

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ У БОЛЬНЫХ ИЗ ГРУЗИИ

© 2022 г. А. А. Степанова¹, *, О. Р. Исмагилова¹, Н. М. Галеева¹, Т. Г. Маркова²,
Г. А. Таваркиладзе², О. Квливидзе^{3,4}, А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

²Российский научно-клинический центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА России, Москва, 117513 Россия

³Грузинский фонд генетических и редких заболеваний, Тбилиси, 0162 Грузия

⁴Университет “Нью Вижен”, Школа Медицины, Тбилиси, 0159 Грузия

*e-mail: cany@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Патогенные варианты в гене *GJB2* – наиболее частая причина несиндромальной нейросенсорной тугоухости. В работе проведено исследование больных нейросенсорной тугоухостью из Грузии. Определен вклад *GJB2*-тугоухости среди больных со снижением слуха. Спектр мутаций в гене *GJB2* у грузинских больных представлен патогенными вариантами: с.35delG, с.358_360delGAG, с.–23+1G>A и с.551G>C. Популяционная частота носительства *GJB2*-тугоухости составила 2.6%. У грузинских больных не выявлено наиболее частых для российских больных патогенных вариантов в генах: *STRC* (с.2171_2174delTTTG), *USH2A* (с.11864G>A), *SLC26A4* (с.1001G>T) и с.107A>C (p.His36Pro), *CLIC5* (с.1121G>A). Молекулярно-генетический диагноз установлен для 30.8% больных.

Ключевые слова: тугоухость, *GJB2*, *GJB2*-тугоухость, Грузия.

DOI: 10.31857/S0016675822050101

Нейросенсорная тугоухость – чрезвычайно распространенное заболевание и встречается у 1 из 500–1000 новорожденных [1]. Ранняя диагностика и своевременное лечение важны для приобретения слуха, речи и языковых навыков, тем самым способствуя полноценному когнитивному развитию ребенка [2].

Более половины врожденной тугоухости является наследственной, из них около 70% – несиндромальная, 80% которой составляют ауто-сомно-рецессивные формы (DFNB) [3]. Также для несиндромальной тугоухости характерны и другие типы наследования: ауто-сомно-доминантный тип (DFNA) – 15–20%, X-сцепленный (DFN) – 1–2%, вызванный мутациями в митохондриальной ДНК – менее 1% [3, 4]. Остальные 30% генетически обусловленной тугоухости являются синдромальными, существует около 400 синдромов, сопровождающихся потерей слуха или недостаточностью слуховых функций [5].

Мутации в гене коннексина 26 (*GJB2* (gap junction b2), NM_004004.6) составляют около половины случаев наследственной несиндромальной глухоты в западных странах. Белок коннексин 26

представляет собой субъединицу щелевых соединений, которые образуют сеть межклеточных взаимодействий между клетками во внутреннем ухе млекопитающих. Щелевые соединения, образующие каналы между соседними клетками, обеспечивают прямой межклеточный обмен различными соединениями с молекулярной массой до 1000 Да, т.е. метаболитами, ионами, вторичными мессенджерами, водой, а также электрическими импульсами [6].

Шесть субъединиц коннексина образуют полуканал (коннексон) в плазматической мембране, который состыковывается с другим полуканалом в плазматической мембране соседней клетки, чтобы собрать полный канал щелевого соединения (рис. 1). Субъединица коннексина состоит из четырех трансмембранных доменов, двух внеклеточных петель, одной цитоплазматической петли и цитоплазматических N-, C-концевых областей. Во внеклеточных петлях высококонсервативен порядок трех остатков цистеина, за счет чего противоположные цистеины в обеих петлях образуют дисульфидные мостики, стабили-

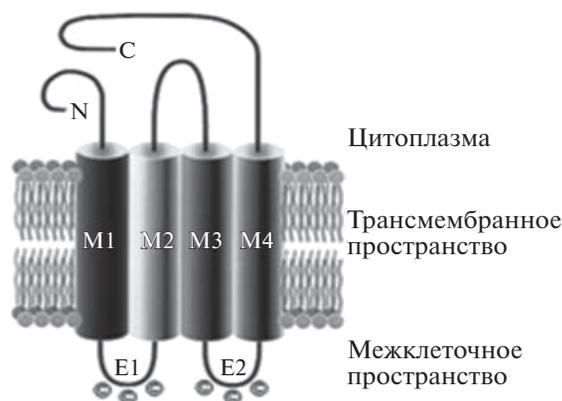


Рис. 1. Модель белка коннексина, цит. по [7].

