствии с этим предположением группа исследователей под руководством профессора Гриффита в 2017 г. сообщила об идентификации специфического гаплотипа CEVA (Caucasian EVA), обнаруженного у пациентов европеоидного происхождения, содержащего 12 однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), охватывающих область 613000 п.н., выше кодирующего района гена *SLC26A4* [56]. Некоторые из SNP-вариантов являются межгенными, а остальные обнаруживаются в интронных областях других генов, включая *BCAP29*, *DUS4L*, *COG5*, *HBPI* и *PRKAR2B*, которые этиопатогенетически не могут быть связаны с фенотипом EVA [56]. Несмотря на это, гаплотип CEVA был выявлен с высокой частотой у пациентов с моноаллельными вариантами в гене *SLC26A4* (7 из 10 хромосом), и крайне редко обнаруживался на нормальных хромосомах (28 на 1006) ($p < 0,0001$) [56]. Гаплотип CEVA также был обнаружен на 11 из 126 хромосом в когорте *SLC26A4*-негативных пациентов с EVA, что значительно выше, чем частота в контрольной группе ($p = 0,0042$) [56]. Сильное сцепление данного гаплотипа с фенотипом EVA позволило интерпретировать наличие CEVA-гаплотипа в транс-положении как «второй» рецессивный мутантный аллель [56]. Авторами сообщалось, что CEVA-гаплотип «закрывает» примерно половину всех моноаллельных случаев и 4,8% всех неидентифицированных случаев с EVA в некоторых когортах пациентов европеоидного происхождения (Дания и США) [56].

В настоящей работе проведен поиск каузативных вариантов гена *SLC26A4* и его специфического гене-

тического окружения (гаплотип CEVA) у шести пациентов в Бурятии с нарушениями слуха и расширенным вестибулярным водопроводом преддверия (EVA), которое в части случаев было сочетано с кистозными аномалиями улитки (IP-1 и IP-2) и с нарушением тиреоидной функции.

Методы

Пациенты. Проведено обследование 95 пациентов с нарушениями слуха. Возраст пациентов варьировал от 19 до 82 лет. Средний возраст женщин и мужчин составил 53,2 и 43 года, соответственно. По национальному составу доли бурят и русских составили – 45,3% и 46,3%, соответственно. Большинство пациентов имели двустороннюю глухоту (68,4%) с манифестацией потери слуха от 0 до 11 лет, 97,8%. Обследования, предусмотренные рамками данной научно-исследовательской работы, проводились после информированного письменного согласия участников. Данная работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП в 2019 г. (г. Якутск, протокол №7 от 27 августа 2019 г.).

Аудиологический анализ. Аудиологическое исследование состояния слуха было проведено методом тональной пороговой аудиометрии на аудиометре «AA222» (Interacoustics, Denmark). Степень потери слуха оценивали по порогам слышимости лучше слышащего уха в речевом диапазоне частот 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 кГц по международной классификации, согласно которой I степень тугоухости соответствует 26–40 дБ, II степень – 41–55 дБ, III степень – 56–70 дБ, IV степень – 71–90 дБ, глухота >90 дБ.

КТ височных костей. Состояние пирамиды височных костей оценивалось на КЛКТ томографе «KaVo-OP300 Maxio» в центре рентген-диагностики «Voxel» (г. Улан-Удэ). Верификация результатов КЛКТ проведена на компьютерном томографе «Toshiba Aquilion 16» в спиральном режиме (шаг продвижения стола 0,5 мм) на базе «Клиническая больница РЖД – Медицина» (г. Улан-Удэ). Использовали имеющиеся классификации аномалий височной кости [8–10].

ИФА-анализ св.Т3, св.Т4 и ТТГ. ИФА-анализ гормонов щитовидной железы у 95 пациентов (свободного трийодтиронина (св.Т3), свободного тироксина (св.Т4) и тиреотропного гормона (ТТГ)) проведен на базе клинико-диагностической лаборатории Республиканской клинической больницы им. Н.А.Семашко (г. Улан-Удэ). Для определения концентрации циркулирующих в крови ТТГ, св.Т3 и св.Т4 использовали следующие имму-

ноферментные наборы: Т3 свободный-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест») (чувствительность: 0,5 пмоль/мл; диапазон измерений: 0-20 пмоль/мл); Т4 свободный-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест») (чувствительность: 0,5 пмоль/мл; диапазон измерений: 0-80 пмоль/мл); ТТГ-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест») (чувствительность: 0,05 мМЕ/л; диапазон измерений: 0-16 мМЕ/л). Измерение концентраций ТТГ, св.Т3 и св.Т4 было проведено на микротитровальном планшет-ридере VICTORX5 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer Inc., США).

