

УДК 612.85:577.218

ИЗУЧЕНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ СЛУХА У ДЕТЕЙ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

¹Божкова В.П., ¹Хашаев З.Х., ²Магомедов Ш.М.

¹Учреждение Российской академии наук, Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, e-mail: bkg@iitp.ru;

²Отделенческая Клиническая больница на станции Махачкала
СКЖД ОАО Российской железной дороги, Махачкала,
e-mail: gabmah@mail.ru

Проведен анализ мутаций в кодирующей области и донорном сайте сплайсинга GJB2 гена (гена коннексина 26), которые являются наиболее частой причиной доречевых – врожденных и ранних детских – наследственных нарушений слуха у детей. С использованием метода секвенирования показано, что в республике Дагестан наследственные нарушения слуха более гетерогенны, чем в центральной европейской части РФ. Мутации в GJB2 гене составляют только 34% от общего числа аллелей детей с несиндромальными аутосомно-рецессивными нарушениями слуха, в отличие от центральной европейской части РФ, где они составляют более 90%. Обсуждается специфика генной диагностики нарушений слуха в республике Дагестан.

Ключевые слова: глухота, тугоухость, коннексин 26, мутации, генная диагностика

Нарушения слуха (НС) представляют собой сборную группу болезней, объединенных главным симптомом – глухотой или тугоухостью. Доречевые (врожденные и ранние детские) НС – одно из самых частых сенсорных расстройств человека, встречающихся приблизительно у 1 из 1000 новорожденных [1]. Причины, которые способны вызвать этот симптом, многочисленны. Наша работа не касается негенетических факторов, приводящих к врожденной глухоте, таких как инфекционные заболевания (краснуха, отит и менингит), некоторые лекарственные средства (стрептомицин), резус-конфликт матери и ребенка, родовые травмы и др. На их долю по разным оценкам приходится от 30 до 50% случаев глухоты и тугоухости. Остальную же половину по общему признанию составляют генетические причины [1]. Последнее десятилетие ознаменовалось большими успехами в молекулярной генетике глухоты. Были опубликованы обширные списки генов, мутации хотя бы в одном из которых приводят к серьезным нарушениям слуха в разных человеческих популяциях [7].

Известно, что подавляющее большинство наследственных форм – это аутосомно-рецессивные несиндромальные (моносимптоматические) нарушения слуха (АРНСНС). Несмотря на то, что АРННС являются генетически гетерогенными, т.е. к нарушению слуха могут привести мутации в разных генах, наиболее распространенной в странах Европы, США и других популяциях (но не во всех) является глухота, вызванная мутациями в гене *GJB2*, кодирующем белок щелевых контактов – коннексин 26 (Cx26). Она носит название *GJB2*-связанной глухоты/тугоухости. Коннексиновый тип глухоты/тугоухости предполагается, если НС являются долингвальными (обнаруживаются при рождении или в раннем детстве), оказываются глубокими, не имеют явной причины, не сопровождаются другими заболеваниями, относятся к аутосомно-рецессивному типу [1].

Генотипирование патогенных мутаций *GJB2* гена показало, что они сильно различаются в разных популяциях. У европеоидов самой распространенной является мутация 35delG [10]. В РФ частота мутации

35delG также оказалась чрезвычайно высокой [2, 3]. Вместе с тем эта мутация практически отсутствует в популяциях Ближнего Востока, Юго-Восточной Азии, а также в некоторых популяциях Волго-Уральского региона РФ и Сибири [4, 8, 9]. Но в целом совокупная частота мутаций в *GJB2* гене в большинстве стран настолько высока, что ДНК-диагностика наследственных детских НС стала проводиться в первую очередь по этому гену [5].

Вместе с тем существуют значительные различия не только в частоте отдельных мутаций, но и в общем вкладе гена *GJB2* (среди других генов) в долигвальные нарушения слуха в разных популяциях. Чтобы оценить степень причастности гена *GJB2* к детской глухоте/тугоухости, необходимо провести секвенирование, по крайней мере, всей кодирующей области гена.