лизирующие петли во время стыковки двух коннексонов (рис. 1) [7].

Ген *GJB2* картирован на 13 хромосоме в районе q12.11, содержит два экзона, только второй из которых является кодирующим, кодирует белок содержащий 226 аминокислотных остатков, с расчетной молекулярной массой около 26 кДа [8]. На сегодняшний день в гене *GJB2* описано более 350 патогенных вариантов. Мутация с.35delG является наиболее частой во многих популяциях мира: в Северной и Южной Европе ее доля составляет 70%, с частотой носительства от 1.3 до 2.8% [9, 10], на территории Российской Федерации (РФ) – 81%, с частотой носительства 5% [11], в Белоруссии – 84% [12], с частотой носительства 6.2% [13]. В то же время в ряде популяций мажорными являются другие варианты, например среди евреев – вариант с.167delT с долей 40% [14] и с частотой носительства 4% среди евреев-ашкенази [15], в популяциях Восточной Азии – с.235delC и p.Val37Ile, в Индии – p.Trp24* [16] и др. Таким образом, генетическое консультирование по поводу глухоты должно учитывать различия между пациентами из разных географических регионов.

Ранее были изучены спектры мутаций гена *GJB2* в различных регионах бывшего Советского Союза таких как центральная Россия [11], Республика Беларусь [12], республика Саха [17], Армения [18] и др.

Цель настоящего исследования – изучение спектра мутаций в гене *GJB2* у больных врожденной тугоухостью из Грузии и поиск у них частых для российской популяции мутаций в других генах.

Хотя секвенирование следующего поколения (NGS) становится все более доступным для установления точной генетической причины тугоухости, поиск мутаций в гене *GJB2* традиционными методами по-прежнему является основным этапом перед переходом к NGS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа были получены образцы крови от 39 неродственных пробандов из Грузии в возрасте от 5 до 18 лет с направляющим диагнозом “нейросенсорная несиндромальная тугоухость IV степени, пограничная с глухотой, состояние после кохлеарной имплантации”. Тяжелое нарушение слуха выявлено с рождения или в ранний доречевой период. Большинство детей перенесли операцию кохлеарной имплантации до трех лет. В качестве контрольной выборки использовали образцы ДНК от 117 неродственных индивидуумов, грузин по национальности из различных районов Грузии, не страдающих “нейросенсорной несиндромальной тугоухостью”.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя. У всех больных проводился поиск частых мутаций гена *GJB2* и поиск наиболее частых мутаций в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5*, являющийся рутинной диагностикой для пациентов с “нейросенсорной несиндромальной тугоухостью” в России, в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова”.

Методом аллель-специфичной мультиплексной лигазной реакции (MLPA) проводили поиск девяти частых мутаций гена *GJB2*: (с.35delG, с.–23+1G>A (IVS1+1G>A), с.313_326del14, с.235delC, с.358_360delGAG (p.Glu120del), с.101T>C (p.Met34Thr), с.167delT, 101kdel (GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del) и 309kdel (GJB6-D13S1830) (NC_000013.10: g.20797177_21105945) (рис. 2) и наиболее частых мутаций в генах: *STRC* (с.2171_2174delTTTG), *USH2A* (с.11864G>A (p.Trp3955*)), *SLC26A4* (с.1001G>T (p.Gly334Val) и с.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (с.1121G>A (p.Trp374*)) (рис. 3). Методика осуществляется в двух реакциях. Мультиплексная лигазная реакция для детекции частых вариантов в генах *GJB2*, *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* проводилась в два этапа.