Анализ гена *SLC26A4*. Поиск каузативных вариантов в гене *SLC26A4* (21 экзон) проведен методом прямого секвенирования по Сэнгеру кодирующих районов гена с захватом интрон-экзонных областей с использованием олигонуклеотидных праймеров, описанных ранее [2]. Определение первичной нуклеотидной последовательности в исследуемых выборках выполнено на генетическом анализаторе ABI Prism 3130XL («Applied Biosystems», USA) с помощью набора реагентов Big DYEamic TM (ET terminator cycle sequencing premix kit) («Amersham Pharmacia Biotech», Sweden). Для определения первичной структуры ДНК продукты ПЦР были подвергнуты очистке на магнитных частицах с использованием роботизированной станции ТЕКАН, гель-фильтрацией через колонку с сорбентом с последующей ферментативной реакцией секвенирования по Сэнгеру. Для расшифровки секвенограмм использован пакет компьютерных программ «Chromas» (Version 2.0). Выравнивание нуклеотидной последовательности секвенограмм было произведено по отношению к референсным последовательностям гена *SLC26A4*: NC_000007.14, NG_008489.1, NM_000441.2 и NP_000432.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Гаплотип CEVA. Двенадцать однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs): rs17424561, rs79579403, rs17425867, rs117113959, rs17349280, rs117386523, rs80149210, rs199667576, rs9649298, rs117714350, rs199915614 и rs150942317, входящих в структуру гаплотипа CEVA, были прогенотипированы методом ПЦР-ПДРФ анализа с последующим разделением в 2-4% агарозных гелях и прямого ПЦР анализа с последующим разделением продуктов амплификации в 9% полиакриламидном геле. Оригинальные последовательности олигонуклеотидных праймеров были подобраны с помощью программы Primer BLAST. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции для детекции гаплотипа CEVA представлены в **табл. 1**.

***SLC26A4*-статус.** По аналогии с ранее проведенными работами генотипы и их статус были определе-

ны по аллельности гена *SLC26A4* [55, 56]. Пациентам, у которых клинически значимых вариантов в данном гене не обнаружено *SLC26A4*-статус определен как М0 (нулевые случаи). Пациентам с одним патогенным аллелем в гене *SLC26A4* (сингл-гетерозиготы) присвоен статус М1 (моноаллельные случаи), а пациентам с двумя патогенными аллелями в транс-положении (гомозиготы и компаунд-гетерозиготы) – статус М2 (биаллельные случаи).

Результаты

Варианты гена *SLC26A4*

У 6 из 95 обследованных пациентов с нарушениями слуха при КТ-томографии височных костей выявлена аномалия EVA, изолированная или в сочетании с неполной перегородкой улитки (IP-1 и IP-2). Молекулярно-генетический анализ кодирующей области гена *SLC26A4* у этих шести пациентов позволил идентифицировать три различных варианта нуклеотидной последовательности, ранее известных как патогенные/вероятно патогенные: с.85G>C p.(Glu29Gln), с.919-2A>G (IVS7-2A>G) и с.2027T>A p.(Leu676Gln) (**табл. 2**).

SLC26A4-генотипы и гаплотип CEVA

Варианты гена *SLC26A4* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии были выявлены у 4 из 6 пациентов (статус М2) с аномалией EVA, изолированной или в сочетании с неполной перегородкой улитки (IP-1 и IP-2). У одного пациента патогенный вариант в гене *SLC26A4* обнаружен в сингл-гетерозиготном состоянии (статус М1), и у одного пациента патогенных вариантов в данном гене не было идентифицировано (статус М0) (**табл. 3**). Гаплотип CEVA был обнаружен у двоих пациентов с аномалией EVA. Данный специфический гаплотип обнаружен у одного пациента со статусом М2 и у одного пациента со статусом М1. Причем при анализе сегрегации у пациента с М1, гаплотип CEVA был обнаружен с транс-положением, в то время как у пациента с М2, данный гаплотип находился в цис-положении с одним из патогенных вариантов в гене *SLC26A4* (**табл. 3**). Идентификация гаплотипа CEVA в транс-положении с моноаллельным вариантом с.2027T>A p.(Leu676Gln) в гене *SLC26A4* (М1+CEVA) у пациента с двухсторонней глухотой и расширенным водопроводом преддверия (EVA) представлена на **рисунке**.

По совокупности клинических и молекулярно-генетических исследований трем аутиреоидным пациентам (уровни ТТГ, св.Т3 и св.Т4 в пределах референс-

Таблица 1. Последовательности оригинальных олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции для детекции гаплотипа CEVA**Table 1.** Sequences of the original oligonucleotide primers and restriction endonuclease for detection of the CEVA haplotype

SNP	Полиморфный участок	Олигонуклеотидные праймеры (5'-3')	Размер фрагмента, пн	Метод детекции /эндонуклеаза рестрикции
rs17424561	G>A	F: TTAGGGGAGGCAACCCATG R: GTGCAAGGCACCATGCTAGA	395	ПЦР-ПДРФ/ <i>HpySE526I</i>
rs79579403	T>C	F: TGCCACTTCAAATCTCTTGAGC R: CAACCTGGAGAGGGAGGAAA	381	ПЦР-ПДРФ/ <i>Psi I</i>
rs17425867	T>A	F: CTGTCCCCTGTAAACACCTTTT R: CCTTCTACATCTAAATAATTTGAAATCTGTTA	229	ПЦР-ПДРФ/ <i>Psi I</i>
rs117113959	T>C	F: GAGTTTGGGATGGTGGTTG R: TTATTATGAAATTTAGAAGCTGCACTACA-CAGAT	296	ПЦР-ПДРФ/ <i>EcoRV</i>
rs17349280	G>A	F: TAATAACGCTGTCTTCTTCCAGTCTTTG-TACCTT R: AGAATCGCTTGAACCCACAA	276	ПЦР-ПДРФ/ <i>BstAF I</i>
rs117386523	C>T	F: TTATACATATTACATCTGTTAATGTTAATAACC R: CATCTTGACAGCTGTTTGGA	212	ПЦР-ПДРФ/ <i>Mnl I</i>
rs80149210	A>G	F: ACACCATGAACACAGGCAAC R: CAAGTCCTTGCCTGTTTT	238	ПЦР-ПДРФ/ <i>Kzo9 I</i>
rs199667576	делеция Т	F: TGTCTAAAAGGGTAAAAGAAAACACA R: AAATTTGGAGAGCATTCAGCA	91/90	Прямой анализ ПЦР продукта
rs9649298	A>G	F: ACTCACACACAGAGGCAAAGTAGACT-CAGTTTA R: GCAAATGCTATACCCCTTGTT	281	ПЦР-ПДРФ/ <i>Dra I</i>
rs117714350	T>C	F: TGTGGGTTGGATTGTCAGGT R: GCTGCAGGCTACAGCCTATACTGTGAGC-CAGTT	122	ПЦР-ПДРФ/ <i>Ags I</i>
rs199915614	делеция Т	F: AGTATAGACTGCAGAGCTACTTTCA R: TGGAACCAACAGGACACACT	88/87	Прямой анализ ПЦР продукта
rs150942317	A>C	F: CCGCTGAAGGTGAGTTTTTC R: ATCCCCCGTCACTAGGAAGT	275	ПЦР-ПДРФ/ <i>AspS9 I</i>