Цель настоящей работы – изучить мутации кодирующей области *GJB2* гена у глухих детей из республики Дагестан и сравнить их со спектром и общей частотой мутаций у детей с нарушениями слуха, живущих в центре Европейской части РФ.

Материал и методы

В группу испытуемых входили ученики школы-интерната 1-го вида (для глухих детей) г. Махачкалы, имеющих долигвальные (чаще всего врожденные) двусторонние нейросенсорные сильно выраженные нарушения слуха (на уровне тугоухости III-IV степени или полной глухоты). Их возраст варьировал от 6 до 16 лет, составляя в среднем 10 лет. Все семьи были проинформированы о ДНК-диагностике, и от родителей были получены письменные согласия. Анамнез и генеалогические данные всех учеников были проанализированы с учетом высокой частоты близкородственных браков и инфекционных болезней в этом регионе. Дети с высокой вероятностью приобретенной глухоты/тугоухости и синдромальных нарушений были исключены из дальнейшего рассмотрения. ДНК-диагностика была проведена для 35 детей из 27 семей с семейными

случаями глухоты/тугоухости, родословные которых предполагали аутосомно-рецессивное наследование. Этнический состав группы был смешанным и включал даргинцев, аварцев, лакцев, лезгин и чеченцев.

Анализ мутационного спектра *GJB2* гена проводился методом секвенирования. Из высушенных образцов периферической крови (3–5 капель), приготовленных на фильтровальной бумаге или марлевых салфетках, была выделена ДНК с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep100. Кодирующая область гена *GJB2* была амплифицирована с использованием набора праймеров (5' – **cag aga agt ctc cct gtt ctg tcc tag** – 3') и (5' – **cag ctg agc acg ggt tgc ctc atc** – 3'). Экзон 1 и примыкающий к нему донорный сайт сплайсинга были амплифицированы с использованием праймеров (5' – **tcc gta act ttc cca gtc tcc gag gga aga g** – 3' или 5' – **cgc act atg cgg agt aca gag gac** – 3') и (5' – **ccc aag gac gtg tgt tgg tcc agc ccc** – 3'). Прямое секвенирование амплифицированных областей гена *GJB2* было проведено согласно ранее описанным методам [6].

Результаты и их обсуждение

Секвенирование кодирующей области *GJB2* гена у 35 дагестанских детей с глубокой врожденной глухотой/тугоухостью АРНЧС типа выявило мутации только у 12 детей (таблица). Общее число выявленных мутаций составило 19. Мутации встречались в гомозиготном (2 случая), в компаунд-гетерозиготном (5 случаев) или в гетерозиготном (5 случаев) состоянии (см. таблицу). Таким образом, общий вклад гена *GJB2* во врожденные АРНЧС оказался в Дагестане существенно ниже – не более 34%, чем в центральных европейских регионах России, где он составил почти 100% [2]. Мутация 35delG в *GJB2* гене была обнаружена у 6 детей, и только у двоих из них в гомозиготном состоянии. Аллельная частота этой мутации среди всех выявленных мутаций в *GJB2* гене составила 42%, что также значительно ниже, чем у детей из центральных европейских регионов Рос-

сии [2]. Кроме этой мутации, в кодирующей области *GJB2* гена у двух детей встретилась делеция GAG в положении 355–357 (мутация, известная как ΔE120, приводящая к делеции глутамина в 120 кодоне). Кроме того, была выявлена новая мутация – делеция

GAG в положении 559–561 кодирующей области (мутация ΔE187, приводящая к делеции глутамина в 187 кодоне) и изменение V153I, которое часто относят к полиморфизмам. Оба встретились в гетерозиготном состоянии у одного пациента.