Лигирование проводили на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы “ДНК-технология” (Россия) с использованием ДНК-лигазы Pfu (“Stratagene”), в 5 мкл реакционной смеси, содержащей однократный реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1 mM DTT), специфичные пробы, 0.04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы, 0.1–1 мкг геномной ДНК, 20–30 мкл минерального масла, в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C – 5 мин, затем лигирование при 59–64°C – 1 ч.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) всех исследуемых фрагментов проведена на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы

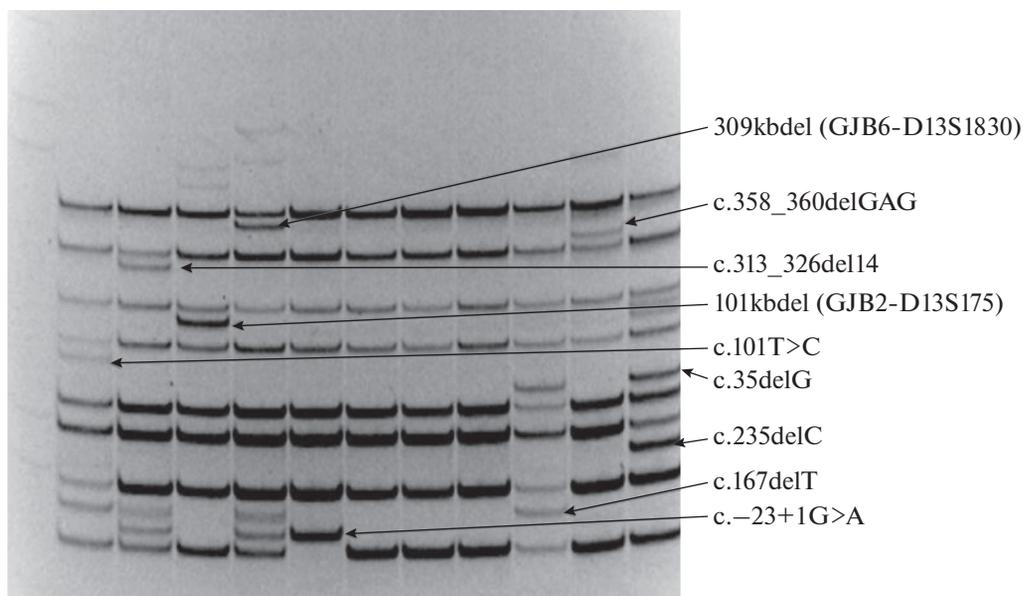


Рис. 2. Система регистрации наиболее частых мутаций в гене *GJB2* методом MLPA-анализа в одной пробирке.

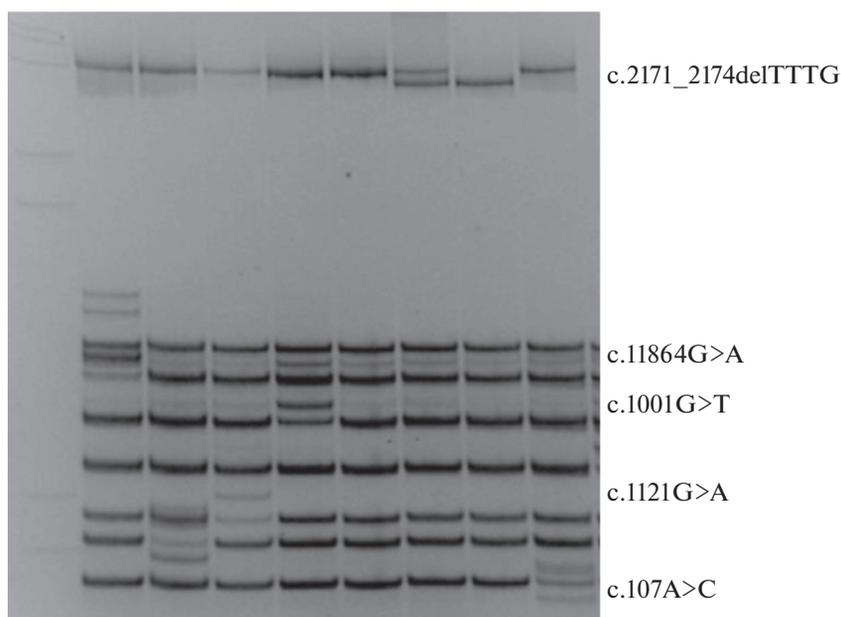


Рис. 3. Система регистрации наиболее частых мутаций в генах, вызывающих не CX26-тугоухость, методом MLPA-анализа в одной пробирке.

