

УДК 616.28-008.14

**П.К. РАМАЗАНОВА, Ю.А. ДЖАМАЛУДИНОВ, М.З. САИДОВ**

Дагестанская государственная медицинская академия, 367000, г. Махачкала, пл. Ленина, д. 1

## Изучение генов коннексина 26 и продукции аутоантител к миелиновому (PO) белку при сенсоневральной тугоухости

**Рамазанова Патимат Курбановна** — аспирант кафедры оториноларингологии, тел. +7-960-418-08-86, e-mail: Pat.ramaz.87@mail.ru**Джамалудинов Юнускади Асхабалиевич** — доктор медицинских наук, профессор кафедры оториноларингологии, тел. +7-928-230-50-71, e-mail: UNYS@yandex.ru**Саидов Марат Зиявдинович** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, тел. +7-988-300-90-45, e-mail: marat2002@pochta.ru

На основании обследования 52 пациентов с сенсоневральной тугоухостью (СНТ) изучены частота патологических мутаций в гене коннексина 26, тип наследования этих мутаций и продукция аутоантител к миелиновому белку. Показано, что при наследственных формах (СНТ) в дагестанской популяции больных наиболее частыми мутациями в гене коннексина 26 являются мутации 35delG и 167delT. При этом доминирует аутосомно-рецессивный тип наследования до 80% случаев. Аутосомно-доминантный тип наследования наблюдался в среднем в 20% случаев. Прогрессирование СНТ связано с увеличением продукции аутоантител к миелиновому (PO) белку. При прогрессирующей ненаследственной СНТ в 36,3% случаев встречались позитивные результаты. Максимальное количество позитивных случаев в отношении наличия аутоантител наблюдается при прогрессирующей ненаследственной СНТ, что позволяет предположить патогенетическое значение аутоантител к миелиновому (PO) белку при прогрессировании тугоухости. По клинко-генеалогическим данным последние чаще встречались при аутосомно-рецессивном типе наследования.

**Ключевые слова:** сенсоневральная тугоухость, мутации в гене коннексина 26 — 35delG, 167delT и 235delC, аутоантитела к миелиновому белку.

**P.K. RAMAZANOVA, Yu.A. DZHAMALUDINOV, M.Z. SAIDOV**

Dagestan State Medical Academy, 1 Lenin Square, Makhachkala, Russian Federation, 367000

## The study of connexin 26 gene and production of autoantibodies to myelin (PO) protein at sensorineural hearing loss

**Ramazanov P.K.** — postgraduate student of the Department of Otorhinolaryngology, tel. +7-960-418-08-86, e-mail: Pat.ramaz.87@mail.ru**Dzhamaludinov Yu.A.** — D. Med. Sc., Professor of the Department of Otorhinolaryngology, tel. +7-928-230-50-71, e-mail: UNYS@yandex.ru**Saidov M.Z.** — D. Med. Sc., Professor, Head of the Department of Pathological Physiology, tel. +7-988-300-90-45, e-mail: marat2002@pochta.ru

The study included 52 patients with sensorineural hearing loss (SNHL). The frequency of pathological mutations in connexin 26 gene was studied, as well as the mode of inheritance of these mutations and the production of autoantibodies to myelin proteins. It is shown that the hereditary forms of sensorineural hearing loss in the Dagestani population, the most frequent mutations in the connexin 26 gene are 35delG and 167delT mutations. The autosomal recessive mode of inheritance dominates in up to 80% cases. The autosomal dominant mode of inheritance was observed on average in 20% cases. SNT progression is associated with the increased production of autoantibodies to myelin (PO) protein. In progressive non-hereditary SNT, there were positive results in 36.3% cases. The maximum number of positive cases (presence of autoantibodies) was observed in non-hereditary progressive SNT, which allows to suggest a pathogenetic significance of autoantibodies to myelin (PO) protein in the progression of hearing loss. According to the clinical and genealogical data, the latter were more common in autosomal recessive type of inheritance.