Таблица 2. Характеристика выявленных вариантов в гене *SLC26A4* у пациентов с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия (EVA)**Table 2.** Characteristics of identified variants in the *SLC26A4* gene in patients with hearing impairments and an enlarged vestibular aqueduct (EVA)

Область гена		Вариант	dbSNP	Характеристика варианта	Клиническая значимость по ClinVar
Экзон	Инtron				
экзон 2	-	c.85G>C p.(Glu29Gln)	rs111033205	миссенс	патогенный
-	интрон 7	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	rs111033313	акцепторный сайт сплайсинга	патогенный
экзон 17	-	c.2027T>A p.(Leu676Gln)	rs111033318	миссенс	вероятно патогенный

ных значений) со статусом M2 и одному пациенту со статусом M1+CEVA в транс-положении подтверждена аутосомно-рецессивная глухота 4 типа (DFNB4, OMIM #600791). Одному пациенту с M2, перенесшему тотальную струмэктомию в возрасте 46 лет по поводу узлового зоба и находящемуся на заместительной терапии, подтвержден синдром Пендред (PS, OMIM #274600) (табл. 3).

Обсуждение

В настоящей работе впервые проведен поиск каузативных вариантов гена *SLC26A4* и его специфического генетического окружения (гаплотип CEVA) у шести пациентов из Бурятии с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия (EVA), которое в части случаев было сочетано с кистозными аномалиями улитки (IP-1 и IP-2) и с нарушением тиреоидной функции. Следует отметить, что эти шесть пациентов были *GJB2*-негативны, поскольку патогенных вариантов в гене *GJB2*, в том числе протяженных делеций del(*GJB6-D13S1830*), del(*GJB6-D13S1854*) и del(*GJB2-d13S175*) не было обнаружено. В целом

среди обследованных пациентов доля *SLC26A4* биаллельных (M2) и моноаллельных случаев в сочетании с CEVA-гаплотипом в транс-положении (M1+CEVA) составила 83,3% (5 из 6 пациентов). PS (OMIM #274600) выявлен у одного пациента со статусом M2, перенесшего струмэктомию по поводу узлового зоба (табл. 3). В остальных M2 и M1+CEVA случаях на момент исследования пациенты были эутиреоидны (уровни ТТГ, св.Т3, св.Т4 в пределах референсных значений), у них подтверждена аутосомно-рецессивная форма глухоты 4 типа (DFNB4, OMIM #600791). Однако по мнению некоторых авторов для выявления субклинических форм гипотиреоза (в том числе и у эутиреоидных пациентов, особенно у детей) необходимы дополнительные исследования, такие как УЗИ щитовидной железы и перхлоратный тест [43, 57-60].

У пациентов бурятыв с EVA доля биаллельных вариантов гена *SLC26A4* (M2), обнаруженных в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии, составила 100% (3 из 3), что сопоставимо с данными о высоком вкладе M2 случаев у пациентов с EVA в Монголии, Китае, Корее и Японии (65–95%) [23, 24, 29, 31-33, 35-37, 39-41]. Высокий мутационный

Таблица 3. *SLC26A4*-генотипы и CEVA-гаплотип у обследованных пациентов

Table 3. *SLC26A4* genotypes and CEVA haplotype in examined patients

№	Пол / Возраст (в годах)	Национальность	Степень потери слуха	Зоб	Гормоны щитовидной железы			Аномалии внутреннего уха		<i>SLC26A4</i> -генотипы		<i>SLC26A4</i> -статус / CEVA
					ТТГ (мМЕ/мл)	св.Т3 (пмоль/мл)	св.Т4 (пмоль/мл)	Тип IP	EVA	Аллель 1	Аллель 2	
1	М/58	русский	глухота	-	1,28	5,43	19,16	IP-2	+	c.85G>C p.(Glu29Gln)	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	M2+ CEVA
2	Ж/50	бурятка	глухота	-	1,41	5,89	17,83	IP-2	+	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	M2
3	М/26	бурят	IV степень	-	2,82	6,30	16,14	-	+	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	c.2027T>A p.(Leu676Gln)	M2
4	Ж/53	бурятка	глухота	Зоб, тотальная струмэктомия/ PS	2,65	5,29	16,61	-	+	c.919-2A>G (IVS7-2A>G)	c.2027T>A p.(Leu676Gln)	M2
5	М/63	русский	глухота	-	2,85	5,27	13,35	-	+	c.2027T>A p.(Leu676Gln)	wt	M1+ CEVA
6	Ж/64	русская	глухота	-	2,08	4,14	16,94	IP-1	+	wt	wt	M0