“ДНК-технология” (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq (“БиоМастер”), в 20 мкл реакционной смеси, содержащей однократный реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Twin-20), 0.25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1.5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 20–30 мкл минерального масла. Режим ПЦР: первоначальная денатурация при

95°C – 5 мин, затем 32 цикла смены температур: 94°C – 2 с, температура отжига праймеров 66°C – 2 с, элонгация цепи 72°C – 2 с; заключительная элонгация 72°C – 7 мин. Для проведения ПЦР используется режим точной регуляции.

Электрофорез ПАА-геля длиной 20 см, толщиной 1 мм проводили при комнатной температуре, напряженности 5 В/см с использованием в качестве электрофорезного буфера 1× TBE в течение

Таблица 1. Частые варианты в гене *GJB2*

Вариант	Количество хромосом
c.35delG	11
c.358_360delGAG	9
c.-23+1G>A	5
c.101T>C	1

трех часов. После электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл в $1 \times$ TBE) и визуализировали с помощью системы GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Больным, у которых был выявлен один патогенный вариант или не было выявлено ни одного патогенного варианта из девяти частых патогенных вариантов в гене *GJB2*, исследовали кодирующую последовательность гена *GJB2* методом прямого автоматического секвенирования. Для секвенирования по Сенгеру использовали фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР, с применением набора реактивов ABI Dye Terminator, version 1 (Applied Biosystems) с последующим анализом на приборе 3130 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas version 2 (Technelysium). Праймеры для амплификации были выбраны из фланкирующих кодирующий экзон гена *GJB2* нуклеотидных последовательностей.

Название обнаруженных изменений в гене *GJB2* присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), использовалась референсная последовательность кДНК, представленная на портале NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>): NM_004004.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск причины заболевания проводился по следующей схеме:

1. Поиск частых патогенных вариантов в гене *GJB2* c.35delG, c.-23+1G>A (IVS1+1G>A), c.313_326del14, c.235delC, c.358_360delGAG (p.Glu120del), c.101T>C (p.Met34Thr), c.167delT, 101kdel(GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del) и 309kdel (GJB6-D13S1830) (NC_000013.10: g.20797177_21105945) (рис. 2).

2. Поиск патогенных вариантов методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру кодирующей последовательности гена *GJB2* проводился больным, у которых был выявлен один патогенный вариант или не было выявлено ни одного патогенного варианта.

3. Поиск частых патогенных вариантов в генах *STRC* (c.2171_2174delTTTG), *USH2A* (c.11864G>A (p.Trp3955*)), *SLC26A4* (c.1001G>T (p.Gly334Val) и c.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (c.1121G>A (p.Trp374*)) (рис. 3) проводился больным, у которых не было выявлено патогенных вариантов в гене *GJB2* на обеих хромосомах.

Данный алгоритм является эффективным для постановки диагноза российским больным не-синдромальной тугоухостью и уже на первом этапе позволяет выявлять до 97% патогенных вариантов у больных, заболевание которых связано с нарушениями в гене *GJB2* [11].

Среди 117 неродственных слышащих грузин проводился поиск девяти наиболее частых патогенных вариантов в гене *GJB2* для установления популяционной частоты носительства *GJB2*-тугоухости.

Поиск частых для российской популяции патогенных вариантов в гене GJB2

В ходе исследования частые патогенные варианты гена *GJB2* были выявлены у 15 пробандов. У 11 пробандов патогенные варианты присутствовали на обеих хромосомах, у четырех — только на одной. Всего было выявлено четыре варианта. Мутация c.35delG была обнаружена на 11 хромосомах, c.358_360delGAG — на девяти хромосомах, c.-23+1G>A — на пяти хромосомах, c.101T>C — на одной хромосоме (табл. 1).