**Key words:** sensorineural hearing loss, mutations in connexin 26 gene — 35delG, 167delT and 235delS, autoantibodies to myelin proteins.

Одной из актуальных проблем современной оториноларингологии и сурдологии является изучение патофизиологических, генетических и иммунологических механизмов нарушения слуховой функции при сенсоневральной тугоухости (СНТ). СНТ относится к мультифакториальным заболеваниям, клиническая манифестация которых возможна при сочетании экспрессии патологических генов и воздействия экзогенных и эндогенных факторов риска. В настоящее время установлено, что патофизиологической основой атрофических и дегенеративных изменений нейроэпителлия улитки при наследственной СНТ являются мутации в гене GJB2, локализованном в области 13q11-q13 [1]. Наиболее важной является мутация 35delG, обозначающая делецию гуанина в 35-м положении в гомозиготном состоянии, приводящая к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона и нарушению синтеза белка коннексина 26, ответственного за транспорт электролитов в волосковых клетках органа Корти, что приводит к блоку звуковосприятия [2]. Кроме этого, из всех описанных мутаций гена GJB2 наиболее практически значимыми в отношении диагностики и прогноза заболевания являются мутации 167delT и 235delC, обозначающие делеции нуклеотидов тимина в 167-м положении и цитозина в 235-м положении [3, 4]. Идентификация генов коннексинов и изучение патофизиологических следствий мутаций в этих генах, зависимости от этнической принадлежности явилось прорывом в исследованиях по проблемам СНТ. Введен даже термин «коннексиновая» тугоухость, подчеркивающий фундаментальное значение этих открытий при патологии внутреннего уха. Клинические наследственная тугоухость и глухота представлена в форме синдромальных и несиндромальных вариантов с разнообразной симптоматикой.

Крайне важными с практической и научной точек зрения являются данные, доказывающие участие аутоиммунных механизмов при некоторых формах СНТ. Речь идет об индукции выработки аутоантител к РО белку, входящему в состав миелиновой оболочки клеток Шванна, присутствующих и в слуховом нерве. Показано, что у 27% пациентов с СНТ определяются антитела к РО белку, причем эти антитела чаще встречались при прогрессирующей СНТ, нежели при внезапной потере слуха [5]. Антитела к РО белку класса IgG были определены у всех больных с билатеральными формами СНТ и болезнью Меньера [6, 7]. И хотя доля подобных форм СНТ не является преобладающей, дальнейшие исследования в этом направлении являются перспективными, поскольку полученные результаты являются обоснованием для рекомендаций по использованию огромного массива современных высокотехнологичных средств и способов лечения, накопленных за последние несколько десятилетий в сфере лечения аутоиммунной патологии в целом. Не менее важным и интересным является оценка возможной связи индукции выработки аутоантител к миелиновому белку при наследственных формах СНТ с типом наследования патологических генов.

**Цель работы** — изучение частоты патологических мутаций в гене коннексина 26, типа наследования этих мутаций и продукции аутоантител в миелиновому белку при наследственных формах СНТ на дагестанской популяции.

#### Пациенты и методы

Выборки тематических пациентов были сформированы из числа учащихся МКУ школы-интерната

I и II видов г. Махачкалы. После тщательного изучения анамнестических, клинко-генеалогических данных с обязательным участием врача-генетика, а также данных аудиометрических и акустических исследований в работу были включены следующие группы больных:

— пациенты с наследственной несиндромальной СНТ, с III и IV степенью тугоухости. Пациенты этой группы имели все известные признаки наследственной природы СНТ без сопутствующих генетических обусловленных клинических синдромов (n=21);