Примечание: EVA – расширенный водопровод преддверия (более 1,5 мм в диаметре) [7]; IP-1 – неполное разделение улитки по типу 1; IP-2 – неполное разделение улитки по типу 2; (+) аномалия выявлена, (-) аномалии не выявлено; PS – синдром Пендред; CEVA – гаплотип; референсное значение уровня ТТГ – 0,24-4,3 мМЕ/мл; св.Т3 – 3,1-6,8 пмоль/мл; св.Т4 – 12-22 пмоль/мл; M0 – клинически значимых изменений в нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4* не выявлено, M1 – моноаллельные случаи, M2 – биаллельные случаи; wt – аллель, не несущий клинически значимых изменений в нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4*.

вклад гена *SLC26A4* у пациентов бурятос с EVA может быть связан с выявлением мажорных вариантов с.919-2A>G (IVS7-2A>G) [23, 24, 29, 31-33, 35-37, 39-41] и с.2027T>A p.(Leu676Gln) [23, 29, 32, 36, 61, 62], которые распространены в Восточной Азии. Варианты с.919-2A>G (IVS7-2A>G) и с.2027T>A p.(Leu676Gln) также недавно были идентифицированы у пациентов с нарушениями слуха в Республике Тыва и Республике

Алтай [63]. Присутствие данных вариантов как в Сибири, так и в Восточной Азии, вероятно, объясняется общим происхождением всех мутантных хромосом, несущих данные варианты гена *SLC26A4*, и их последующим распространением в результате миграционных событий [51]. Исключением является Республика Саха (Якутия), где у пациентов якутов с неполной перегородкой улитки и EVA, мажорные для популя-

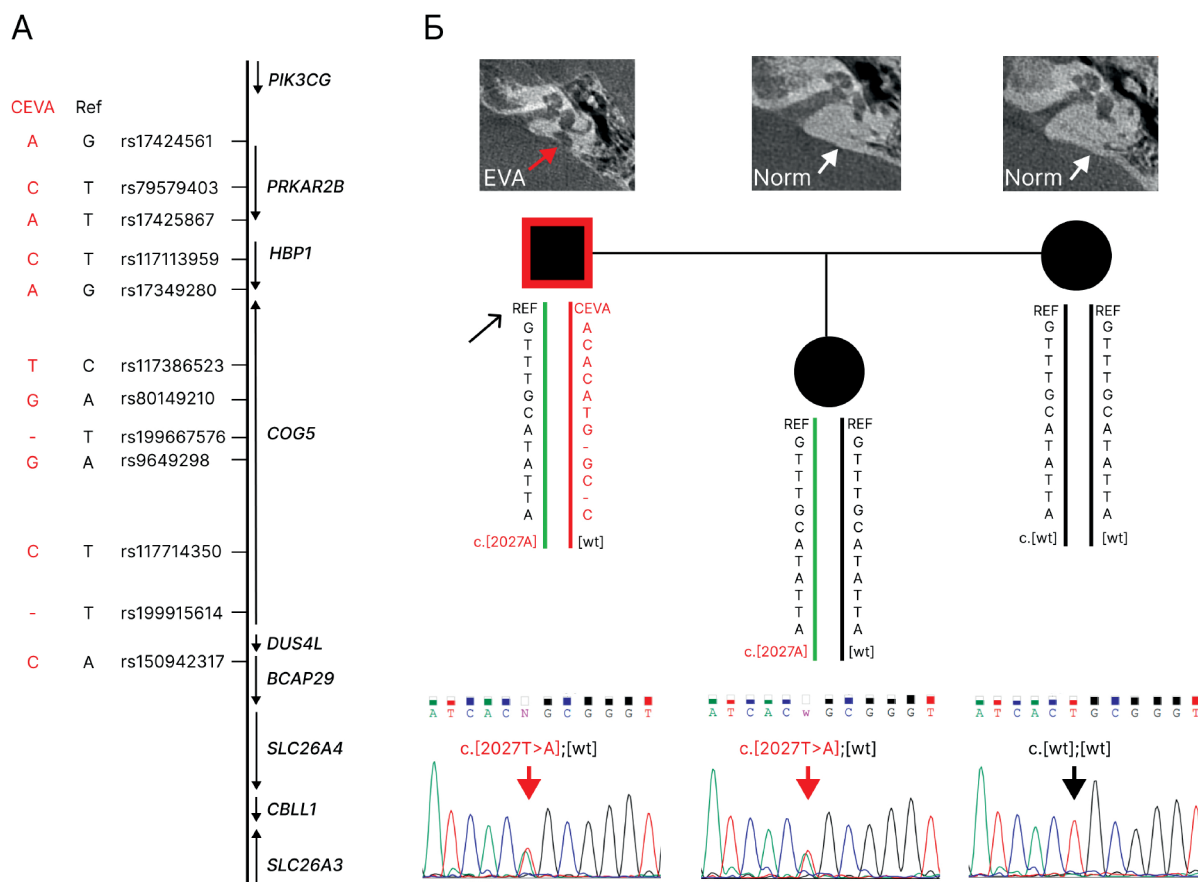


Рисунок. Идентификация гаплотипа CEVA в транс-положении с моноаллельным вариантом с.2027T>A p.(Leu676Gln) в гене *SLC26A4* (M1+CEVA) у пациента с двухсторонней глухотой и расширенным водопроводом преддверия.

