

Идентификация мутации 35delG в гене GJB2 у больных нейросенсорной тугоухостью в РС(Я)

Н.А. Барашков, С.К. Кононова, Н.Р. Максимова, Ф.М. Терютин, А.Л. Сухомясова, Э.Е. Федотова, В.М. Николаев, Л.У. Джемилева, С.А. Федорова, Э.К. Хуснутдинова, А.Н. Ноговицына

Впервые в практике медико-генетической консультации РС(Я) применены молекулярно-генетические методы диагностики врожденной глухоты. Проведен анализ частоты мутации 35delG в гене GJB2 на выборке из 48 пациентов с нейросенсорной тугоухостью из Республиканской специализированной (коррекционной) школы-интерната I типа для глухих детей и из числа амбулаторных больных медико-генетической консультации РБ №1 – НЦМ. Мутация 35delG обнаружена у 11 обследованных: у 5 в гомозиготном и 6 в гетерозиготном состоянии. Частота мутации в исследованной выборке составила 0,166 (16,6%). Обсуждаются возможные методы и подходы к ДНК-диагностике наследственных форм тугоухости/глухоты в Якутии.

Ключевые слова: мутация 35delG, ген GJB2 или Коннексин 26, нейросенсорная тугоухость/глухота/врожденная глухота, ДНК-диагностика.

For the first time in practice of medical – genetic consulting clinic of Republic Sakha (Yakutia) molecular-genetic methods of diagnostics of congenital deafness are applied. In order to identify of 35delG mutation of GJB2 gene we observed 48 patients with sensoneural deafness from Republican specialized (correctional) boarding-school of I type for deaf children and patients from medical-genetic consulting clinic of the Republic Hospital №1 – National center of medicine. In 11 of observed we identified 35delG mutation in homozygote (5 cases) and heterozygote (6 cases) forms. Frequency of a mutation in the investigated sample has made 0,166 (16%). Possible methods and approaches to DNA – diagnostics of hereditary forms of hearing loss/deafness in Yakutia are discussed.

Key words: 35delG mutation, GJB2 gene or Connexin 26, sensoneural hearing loss/deafness/congenital deafness, DNA-diagnostics

Введение

Дефекты органов слуха занимают существенное место среди наследственной патологии.

БАРАШКОВ Николай Алексеевич – н.с. ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); КОНОНОВА Сардана Кононовна – к.б.н., с.н.с. ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); МАКСИМОВА Надежда Романовна – к.м.н., нач. отдела ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); ТЕРЮТИН Федор Михайлович – врач-сурдолог РБ №1 – НЦМ; СУХОМЯСОВА Айталипа Лукична – врач-генетик РБ №1 – НЦМ; ФЕДОТОВА Эльвира Егоровна – врач-сурдолог РБ №1 – НЦМ; НИКОЛАЕВ Вячеслав Михайлович – м.н.с. ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); ДЖЕМИЛЕВА Лиля Усеиновна – к.м.н., н.с. НИИ биохимии и генетики УНЦ РАН; ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна – к.б.н., зав. лаб. ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., проф., зав. отделом геномики НИИ биохимии и генетики УНЦ РАН; НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна – к.м.н., зав. Медико-генетической консультацией РБ №1 – НЦМ.

По данным ВОЗ, за последние 20 лет число людей с различными формами тугоухости увеличилось в 2 раза и составляет 20 млн. человек. Примерно 3% жителей земного шара страдают снижением слуха в степени, которая мешает их социальному общению [7].

Частота наследственной тугоухости и глухоты составляет 1 на 1000 новорожденных детей [13, 21]. Врожденная глухота и снижение слуха в доречевой период приводят к нарушению речевой и социальной адаптации, поэтому такие дети нуждаются в своевременно начатой коррекции дефектов органов слуха [8]. Примерно половина врожденных форм нарушений слуха имеют наследственную этиологию [14], другая половина может быть связана с «негенетическими» причинами: инфекциями, осложнениями в родах (асфиксии, родовые травмы), приемом матерью ототоксических лекарственных препаратов, длительной искусственной вентиляцией легких, бактериальными менингитами, продолжительными отитами, тяжелыми травмами головы и др. [4, 6]. Для наследственных форм по-

тери слуха характерен клинический и генетический полиморфизм [4, 16]. Нейросенсорные формы тугоухости генетически классифицируются на несиндромальные (изолированные) и синдромальные (при которых поражаются и другие органы и системы). Для несиндромальных форм, которые составляют 70–80% среди всей наследственной патологии слуха, характерны все типы наследования, включая Х-сцепленный и митохондриальный [2, 7, 8]. Причем 80% всей несиндромальной нейросенсорной тугоухости приходится на семьи с аутосомно-рецессивным типом наследования [2, 20].