— пациенты с ненаследственной прогрессирующей СНТ, со II и III степенью тугоухости. В эту группу включались лишь те пациенты, у которых, по данным анамнеза и родословным, наследственность не была отягощена; в кругу родителей, дедушек, бабушек, братьев, сестер и ближайших родственников случаи СНТ не отмечались. В этих случаях выяснялся вероятный этиологический фактор прогрессирования СНТ (вирусные инфекции, применение ототоксических препаратов, черепно-мозговые травмы, перенесенный менингит, сосудистые нарушения и др.) (n=19);

— пациенты с наследственной несиндромальной прогрессирующей СНТ, со II степенью тугоухости. В эту группу вошли пациенты с наследственной отягощенностью по СНТ, установленной по данным анамнеза и анализа родословных (заклечение врача-генетика) и у которых имелось прогрессирующее тугоухости под воздействием в основном указанных выше вероятных этиологических факторов (n=12).

В качестве группы сравнения были взяты пациенты с кондуктивной тугоухостью, не имеющей патогенетического родства с СНТ (n=13). Степень тугоухости и определение прогрессирования процесса проводилось на основании клинических данных, а также результатов аудиометрических исследований на аудиометре Хета. Тип наследования патологических генов верифицировался в соответствии с критериями, принятыми в практике медико-генетического консультирования.

Изучение мутаций 35delG, 167delT и 235delC в гене коннексина 26 — GJB2 проводили методом масс-спектрометрии, называемым «время-пролетная масс-спектрометрия», или MALDI TOF масс-спектрометрия [8]. MALDI TOF масс-спектрометрию проводили на установке BRUKER Autoflex III smartbeam. Наличие исследуемых мутаций регистрировалось по пику соответствующей массы олигонуклеотидов. Эта часть работы была выполнена с ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, в отделе генетики (заведующий — проф. В.М. Говорун).

Для определения аутоантител к миелиновому белку (РО) в сыворотке крови применен метод иммуноблот. С этой целью были использованы наборы ImmuBlot™ Anti-PO Antibody Western Blot компании «Immco Diagnostics», Product Code 1192. В данном методе анализа аутоантител к миелиновому белку (РО) в качестве антигена использован очищенный РО белок из нервной ткани крупного рогатого скота. Этот белок наносился на нитроцеллюлозные полоски (стрипы). В случаях, когда в исследуемой сыворотке имелись аутоантитела к РО белку, происходило специфическое взаимодействие аутоантител с РО белком на стрипе и результат этого взаимодействия визуализировался в виде горизонтальной полоски, соответствующей положению маркера — 30 kD (anti-PO). Контроль качества анализа до-



**Таблица 1.**  
Частота мутаций 35delG, 167delT, 235delC в гене GJB2 при различных типах сенсоневральной тугоухости

	Мутации в гене коннексина 26 GJB2		
	35delG	167delT	235delC
Наследственная несиндромальная СНТ, n=21	11,3%	5,6%	3,7%
Наследственная несиндромальная прогрессирующая СНТ, n=12	26%	4%	-
Прогрессирующая ненаследственная СНТ, n=19	-	-	-
Кондуктивная тугоухость, n=13	-	-	-

**Таблица 2.**  
Типы наследования патологических генов при наследственных формах СНТ по данным клинико-генеалогических исследований

	Наследственная несиндромальная СНТ, n=21	Наследственная несиндромальная прогрессирующая СНТ, n=12
Аутосомно-доминантный	4 (19%)	3 (21,4%)
Аутосомно-рецессивный	17 (81%)*	9 (78,5%)*

Примечание: \* $p < 0,05$  по Z-критерию после фи-преобразования Фишера с поправкой Йейтса

стигался путем нанесения на стрип маркера другой молекулярной массы — 116 kD (MW marker).