Figure. Identification of the CEVA haplotype in trans-position with the monoallelic variant c.2027T>A p.(Leu676Gln) in the *SLC26A4* gene (M1+CEVA) in a patient with bilateral deafness and enlarged vestibular aqueduct.

Примечание: **A** – структура и схематические координаты гаплотипа CEVA (область неравновесия по сцеплению ~ 613000 п.н. выше кодирующей области гена *SLC26A4*) [43, 56], Ref – референсный гаплотип; **B** – фрагмент родословной трех членов семьи с нарушениями слуха: пробанд с двухсторонней глухотой и EVA (статус M1+CEVA) отмечен стрелкой, у жены и дочери пробанда причины потери слуха не определены (*GJB2* и *SLC26A4* – негативны, отсутствует EVA). Фенотип «глухота» представлен черными фигурами, фенотип EVA – черным квадратом с красным контуром. Вверху КТ снимки височных костей членов семьи: EVA – расширение водопровода преддверия, norm – сохраненные височные кости. Сегрегация хромосом у членов семьи показана цветом: хромосома с CEVA – красная, хромосомы с Ref – черные, хромосомы с мутантным аллелем с c.2027T>A p.(Leu676Gln) в гене *SLC26A4* – зеленые. Внизу хроматограммы результатов секвенирования по Сэнгеру фрагмента 17 экзона гена *SLC26A4*. Вариант с c.2027T>A p.(Leu676Gln) в гетерозиготном состоянии отмечен красной стрелкой, черной стрелкой – каноническая последовательность (wt).

ций Восточной Азии *SLC26A4*-варианты не были обнаружены [50].

У русских пациентов с EVA доля биаллельных (M2), моноаллельных (M1) и не идентифицированных случаев (M0) составила: M2 – 33,3%, M1 – 33,3% и M0 – 33,3%, соответственно. Полученные результаты в целом согласуются с данными об относительно низкой доле M2 случаев в Европе и Северной Америке (~28%) [42]. Однако в настоящее время в этих регионах мира низкий вклад *SLC26A4*-биаллельных случаев компенсируется высокой частотой идентификации специфического гаплотипа CEVA, который чаще обнаруживается в транс-положении у пациентов с M1 и реже – в гомозиготном состоянии у пациентов с M0 [56]. Гаплотип CEVA в транс-положении был идентифицирован у подавляющего большинства моноаллельных случаев в Дании – 100% (6 из 6 пациентов), Польше – 86% (6 из 7 пациентов), США – 70% (7 из 10 пациентов), Голландии – 63% (10 из 16 пациентов) и Италии – 20% (1 из 5 пациентов) [56; 64–66]. В настоящей работе CEVA-гаплотип в транс-положении, также был выявлен у одного моноаллельного пациента (M1+CEVA), что повысило мутационный вклад гена *SLC26A4* в когорте русских пациентов до 66,6% (2 из 3 пациентов). Поскольку детекция CEVA-гаплотипа в Европе и Северной Америке привела к увеличению информативности M1 случаев и части случаев с M0, полученные нами результаты свидетельствуют об актуальности дальнейшего поиска гаплотипа CEVA у пациентов с нарушениями слуха для оценки его диагностической значимости в России.

Несмотря на то, что в последние годы предпринимались попытки идентификации каузативного варианта «внутри» гаплотипа CEVA, до настоящего времени дефектный аллель не обнаружен [56, 66]. Однако у некоторых пациентов был идентифицирован укороченный CEVA-гаплотип (V1-CEVA, состоящий из 9 SNPs: rs117113959, rs17349280, rs117386523, rs80149210, rs199667576, rs9649298, rs117714350, rs199915614 и rs150942317), что потенциально уменьшает область неравновесия по сцеплению на первые три SNPs (rs17424561, rs79579403 и rs17425867) [56, 66]. Исследователи полагают, что дефектный аллель может косегрегировать с гаплотипом CEVA, или же, возможно, что один или несколько из 9 SNPs, входящих в структуру V1-CEVA, затрагивают неизвестные регуляторные элементы гена *SLC26A4*, способствуя снижению его экспрессии [43, 56, 66]. Генотип-фенотипический анализ случаев с CEVA позволил предположить, что несмотря на то, что данный гаплотип дей-

ствует как патогенный рецессивный аллель, он в большей степени связан с менее тяжелыми слуховыми и тиреоидными фенотипами, чем аллели с вариантами, затрагивающими кодирующие области или сайты сплайсинга гена *SLC26A4* [67]. В свою очередь, это косвенно подтверждает предположение о том, что ключевой патогенетический механизм действия CEVA-гаплотипа связан со снижением экспрессии гена *SLC26A4* [67]. Авторы считают, что CEVA можно рассматривать как генетический модификатор, который опосредованно связан с другими факторами [67]. Известно, что пять нуклеотидов гаплотипа CEVA совпадают со специфичными сайтами связывания транскрипционного фактора, кодируемого геном *FOXI1*, который в настоящее время является одним из приоритетных генов-кандидатов, которые могут влиять на регуляцию экспрессии гена *SLC26A4* [66]. Однако, по мнению некоторых авторов, для успешного поиска дефектного аллеля, связанного с регуляцией экспрессии гена *SLC26A4*, в настоящее время не хватает данных о функциональной характеристике его геномной архитектуры [66].