Генетическая гетерогенность наследственных форм тугоухости обусловлена тем, что в процессе эмбрионального развития кортиева органа принимает участие более 40 генов [17]. На сегодняшний день описано 90 мутаций только в одном из них гене – *GJB2*, локализованном на хромосоме 13q11 [9, 20, 22].

Ген *Коннексин 26* или *GJB2* (от англ. – *gap junction β2*) является наиболее изученным среди всех генов, мутации в которых отвечают за развитие нарушений процесса звуковосприятия. Он состоит из двух экзонов, причем кодирующий – второй, размером около 800 п.н. [3, 18]. Доказано, что белок, экспрессируемый геном *GJB2*, играет важную роль в обмене ионов калия во внутреннем ухе [18]. При нарушении синтеза этого белка в тканях улитки происходит дисбаланс ионной циркуляции, что влечет за собой изменение процесса звуковосприятия [4, 18, 23].

Основными клиническими проявлениями мутаций в гене *GJB2* являются врожденные нарушения слуха и преобладание выраженной степени тугоухости вплоть до глухоты [4, 24]. Одна из самых распространенных мутаций в этом гене – мажорная (частая) для европеоидных популяций мутация *35delG*, при которой происходит выпадение (делеция) одного из шести последовательно расположенных гуанозинов в 35-м положении. Она приводит к образованию стоп-кодона и прекращению синтеза полноценного белка в волосковых клетках внутреннего уха [4, 24]. Частота данной мутации среди всех мутантных аллелей гена *GJB2* варьирует от 55 до 88% [8]. По некоторым литературным данным, каждый 33-й житель Европы является гетерозиготным носителем этой мутации [3, 8, 24].

Мутация *35delG* обуславливает развитие ранней несиндромальной нейросенсорной тугоухости в 20% всех случаев врожденной глухоты в европейских странах [3, 15, 24]. Данный факт служит основой для внедрения молекулярно-

генетических методов диагностики нарушений слуха у пациентов тех регионов, в которых основной вклад в данную патологию принадлежит мутации *35delG*. В Эстонии частота гетерозиготного носительства данной мутации составляет 12% [15], в Башкортостане, средней полосе России 1,4 – 3% [3, 12].

Частота распространенности мутации *35delG* среди лиц со сниженным слухом и ее вклад в развитие тугоухости в РС(Я) до сих пор не изучены. До недавнего времени клинический полиморфизм и генетическая гетерогенность данной патологии не позволяли точно установить причину болезни. С появлением ДНК-технологий стало возможным более эффективное медико-генетическое консультирование больных из семей с наследственными несиндромальными формами тугоухости и глухоты.

Материалы и методы

Проведено выездное и амбулаторное медико-генетическое консультирование. Обследовано 47 человек из 37 неродственных семей с диагнозом нейросенсорная тугоухость III-IV степени предположительно наследственной этиологии из Республиканской специализированной (коррекционной) школы-интерната I типа для глухих детей и из числа амбулаторных больных медико-генетической консультации РБ №1 – НЦМ. На каждого пациента составлена генетическая карта, собран генеалогический анамнез. Возраст пробандов варьировал от 6 до 22 лет. В 15 семьях выявлен аутосомно-рецессивный, в 3 – аутосомно-доминантный, в 19 – тип наследования не установлен. В одном случае выявлен синдром Ваарденбурга. У 32 обследованных имелись больные сибсы. Этническая принадлежность устанавливалась путем опроса обследованных (33 якута из 27 семей, 12 русских из 10 семей, 3 ингуша из 1 семьи).

Молекулярно-генетический анализ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [19]. Амплификацию проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на аппарате “Терцик” с использованием праймеров [8]. Длина амплификационного фрагмента в норме составила 89 п.н., при мутации *35delG* – 88 п.н. (рис.1).