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программ Microsoft Excel, Stat Soft Statistica 6.1 и Biostat.exe. Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25; 75-перцентилей для каждой из исследуемых выборок. Относительная доля изучаемых показателей представлена в процентах. Достоверность различий частот изучаемого признака определяли с использованием Z-критерия после фи-преобразования Фишера с поправкой Йейтса. Достоверность отличий определяли по значению  $p$ . Критическим принятым уровнем статистической значимости  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты изучения частоты наиболее актуальных при наследственных формах СНТ мутаций во всех группах больных из дагестанской популяции представлены в табл. 1. Подчеркнем, что была изучена частота указанных мутаций в отобранных выборках больных СНТ. По этой причине полученные результаты нельзя считать результатами, относящимися к категории генетических популяционных исследований. Речь идет о зарегистрированной методом MALDI TOF масс-спектрометрии частоте наиболее актуальных мутаций в гене GJB2 в выборках больных с различными формами СНТ из дагестанской популяции. Из данных табл. 1 видно, что при наследственной несиндромальной СНТ встречаются все изученные мутации в гене GJB2 — делеция 35delG с частотой 11,3%; делеция 167delT с частотой 5,6% и делеция 235delC с частотой 3,7%. Кроме этого, были зарегистрированы нетипичные изменения в геноме обследованных больных, а именно: один случай с мутацией 358 bp, означающей некие

изменения в области 358 нуклеотида, и один случай с мутацией 14bd deletion, свидетельствующей о делеции в 14 позиции нуклеотида исследуемого гена.

При наследственной несиндромальной прогрессирующей СНТ частота делеции 35delG была выше по сравнению с группой больных с наследственной несиндромальной СНТ, она составила 26%. Мутация 167delT встречалась реже — в 4% случаях. Мутация 235delC не зарегистрирована ни в одном случае в выборке больных с наследственной несиндромальной прогрессирующей СНТ. При прогрессирующей ненаследственной СНТ, так же как и при кондуктивной тугоухости, изученные мутации не зарегистрированы. Таким образом, результаты молекулярно-генетических исследований, в целом, совпадают с клиническим диагнозом: мутации были определены в группах больных с наследственными формами СНТ.

Верификация типа наследования патологических генов позволила вывести следующие показатели. В табл. 2 представлены результаты определения типа наследования патологических генов только при достоверно установленных наследственных формах СНТ в дагестанской популяции. Видно, что и при наследственной несиндромальной СНТ, и при наследственной прогрессирующей несиндромальной СНТ превалирует аутосомно-рецессивный тип наследования генов — 81 и 78,5% соответственно. Аутосомно-доминантный тип наследования составил 19 и 21,4% соответственно. Сравнение показателей типов наследования в каждой из исследованных групп СНТ показало достоверные различия по Z-критерию между аутосомно-рецессивным и аутосомно-доминантными типами наследования ( $p < 0,05$ ). Очевидно, что прогрессирование туго-

Таблица 3.

**Частота встречаемости аутоантител к миелиновому белку (PO) у больных с наследственной несиндромальной СНТ и прогрессирующей СНТ**

	Аутоантитела к миелиновому белку (PO)
Наследственная несиндромальная СНТ, n=21	10%
Наследственная несиндромальная прогрессирующая СНТ, n=12	28,8%
Прогрессирующая ненаследственная СНТ, n=19	36,3%
Кондуктивная тугоухость, n=13	8,3%
Контрольная группа, n=5	-

Таблица 4.

**Аутоантитела к миелиновому белку (PO) у больных с наследственной несиндромальной СНТ и прогрессирующей наследственной СНТ при различных типах наследования**

	Наследственная несиндромальная СНТ, n=21		Наследственная несиндромальная прогрессирующая СНТ, n=12	
	аутосомно-рецессивный	аутосомно-доминантный	аутосомно-рецессивный	аутосомно-доминантный
Аутоантитела к миелиновому белку (PO)	84%	16%	88%	12%

ухости при наследственных формах СНТ не зависит от типа наследования патологических мутаций. Остается преобладающим аутосомно-рецессивный тип наследования. Согласно результатам популяционно-генетических исследований, отечественных и зарубежных, именно этот тип наследования наиболее актуальных патологических мутаций (35delG, 167delT и 235delC в гене коннексина 26 — GJB2) свойственен наследственным формам СНТ [2-4].