Заключение

В результате проведенных исследований выявлено, что в Бурятии у пациентов с нарушениями слуха и расширенным водопроводом преддверия (EVA) доля биаллельных (M2) и моноаллельных случаев в сочетании с гаплотипом CEVA в транс-положении (M1+CEVA) составила 83,3% (5 из 6 пациентов). При этом доля *SLC26A4* биаллельных вариантов у пациентов бурятов (M2) составила 100%, что согласуется с данными о повышенном вкладе M2 случаев у пациентов в ряде регионов Восточной Азии. Доля случаев M2 и M1+CEVA у русских пациентов составила 66,6%, что свидетельствует об актуальности дальнейшего поиска CEVA-гаплотипа в когортах пациентов с нарушениями слуха для оценки его диагностической значимости в России.

Литература/References

1. Baldwin C.T., Weiss S., Farrer L.A., et al. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 1637–1642. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.9.1637>.
2. Everett L.A., Glaser B., Beck J.C., et al. Pendred Syndrome Is Caused by Pathogenic variants in a Putative Sulphate Transporter Gene (PDS). *Nat. Genet.* 1997; 17: 411–422. <https://doi.org/10.1038/ng1297-411>.
3. Abe S., Usami S., Hoover D.M., et al. Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 82: 322–328.

4. Li X.C., Everett L.A., Lalwani A.K., et al. A pathogenic variant in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* **1998**; 18: 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng0398-215>.
5. Usami S., Abe S., Weston M.D., et al. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS pathogenic variants. *Hum. Genet.* **1999**; 104: 188–192. doi: 10.1007/s004390050933.
6. Campbell C., Cucci R.A., Prasad S., et al. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel pathogenic variants and possible genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* **2001**; 17: 403–411. <https://doi.org/10.1002/humu.1116>.
7. Valvassori G.E., Clemis J.D. The large vestibular aqueduct syndrome. *Laryngoscope* **1978**; 88: 723–728. <https://doi.org/10.1002/lary.1978.88.5.723>.
8. Jackler R.K., Luxford W.M., House W.F. Congenital Malformations of the Inner Ear: A Classification Based on Embryogenesis. *Laryngoscope* **1987**; 97: 2–14. <https://doi.org/10.1002/lary.5540971301>.
9. Sennaroglu L., Saatci I. A New Classification for Cochleovestibular Malformations. *Laryngoscope* **2002**; 112: 2230–2241. <https://doi.org/10.1097/00005537-200212000-00019>.
10. Sennaroglu L., Bajin M.D. Classification and Current Management of Inner Ear Malformations. *Balkan Med. J.* **2017**; 34: 397–411. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2017.0367>.
11. Pendred V. Deaf-mutism and goitre. *The Lancet.* **1896**; 148: 532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)74403-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)74403-0)
12. Fraser G.R. Association of congenital deafness with goitre (pendred's syndrome): a study of 207 families. *Ann. Hum. Genet.* **1965**; 28: 201–249. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1964.tb00479.x>
13. Royaux I.E., Suzuki K., Mori A., et al. Pendrin, the Protein Encoded by the Pendred Syndrome Gene (PDS), Is an Apical Porter of Iodide in the Thyroid and Is Regulated by Thyroglobulin in FRTL-5 Cells. *Endocrinology.* **2000**; 141: 839–845. <https://doi.org/10.1210/endo.141.2.7303>.
14. Royaux I.E., Wall S.M., Karniski L.P., et al. Pendrin, Encoded by the Pendred Syndrome Gene, Resides in the Apical Region of Renal Intercalated Cells and Mediates Bicarbonate Secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**; 98: 4221–4226. <https://doi.org/10.1073/pnas.071516798>.
15. Scott D.A., Wang R., Kreman T.M., et al. The Pendred Syndrome Gene Encodes a Chloride-Iodide Transport Protein. *Nat. Genet.* **1999**; 21: 440–443. <https://doi.org/10.1038/7783>.
16. Scott D.A., Karniski L.P. Human Pendrin Expressed in *Xenopus* Laevis Oocytes Mediates Chloride/Formate Exchange. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2000**; 278: 207–211. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.1.C207>.
17. Soleimani M. Molecular physiology of the renal chloride-formate exchanger. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2001**; 10: 677–683. <https://doi.org/10.1097/00041552-200109000-00020>.
18. Pedemonte N., Caci E., Sondo E., et al. Thiocyanate transport in resting and IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels. *J Immunol* **2007**; 178: 5144–5153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5144>