Изменения в кодирующей области *GJB2* гена, обнаруженные у дагестанских детей с врожденными глубокими несиндромальными нарушениями слуха

Генотипы с мутациями	Число (% от общего числа исследованных генотипов)
35delG/35delG	2 (6%)
35delG/IVS1+1 G>A	3 (8%)
35delG/355_357delGAG	1 (3%)
559_561delGAG*/IVS1+1 G>A	1 (3%)
IVS1+1 G>A/N	3 (8%)
355_357delGAG/N	1 (3%)
V153I**/N	1 (3%)
Всего детей с изменениями в <i>GJB2</i> гене	12/35 (34%)

Примечания:

* – новая мутация в *GJB2* гене;

** – это изменение часто относят к полиморфизмам.

Поиск мутаций в донорном месте сплайсинга гена *GJB2* на границе экзон1-интрон, там, где ранее была обнаружена редкая для европейской популяции сплайсинговая мутация IVS 1+1 G > A [10] позволил обнаружить эту мутацию у 7 из 35 тестированных детей (см. таблицу). После этого разнообразие выявленных мутаций *GJB2* гена в дагестанской популяции достигло пяти (см. таблицу). Мутация IVS 1+1 G > A оказалась среди них настолько же частой, как и мутация 35delG. Аллельная частота этой мутации оказалась равной 37%. Такая высокая частота этой мутации не описана ни для одной изученной популяции мира.

Мутации не были ограничены отдельными этническими группами. Среди детей с мутацией 35delG были даргинцы (1 человек), аварцы (1 человек), чеченцы (1 человек), азербайджанцы и лезгины (2 человека) и 1 метис, родившийся в браке русская/ава-

рец. С мутацией IVS 1+1 G > A были даргинцы (4 человека), лезгины (1 человек), аварцы (1 человек) и 1 метис.

Таким образом, обнаружены существенные отличия не только в общем вкладе гена *GJB2*, но и в частоте отдельных мутаций в этом гене у детей с долигвальными НС из республики Дагестан по сравнению с детьми из центральных европейских регионов России. Эти данные следует учитывать при ДНК-диагностике наследственных детских нарушений слуха, которая проводится в первую очередь по гену *GJB2* и, часто, только по мутации 35delG [3]. Как оказывается, для дагестанских детей этого недостаточно. Как минимум, требуются секвенирование всей кодирующей области *GJB2* гена и анализ донорного сайта сплайсинга.

Можно предположить, что кроме *GJB2* гена имеются и другие патологические гены, вызывающие глухоту/тугоухость в

этом регионе. Хорошо известно, что в изолированных и/или инбредных популяциях часто создаются благоприятные условия для быстрого размножения редких мутаций от основателя, быстрого достижения ими гомозиготности и проявления в фенотипе. В то время как в обычных популяциях они могут быть с большой вероятностью утеряны. Поэтому наличие в родственных кланах «собственных» мутантных генов не удивительно: один из вариантов мутации мог возникнуть когда-то однократно и благодаря быстрому увеличению численности популяции получить распространение именно в этой этнической группе и затем проявиться фенотипически. Это могут быть, например, гены *SLC26A4* или *MYO15A*, достаточно распространенные в мире [7]. Или же некоторые редкие или пока неизвестные гены, которые представлены только в семьях с близкородственными связями. В любом из этих вариантов необходимы дальнейшие исследования.

Не исключено также, что нарушения слуха в Дагестане могут вызываться редкими мутациями и в других некодирующих областях *GJB2* гена, что также требует дальнейшего изучения.

Заключение

Всего методом секвенирования обследовано 35 детей из Дагестана с АРНЧС. Только у 12 детей (34% от всех детей с АРНЧС) были обнаружены изменения в кодирующей области и в донорном сайте сплайсинга *GJB2* гена. Мутации встречались в гомозиготном (2 случая), в компаунд-гетерозиготном (5 случаев) или в гетерозиготном (5 случаев) состоянии. Гетерозиготами оказалось 42% детей. Таким образом показано, что в республике Дагестан долигвальная несиндромальная аутосомно-рецессивная глухота/тугоухость реже связана с *GJB2* геном, чем в центральной европейской части РФ [2].