Результаты амплификации оценивали в 10% полиакриламидном геле (АА: бисАА= 29:1,3) с 5% глицерином, длиной 20 см. В качестве буфе-

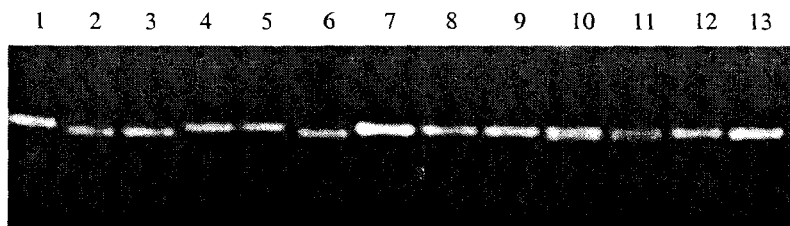


Рис. 1. Идентификация мутации 35delG в 10% полиакриламидном геле. 1, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13 – normal/normal; 2, 3, 6 – deletion/deletion; 10, 11 – normal/deletion

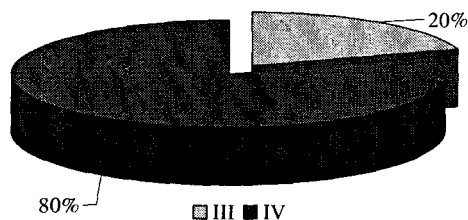


Рис. 2. Распределение пациентов с мутацией 35delG в гомозиготном состоянии по степени тугоухости (%)

ра для электрофореза использовали 1xTBE. Электрофорез проводили в течение 4 часов при 300 В. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК фага λ pUC 19/MspI. После разделения продуктов ПЦР гель окрашивали в растворе бромистого этидия и фотографировали в УФ-свете. Частота мутантных аллелей на хромосомах больных высчитывалась по формуле: $p = n/N$, где n – число хромосом с мутацией 35delG, N – общее число исследованных хромосом в выборке больных, p – частота мутации.

Результаты и обсуждение

Впервые в практическом здравоохранении РС(Я) был апробирован один из методов ДНК-диагностики наследственных форм тугоухости: прямой анализ мутации 35delG [1] (рис.1). По полученным данным, мутация 35delG была выявлена у 11 и не обнаружена у 37 человек. Из 11 пациентов с мутацией 35delG 5 человек оказались гомозиготами, 6 – гетерозиготными носителями. Учитывая соотношение числа гомо- и гетерозиготных носителей мутации, мы провели оценку частоты мутации 35delG, которая составила 0,166 (16,6%) в исследованной выборке больных. Полученный результат согласуется со многими литературными данными о высокой распространенности этой мутации в различных популяциях [3, 5, 7, 11].

У 5 пациентов, на обеих хромосомах которых была выявлена мутация 35delG, причину снижения слуха можно считать установленной. Это немаловажно для дифференциальной диагностики при установлении наследственной этиологии заболевания и последующего медико-генетического консультирования. В этих семьях в дальнейшем возможна пренатальная (дородовая) ДНК-диагностика. Степень тугоухости пациентов с генотипом deletion/deletion составила: 80% – IV и 20% – III степени, что подтверждает многие исследования о практически полной глу-

хоте у носителей данной мутации в гомозиготном состоянии [3, 5] (рис.2).

Мутация 35delG выявлена у 6 обследуемых в гетерозиготном состоянии. Обнаруженная мутация 35delG только в одной копии гена не раскрывает причины развития тугоухости у данных пациентов, т.к. мутантный аллель рецессивен по отношению к аллели дикого типа. Такое количество гетерозиготных носителей делеции 35delG и наличие у них потери слуха могут указывать на сегрегацию различных по происхождению мутантных аллелей у исследованных больных, что, вероятно, является действием направленного отбора, т.е. ассортативности браков между слабослышащими. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования не только среди больных, но и среди здорового населения для оценки частоты гетерозиготного носительства данной мутации в популяциях РС (Я).

У двоих сибсов из одной семьи с мутацией 35delG в гомозиготном состоянии наблюдалась ложная картина аутосомно-доминантного типа наследования. В данном случае необходимо обследование родителей пробандов, т.к. они могут являться носителями той же мутации в гомо- и в гетерозиготном состоянии. Накопление мутаций и подобная картина ложного типа наследования могут говорить об ассортативности браков между слабослышащими.