Результаты тестирования аутоантител в изученных группах больных с тугоухостью представлены в табл. 3. Из данных таблицы видно, что, во-первых, аутоантитела встречались при всех формах СНТ, меньше всего при наследственной несиндромальной СНТ и кондуктивной тугоухости и, во-вторых, прогрессирование СНТ сопровождается существенным увеличением частоты встречаемости аутоантител к миелиновому белку в 28,8 и 36,3% случаев. Незначительное количество случаев со слабо позитивными результатами по аутоантителам при наследственной несиндромальной СНТ и кондуктивной тугоухости не позволяет вынести суждение о патогенетическом значении аутоантител к миелиновому белку при указанных формах тугоухости.

Большой научный и практический интерес представляла оценка связи типа наследования патологических мутаций в гене коннексина 26 с индукцией выработки аутоантител к миелиновому белку при наследственных формах СНТ. С этой целью были

изучены выборки больных, у которых одновременно был определен и тип наследования, и наличие аутоантител. Результаты представлены в табл. 4. Видно, что при двух изученных формах СНТ аутоантитела к миелиновому (PO) белку встречаются преимущественно у больных с аутосомно-рецессивным типом наследования в 84 и 88% случаев. Аутосомно-доминантный тип наследования встречался гораздо реже — в 16 и 12% случаев. В целом эти данные соответствуют закономерностям наследования патологических генов при СНТ, определенных в общей выборке больных из дагестанской популяции.

Представленные в настоящей работе результаты изучения частоты патологических мутаций в гене коннексина 26 при СНТ на дагестанской популяции подтверждают их патогенетическое значение при наследственных формах СНТ. При этом доминирует аутосомно-рецессивный тип наследования. Прогрессирование СНТ связано с увеличением продукции аутоантител к миелиновому (PO) белку. Максимальное количество позитивных случаев в отношении наличия аутоантител наблюдается при прогрессирующей ненаследственной СНТ, что позволяет предположить патогенетическое значение аутоантител к миелиновому (PO) белку при прогрессировании тугоухости. По клинико-генеалогическим данным последние чаще встречались при аутосомно-рецессивном типе наследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Snoeckx R.L., Huygen P.L., Feldmann D. GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study // *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 77: 945-957.
2. Джемилева Л.У., Гринберг Э.Р., Хабибуллин Р.М. Гены белков-коннексинов, принимающих участие в процессе звуковосприятия // *Вестник оториноларингологии.* 2006; 4:15-20.
3. Маркова Т.Г. Организация медико-генетического консультирования в отношении наследственных нарушений слуха. *Вестник оториноларингологии.* 2009; 1: 34-36.
4. Джемилева Л.У., Посух О.Л., Газетдинов А.М. Анализ генов 12SrRNA и tRNASer(UCN) мтДНК у больных несиндромальной сенсоневральной тугоухостью/глухотой наследственной этиологии из различных регионов России // *Генетика.* 2009; 7: 982-991.

5. Tomasi J.P., Lona A., Deggouj N. Autoimmune sensorineural hearing loss in young patients: an exploratory study // *Laryngoscope.* 2001; 111(11): 2050-2053.
6. Passali D.V., Damiani H., Mora R. P0 antigen detection in sudden hearing loss and Ménière's disease: a new diagnostic marker? // *Acta Otolaryngol.* 2004; 124(10): 1145-1148.
7. Pham B.N., Rudic M., Bouccara D. Antibodies to myelin protein zero (PO) protein as markers of auto-immune inner ear diseases // *Autoimmunity.* 2007;40(3): 202-207.
8. Ильина Е.Н., Говорун В.М. Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот в молекулярной медицине. *Биоорганическая химия.* 2009; 35(2): 1-16.