19. Dossena S., Bernardinelli E., Sharma A.K., et al. The Pendrin Polypeptide. In *The Role of Pendrin in Health and Disease*. Springer: Cham. **2017**; 187–220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43287-8_11.
20. Циркин В.И., Трухина С.И., Трухин А.Н. Нейрофизиология: физиология сенсорных систем: учебник для вузов. Москва: Издательство Юрайт, 2020: 459 с.
21. Griffmann P. The role of pendrin in the development of the murine inner ear. *Cell Physiol Biochem* **2011**; 28: 527–534. <https://doi.org/10.1159/000335113>
22. Griffith A.J., Wangemann P. Hearing loss associated with enlargement of the vestibular aqueduct: mechanistic insights from clinical phenotypes, genotypes, and mouse models. *Hear Res* **2011**; 281: 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.05.009>
23. Park H.-J., Shaukat S., Liu X.-Z., et al. Origins and Frequencies of SLC26A4 (PDS) Pathogenic variants in East and South Asians: Global Implications for the Epidemiology of Deafness. *J. Med. Genet.* **2003**; 40: 242–248. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.4.242>.
24. Tsukamoto K., Suzuki H., Harada D. et al. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) pathogenic variants in Pendred Syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: A unique spectrum of pathogenic variants in Japanese. *Eur. J. Hum. Genet.* **2003**; 11: 916–922. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201073>.
25. Blons H., Feldmann D., Duval V., et al. Screening of SLC26A4 (PDS) gene in Pendred's syndrome: A large spectrum of pathogenic variants in France and phenotypic heterogeneity. *Clin. Genet.* **2004**; 66: 333–340. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00296.x>.
26. Hutchin T., Coy N.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: 506–512. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00539.x.
27. Pryor S.P., Demmler G.J., Madeo A.C., et al. Investigation of the Role of Congenital Cytomegalovirus Infection in the Etiology of Enlarged Vestibular Aqueducts. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2005**; 131: 388–392. <https://doi.org/10.1001/archotol.131.5.388>.
28. Albert S., Blons H., Jonard L., et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **2006**; 14: 773–779. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201611.
29. Guo Y.F., Liu X.W., Guan J., et al. GJB2, SLC26A4 and mitochondrial DNA A1555G pathogenic variants in prelingual deafness in Northern Chinese subjects. *Acta Otolaryngol.* **2008**; 128: 297–303. doi: 10.1080/00016480701767382.
30. Pourová R., Janousek P., Jurovcík M., et al. Spectrum and frequency of SLC26A4 pathogenic variants among Czech patients with early hearing loss with and without Enlarged Vestibular Aqueduct (EVA). *Ann. Hum. Genet.* **2010**; 74: 299–307. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00581.x.
31. Pang X., Chai Y., Chen P., et al. Mono-allelic pathogenic variants of SLC26A4 is over-presented in deaf patients with non-syndromic enlarged vestibular aqueduct. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2015**; 79: 1351–1353. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.06.009.
32. Chai Y., Huang Z., Tao Z., et al. Molecular etiology of hearing impairment associated with nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct in East China. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2013**; 161: 2226–2233. doi: 10.1002/ajmg.a.36068.
33. Miyagawa M., Nishio S.Y., Usami S. Deafness Gene Study Consortium. Pathogenic variant spectrum and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients caused by SLC26A4 pathogenic variants in the Japanese: A large cohort study. *J. Hum. Genet.* **2014**; 5: 262–268. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.12>.
34. Wu C.C., Yeh T.H., Chen P.J., et al. Prevalent SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope.* **2005**; 115: 1060–1064. doi: 10.1097/01.MLG.0000163339.61909.D0.
35. Tsukada K., Nishio S.Y., Hattori M., et al. Ethnic-specific spectrum of GJB2 and SLC26A4 pathogenic variants: Their origin and a literature review. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2015**; 124 (Suppl. 1): 61–76. <https://doi.org/10.1177/0003489415575060>.
36. Erdenechuluun J., Lin Y.-H., Ganbat K., et al. Unique spectra of deafness-associated pathogenic variants in Mongolians provide in-