Следовательно, высокая частота гетерозиготных носителей среди больных тугоухостью и ложная картина аутосомно-доминантного типа наследования указывают на выраженный социальный характер проблемы. Многие люди со сниженным слухом социально не мобильны или просто дезадаптированы в обществе. Если они и создают семьи, то внутри ограниченного круга лиц, как правило, из своей среды (спецшкола-интернат и другие социальные институты), что способствует распространению и накоплению различных по происхождению мутантных аллелей среди слабослышащих. В этом заключается

сложность ДНК-диагностики, т.к. генетическая гетерогенность наследственных форм тугоухости не позволяет тестировать на сегодняшний день все различные по происхождению и локализации мутации в генах, ответственных за развитие слуха, которых может быть очень много. В связи с этим для оптимальной ДНК-диагностики необходимо выявить спектр мажорных мутаций в популяциях РС (Я).

Распределение носителей мутации *35delG* в гомо- и гетерозиготном состоянии в зависимости от этнической принадлежности, как европеоидов, так и монголоидов, представлена в таблице.

Встречаемость мутации *35delG* у пациентов с нейросенсорной тугоухостью в зависимости от этнической принадлежности

Национальность	Генотип <i>del/del</i> (количество человек)	Генотип <i>del/norm</i> (количество человек)
Русский	2	5
Якут	0	1
Ингуш	3	0

Примечание. Генотип *del/del* – гомозигота по мутации *35delG*; генотип *del/norm* – гетерозиготные носители мутации *35delG*.

Обнаруженная мутация *35delG* у 1 якута в гетерозиготном состоянии, возможно, имеет европеоидное происхождение, вследствие метисации с пришлым населением, т.к. по литературным данным у монголоидов данная мутация практически не встречается [4, 11]. В исследованной нами ранее выборке якутов с нейросенсорной тугоухостью мутация *35delG* не была обнаружена [1], что, по-видимому, связано с низким уровнем распространенности данной мутации в якутской популяции. Это, в свою очередь, согласуется с данными по этноспецифичности накопления мутаций в гене *GJB2*, т.к. мутация *35delG* более характерна для европеоидов [3, 11, 15]. По данным анализа митохондриальной ДНК, содержание европеоидного компонента в генофонде якутов невысокое (8,4%) [10] и, соответственно, частота мутации *35delG* может быть крайне низкой. Тем не менее данный вопрос требует дальнейшего изучения в аспекте археологической и этнической геномики, т.к. этноспецифичность накопления мутаций в гене *GJB2* может использоваться в качестве весомих аргументов для доказательства различных сценариев миграции и происхождения народов.

Таким образом, в заключение можно отметить, что молекулярно-генетическая идентификация мутации *35delG* в гене *GJB2* успешно ап-

робирована и может быть внедрена в практику медико-генетической консультации РБ №1 – НЦМ. Вместе с тем стоит заметить, что остается высоким процент больных, у которых причины снижения слуха остаются неизвестными. Необходимы дальнейшие исследования спектра мутаций генов *GJB2* и *GJB3* с помощью анализа конформационных полиморфизмов однонитевых фрагментов ДНК (SSCP-Single Strand Conformation Polymorphism) с последующим секвенированием образцов ДНК с найденными изменениями подвижности. Для построения оптимального алгоритма ДНК-диагностики наследственных форм тугоухости/глухоты в Якутии на данный момент нами начаты исследования с помощью SSCP-анализа локуса *Cx26AU* в гене *GJB2*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РС(Я) в области здравоохранения и медицинской науки, №327 РП.

Литература

1. Барашков Н.А., Кононова С.К., Федорова С.А. и др. Апробация методов ДНК-диагностики при наследственной тугоухости в Республике Саха (Якутия) // Матер. Международной науч.-практ. конференции «Генетические аспекты патологии человека. Проблемы сохранения генофонда коренных народов Севера». – Якутск: НИПК «Сахаполиграфиздат», 2005. – С.11–13.
2. Блюмина М.Г. Медико-генетическое консультирование семей с нейросенсорной тугоухостью неясной этиологии у обоих супругов // Вестник оториолар. – 1987. – №4. – С.33–35.
3. Джемилева Л.У. Анализ генов *GJB2* и *GJB3* у больных несиндромальной наследственной глухотой и в некоторых популяциях Волго-Уральского региона: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2002. – 20 с.
4. ДНК-диагностика и профилактика наследственной патологии в Республике Башкортостан / Под ред. Э.К. Хуснутдиновой. – Уфа: Китап, 2005. – 204 с.
5. Маркова Т.Г., Мегрелешвили С.М., Зайцева Н.Г. и др. ДНК-диагностика при врожденной и ранней детской тугоухости и глухоте // Вестник оториолар. – 2002. – №6. – С.12–15.
6. Маркова Т.Г. Наследственные формы тугоухости и медико-генетическое консультирование // Медицинская генетика. – 2004. – Т.3, №2. – С.50–69.
7. Наследственные болезни в популяциях человека / Под ред. Е.К. Гинтера. – М.: Медицина, 2002. – 268 с.
8. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н., Поляков А.В. Частота мутации *35delG* в гене коннек-