Основные мутации в *GJB2* гене в республике Дагестан представлены тремя типами, характерными также для Передней Азии

(не считая одной новой мутации – ΔE187): 35delG (42% от общего числа мутантных аллелей), IVS 1+1 G > A (37%) и ΔE120 (10%). Таким образом мутация 35delG в *GJB2* гене, чрезвычайно распространенная в центре европейской части РФ и составляющая там в случае АРНЧС 83% мутантных аллелей [2], является далеко не самой распространенной патогенной мутацией, вызывающей АРНЧС, в республике Дагестан. Наравне с ней там встречается также сплайсинговая мутация IVS 1+1 G > A.

Эти данные следует учитывать при ДНК-диагностике наследственных НС у дагестанских детей. Требуются дальнейшее изучение мутаций и в других областях *GJB2* гена, а также поиск других патологических генов, вызывающих глухоту/тугоухость в этом регионе.

Список литературы

1. Божкова В.П. Наследственные нарушения слуха: роль щелевых контактов (обзор) // Сенсор. сист. – 2008. – Т. 22, № 1. – С. 3–19.
2. Божкова В.П., Хашаев З.Х., Уманская Т.М. Сравнение частоты и мутационного спектра нарушений слуха у детей Дагестана и Европейской части России // Биофизика. – 2010. – Т. 55, Вып. 3. – С. 514–525.
3. Маркова Т.Г., Поляков А.В., Кунельская Н.Л. Клиника нарушений слуха, обусловленных изменениями в гене коннексина 26 // Вестник оторинолар. – 2008. – Т. 2. – С. 4–9.
4. Худиятова И.М., Хуснутдинова Э.К. Геномная структура и ДНК-диагностика наследственных моногенных заболеваний в Волго-Уральском регионе // Мол. биол. – 2004. – Т. 38. – С. 139–149.
5. Crynz K., Orzan E., Murgia A. et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness // J. Med. Genet. – 2004. – Vol. 41. – P. 147–154.
6. Frei K., Szuhai K., Lucas T. et al. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria // Eur. J. Hum. Gen. – 2002. – Vol. 10. – P. 427–432.
7. Hilgert N., Smith R., Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analysed in DNA diagnostics? // Mutat. Res. – 2009. – Vol. 68. – P. 189–196.
8. Mahdieh N., Rabbani B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of

carrier frequency // *Int. J. Audiology*. – 2009. – Vol. 48. – P. 363–370.

9. Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V. et al. First molecular searching of deafness in the Altai Republic population // *BMC Med. Gen.* – 2005. – Vol. 6. – P. 12-19.

10. Snoeckx R.L., Huygen P. L., Feldmann D. et al. *GJB2* Mutations and degree of hearing loss: A Multicenter Study // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 77. – P. 945–957.

Авторы приносят большую благодарность коллективу школы-интерната I вида г. Махачкалы (республика Дагестан) за помощь в организации генной диагностики

ки и родителям детей с нарушениями слуха, участвовавших в этом исследовании.

Рецензенты:

Базян А.С., д.б.н., зав. лабораторией нейрохимических механизмов обучения и памяти, Учреждение Российской академии наук, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва;

Шаровская Ю.Ю., д.б.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва.

THE STUDY OF INHERITED HEARING LOSS FOR THE CHILDREN FROM REPUBLIC DAGESTAN

¹Bozhkova V.P., ¹Khashaev Z.Kh., ²Magomedov Sh.M.

¹Kharkevich Institute for Information Thansmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: bgk@iitp.ru;

²Makhachkala Railway Hospital, Makhachkala, e-mail: gabmah@mail.ru

The analysis of mutations in *GJB2* gene being the most common genetic cause of prelingual (congenital and early childhood) hearing loss in central European part of Russia was carried out for the children from Republic Dagestan. Sequencing of the entire coding region and the donor site splicing of the *GJB2* gene has shown that inherited hearing loss is more heterogeneous genetically in Republic Dagestan than in central European part of Russia. In Republic Dagestan the number of the revealed mutations in the *GJB2* gene was only 34% from the total allele number of tested children with congenital autosomal recessive hearing loss as compared with more than 90% in central European part of Russia. The specific character of gene diagnostics of hearing loss in Republic Dagestan is discussed.

Keywords: deafness, hearing loss, connexin 26, mutations, gene diagnostics