Варианты c.35delG и c.358_360delGAG встретились в гомозиготном состоянии, каждый у двух пробандов. У четырех пробандов эти же варианты встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии. У троих пробандов варианты c.35delG и c.-23+1G>A были выявлены в компаунд-гетерозиготном состоянии. У четверых пробандов были выявлены варианты только на одной хромосоме: у двоих — вариант c.-23+1G>A, у одного — c.358_360delGAG, и у одного — c.101T>C. Нами не проводилось дополнительное исследование с целью установления цис-, транс-положения выявленных вариантов, однако в литературе нет упоминаний о цис-положении данных вариантов, поэтому мы считали, что варианты располагаются на разных хромосомах. Таким образом, после первого этапа исследования молекулярно-генетический диагноз установлен 11 пробандам.

Секвенирование кодирующей последовательности гена GJB2

На следующем этапе мы провели секвенирование кодирующей последовательности гена *GJB2* 28 пробандам с неустановленной на молекулярном уровне причиной заболевания. Нами был выявлен один патогенный вариант — c.551G>C в гомозиготном состоянии у одного больного. Та-

ким образом, молекулярный диагноз установлен еще одному больному.

Поиск частых на территории РФ патогенных вариантов в генах STRC, USH2A, SLC26A4, CLIC5

У 27 пробандов был проведен поиск частых патогенных вариантов в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* методом аллель-специфичного лигирования. Ни у одного больного не было выявлено вариантов: с.2171_2174delTTTG в гене *STRC*, с.11864G>A (p.Trp3955*) в гене *USH2A*, с.1001G>T (p.Gly334Val) и с.107A>C (p.His36Pro) в гене *SLC26A4* и с.1121G>A (p.Trp374*) в гене *CLIC5*.

Определение популяционной частоты носительства девяти мутаций в гене GJB2

Проведено исследование 117 образцов ДНК выборки этнических грузин с целью определения популяционной частоты носительства девяти мутаций в гене *GJB2*. В популяционной выборке были выявлены патогенные варианты: с.35delG – на двух хромосомах и с.358_360delGAG – на одной хромосоме. Таким образом, выявлено три гетерозиготных носителя мутаций в гене *GJB2*. Частота носительства частых мутаций в гене *GJB2* в Грузии составила один на 39 человек (2.6% (0.53–7.49% при 95% ДИ)).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление генетической природы тугоухости необходимо для генетического консультирования, а также тактики реабилитации больных. Нами была установлена причина нейросенсорной тугоухости у 12 пробандов. У четверых пробандов варианты с.35delG и с.358_360delGAG встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии, у троих больных в компаунд-гетерозиготном состоянии выявлены варианты с.35delG и с.–23+1G>A, варианты с.35delG и с.358_360delGAG в гомозиготном состоянии встретились каждый у двух больных и у одного больного в гомозиготном состоянии был выявлен вариант с.551G>C. У четверых больных мутация в гене *GJB2* выявлено только на одной хромосоме (табл. 2). Таким образом, у 11 из 12 больных молекулярно-генетическая причина заболевания была установлена на первом этапе исследования, что говорит о высокой эффективности использования системы регистрации частых у российских больных мутаций в гене *GJB2* и для грузинских больных нейросенсорной тугоухостью.

Согласно публикации Е. Близнец с соавт. [11], исследование всей кодирующей последовательности гена *GJB2* в сочетании с поиском патогенного варианта с.–23+1G>A, а также поиском крупной делеции 309kdel (GJB6-D13S1830)

Таблица 2. Генотипы больных

Генотип	Количество
c.[35delG];[358_360delGAG]	4
c.35delG(;)-23+1G>A	3
c.[35delG];[35delG]	2
c.[358_360delGAG];[358_360delGAG]	2
c.[551G>C];[551G>C]	1
c.[358_360delGAG];[=]	1
c.[-23+1G>A];[=]	2
c.[101T>C];[=]	1

(NC_000013.10: g.20797177_21105945) позволяет выявлять 100% мутаций у российских пациентов. Также в систему регистрации наиболее частых мутаций в гене *GJB2* включена еще одна крупная делеция, которую невозможно выявить в гетерозиготном состоянии, исследуя кодирующую последовательность гена *GJB2* методом секвенирования по Сенгеру – 101kdel (GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del), являющаяся частой у ингушских больных [19].