- sights into the genetic relationships among Eurasian populations. *PLoS ONE*. **2018**; 13: e0209797. doi: 10.1371/journal.pone.0209797.
37. Xiang Y.B., Tang S.H., Li H.Z., et al. Pathogenic variant analysis of common deafness-causing genes among 506 patients with nonsyndromic hearing loss from Wenzhou city, China. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2019**; 122: 185–190. doi: 10.1016/j.ijporl.2019.04.024.
 38. Koohiyan M. A systematic review of SLC26A4 pathogenic variants causing hearing loss in the Iranian population. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2019**; 125: 1–5. doi: 10.1016/j.ijporl.2019.06.012.
 39. Han J.J., Nguyen P.D., Oh D.Y., et al. Elucidation of the unique pathogenic variant spectrum of severe hearing loss in a Vietnamese pediatric population. *Sci. Rep.* **2019**; 9(1): 1604. doi: 10.1038/s41598-018-38245-4.
 40. Zhang M., Han Y., Zhang F., et al. Pathogenic variant spectrum and hotspots of the common deafness genes in 314 patients with nonsyndromic hearing loss in Heze area, China. *Acta Otolaryngol.* **2019**; 139: 612–617. doi: 10.1080/00016489.2019.1609699.
 41. Tian Y., Xu H., Liu D., et al. Increased diagnosis of enlarged vestibular aqueduct by multiplex PCR enrichment and next-generation sequencing of the SLC26A4 gene. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2021**; 9(8): e1734. doi: 10.1002/mgg3.1734.
 42. Roesch S., Rasp G., Sarikas A., et al. Genetic Determinants of Non-Syndromic Enlarged Vestibular Aqueduct: A Review. *Audiol. Res.* **2021**; 11(3): 423–442. doi: 10.3390/audiolres11030040.
 43. Honda K., Griffith A.J. Genetic architecture and phenotypic landscape of SLC26A4-related hearing loss. *Hum. Genet.* **2022**; 141(3–4): 455–464. https://doi.org/10.1007/s00439-021-02311-1.
 44. Yang T., Vidarsson H., Rodrigo-Blomqvist S., et al. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am. J. Hum. Genet.* **2007**; 80: 1055–1063. https://doi.org/10.1086/518314.
 45. Yang T., Gurrola J.G., Wu H., et al. Pathogenic variants of KCNJ10 together with pathogenic variants of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**; 84(5): 651–657. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.04.014.
 46. Wu C.C., Lu Y.C., Chen P.J., et al. Phenotypic analyses and pathogenic variant screening of the SLC26A4 and FOXI1 genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol. Neurotol.* **2010**; 15: 57–66. https://doi.org/10.1159/000231567.
 47. Chen K., Wang X., Sun L., et al. Screening of SLC26A4, FOXI1, KCNJ10, and GJB2 in bilateral deafness patients with inner ear malformation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2012**; 146: 972–978. https://doi.org/10.1177/0194599812439670.
 48. Pique L.M., Brennan M., Davidson C.J., et al. Pathogenic variant analysis of the SLC26A4, FOXI1 and KCNJ10 genes in individuals with congenital hearing loss. *PeerJ* **2014**; 2: e384. https://doi.org/10.7717/peerj.384.
 49. Landa P., Differ A.-M., Rajput K., et al. Lack of significant association between mutations of KCNJ10 or FOXI1 and SLC26A4 mutations in pendred syndrome/enlarged vestibular aqueducts. *BMC Med Genet.* **2013**; 14: 85. https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-85.
 50. Klarov L.A., Pshennikova V.G., Romanov G.P., et al. Analysis of SLC26A4, FOXI1, and KCNJ10 Gene Variants in Patients with Incomplete Partition of the Cochlea and Enlarged Vestibular Aqueduct (EVA) Anomalies. *International Journal of Molecular Sciences.* **2022**; 23(23): 15372. https://doi.org/10.3390/ijms232315372.
 51. Danilchenko V.Y., Zytsar M.V., Maslova E.A., et al. Insight into the Natural History of Pathogenic Variant c.919-2A>G in the *SLC26A4* Gene Involved in Hearing Loss: The Evidence for Its Common Origin in Southern Siberia (Russia). *Genes.* **2023**, 14: 928. https://doi.org/10.3390/genes14040928.
 52. Li M., Nishio S.-Y., Naruse C., et al. Digenic inheritance of mutations in *EPHA2* and *SLC26A4* in Pendred syndrome. *Nat. Commun.* **2020**; 11: 1343. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15198-9.
 53. Pryor S.P., Madeo A.C., Reynolds J.C., et al. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* **2005**; 42: 159–165. https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024208.
 54. Azaiez H., Yang T., Prasad S., et al. Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet.* **2007**; 122: 451–457. https://doi.org/10.1007/s00439-007-0415-2.
 55. Choi B.Y., Madeo A.C., King K.A., et al. Segregation of enlarged vestibular aqueducts in families with non-diagnostic SLC26A4 genotypes. *J Med Genet.* **2009**; 46: 856–861. https://doi.org/10.1136/jmg.2009.067892.
 56. Chattaraj P., Munjal T., Honda K., et al. A common SLC26A4-linked haplotype underlying non-syndromic hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct. *J. Med. Genet.* **2017**; 10: 665–673. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104721.
 57. Reardon W., Coffey R., Chowdhury T., et al. Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J. Med. Genet.* **1999**; 36: 595–598. https://doi.org/10.1136/jmg.36.8.595.
 58. Madeo A.C., Manichaikul A., Reynolds J.C., et al. Evaluation of the thyroid in patients with hearing loss and enlarged vestibular aqueducts. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **2009**; 135: 670–676. https://doi.org/10.1001/archoto.2009.66.
 59. Ladsous M., Vlaeminck-Guillem V., Dumur V., et al. Analysis of the thyroid phenotype in 42 patients with Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of the vestibular aqueduct. *Thyroid.* **2014**; 24: 639–648. https://doi.org/10.1089/thy.2013.0164.
 60. Soh L.M., Druce M., Grossman A.B., et al. Evaluation of genotype-phenotype relationships in patients referred for endocrine assessment in suspected Pendred syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**; 172:217–226. https://doi.org/10.1530/eje-14-0679.
 61. Lee H.J., Jung J., Shin J.W., et al. Correlation between genotype and phenotype in patients with bi-allelic SLC26A4 mutations. *Clin. Genet.* **2014**; 86(3): 270–275. doi: 10.1111/cge.12273.
 62. Zhao J., Yuan Y., Huang S., et al. KCNJ10 may not be a contributor to nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (NSEVA) in Chinese subjects. *PLoS ONE* **2014**; 9(11): e108134. doi: 10.1371/journal.pone.0108134.
 63. Danilchenko V.Y., Zytsar M.V., Maslova E.A., et al. Different Rates of the SLC26A4-Related Hearing Loss in Two Indigenous Peoples of Southern Siberia (Russia). *Diagnostics* **2021**; 11: 2378. doi: 10.3390/diagnostics11122378.
 64. Tesolin P., Fiorino S., Lenarduzzi S., et al. Pendred Syndrome, or Not Pendred Syndrome? That Is the Question. *Genes.* **2021**; 12(10): 1569. https://doi.org/10.3390/genes12101569.
 65. Bałdyga N., Oziębło D., Gan N., et al. The Genetic Background of Hearing Loss in Patients with EVA and Cochlear Malformation. *Genes* **2023**; 14(2): 335. https://doi.org/10.3390/genes14020335.
 66. Smits J.J., de Bruijn S.E., Lanting C.P., et al. Exploring the missing heritability in subjects with hearing loss, enlarged vestibular aqueducts, and a single or no pathogenic SLC26A4 variant. *Hum. Genet.* **2022**; 141: 465–484. doi: 10.1007/s00439-021-02336-6.
 67. Chao J.R., Chattaraj P., Munjal T. et al. SLC26A4-linked CEVA haplotype correlates with phenotype in patients with enlargement of the vestibular aqueduct. *BMC Med Genet* **2019**; 20 (1): 118. https://doi.org/10.1186/s12881-019-0853-4.