сина 26 у детей, страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью // Медицинская генетика. – 2002. – Т. 1, №6. – С.290–294.

9. Посух О.Л., Палларес-Руиз Н., Тадинова В.Н. и др. Распространенность мутаций гена GJB2, определяющих нарушение слуха, в популяциях Республики Алтай // Медицинская генетика. – 2002. – Т.2, №10. – С.437.

10. Федорова С.А., Бермиева М.А., Виллемс Р. и др. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Молекулярная биология. – 2003. – 37. – С. 643–653.

11. Antoniadis T., Rabionet R., Kroupis C.E. et. al. High in the Greek population of the del35G mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. Letter to the editor // Clin. Genet. – 1999. – V.55. – P.381 – 382.

12. Anichkina, Kulenich, Zinchenko et.al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe // Eur.J. of Human Genetics. – 2001. – V.9. – P.151.

13. Friedman R.A., Bykhovskaya Y., Sue C.M. et. al. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss // Am. J. Med. Genet. – 1999. – V.84(4). – P.369–372.

14. Jacobson J.T. Nosology of deafness // Am. Acad. Audiol. – 1995. – V.6. – P.15–37.

15. Gasparini P., Rabionet R., Barbuji 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. – V.8(1). – P.19–23.

16. Houseman M.J., Ellis L.A., Pagnamenta A. et.al. Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M35T segregating with

mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss // J. Med. Genet. – 2001. – V.38. – P.20–25.

17. Kelley P.M., Harris D.J., Comer B.C. et. al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss // Am.J. Hum.Genet. – 1998. – V.62. – P.792–799.

18. Kikuchi T., Kurima R.S., Paul D.L. et.al. Gap junction in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis // Anat Embriol (Berl). – 1995. – V.191. – P.101–118.

19. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M. J.M.Y.L.: Human Press. – 1984. – V.2. – P.31–34.

20. Murgia A., Orzan E., Polli R. et.al. Cx26 deafness: mutation analyses and clinical variability // J.Med. Genet. – 1999. – V.36. – P.829–832.

21. Najmabadi H., Cucci R., Sahebjam S. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss // Hum. Mut. – 2002. – V.504. – P.135–138.

22. Scott D.A., Kraft R., Carmy R. et. al. Identification of mutations in the connexin26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss // Hum. Mut. – 1998. – V.11. – P.387–394.

23. Sosinsky G., Donald L.D., Gaspar. Mixing of connexins in gap junction membrane channels // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. – 1995. – V.92. – P. 9210–9214.

24. Zelante L., Gasparini P., Estivill. X. et.al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean // Hum. Mol. Genet. – 1997. – V.6. – P.1605–1609.



Посвящается 80-летию работы медико-санитарного отряда АН СССР в Вилюйском округе Якутской области

Медико-санитарный отряд Якутской экспедиции АН СССР (1925–1926 гг.)

В.П. Николаев

В 1925–1926 гг. в Вилюйском округе Якутской области работал медико-санитарный отряд комплексной экспедиции АН СССР, организованной по инициативе Правительства Якутской АССР. Медико-санитарным отрядом было пройдено 5322 км пути, где было обследовано 1811 человек. Отрядом были выявлены неудовлетворительные условия жизни и быта местного населения и связанное с ним большое распространение туберкулеза, желудочно-кишечных заболеваний, материнской и младенческой смертности. По всему маршруту следования отрядом была оказана медицинская помощь населению. По прошествии 80 лет Вилюйская экспедиция не потеряла своей научной и практической значимости.

НИКОЛАЕВ Валериан Парфеньевич – к.м.н., ученый секретарь ЯНЦ РАМН и Правительства РС (Я).