Используя данную стратегию в исследуемой выборке, мы выявили, что у 12 из 39 (30.8%) больных нейросенсорной тугоухостью из Грузии заболевание связано с биаллельными повреждениями в гене *GJB2*. Также нами обнаружено, что у четверых больных (10%) патогенный вариант выявлен только на одной хромосоме. Установленная нами частота гетерозиготного носительства частых мутаций в гене *GJB2* у грузин – 2.6%.

Частота гетерозигот по мутации в гене *GJB2* в группе больных с неустановленным молекулярным диагнозом составила 14.8% (4 из 27 больных). Так как между установленной частотой популяционного носительства (2.6%) и полученной среди грузинских больных (14.8%) имеется достоверное отличие ($p < 0.05$), полученные результаты нельзя объяснить случайным гетерозиготным носительством больных мутаций в гене *GJB2*. Таким образом, как минимум у троих из этих четверых больных должен существовать второй патогенный в гене *GJB2* за пределами изученной нами кодирующей области гена (в регуляторных элементах, промоторе или нетранскибируемых областях гена). Также есть работы, доказывающие дигенное *GJB2/GJB3* наследование тугоухости [20, 21]. Возможно секвенирование кодирующей последовательности гена *GJB3* внесет ясность в причину тугоухости у этих больных.

У всех больных с выявленным патогенным вариантом на одной хромосоме наблюдалась IV сте-

Таблица 3. Доли выявленных вариантов в гене *GJB2*

Вариант	Количество хромосом среди больных с двухаллельными мутациями	Доля среди больных с двухаллельными мутациями, %	Количество хромосом среди всех больных
c.35delG	11	45.8	11
c.358_360delGAG	8	33.3	9
c.-23+1G>A	3	12.5	5
c.551G>C	2	8.3	2
c.101T>C	0	0	1
Всего	24	100	28

пень тугоухости. У одного больного родители отметили снижение слуха в три года после перенесенного инфекционного заболевания, у остальных трех больных зарегистрирована долингвальная тугоухость. У больных с биаллельными мутациями выявлено четыре патогенных варианта: c.35delG, c.358_360delGAG, c.-23+1G>A и c.551G>C.

Наиболее частый патогенный вариант c.35delG в гене *GJB2* также оказался наиболее частым и у грузинских больных с биаллельными мутациями с долей среди патогенных вариантов *GJB2* – 45.8% (табл. 3). В европейских популяциях доля варианта c.35delG среди *GJB2*-аллелей колеблется в диапазоне от 60 до 80% [22], однако его доля значительно ниже в некоторых этнических изолятах [23], что наблюдается и в исследуемой выборке.

Вторым по частоте оказался вариант c.358_360delGAG с долей 33.3% среди пациентов с двухаллельными мутациями (табл. 3). Делеция трех нуклеотидов приводит к удалению глутаминовой кислоты в 120-ом положении белка (p.Glu120del). Среди грузинских больных вариант встретился на девяти хромосомах у семи больных, у одного из которых в компаунд-гетерозиготном состоянии с не идентифицированной мутацией. Мутация c.358_360delGAG впервые описана в 1999 г. у итальянских больных [24]. О данном варианте сообщалось как о широко распространенной мутации в популяции курдов – 9.4% [25], у турецких (9.5%) [26] и иранских больных (4%) [27]. У российских и белорусских больных мутация p.Glu120del встречается с частотой 1 и 2.5% соответственно [11, 12, 19]. Таким образом, вариант c.358_360delGAG среди грузинских больных встретился с максимальной частотой среди ранее описанных популяций.

Следующим по частоте был вариант c.-23+1G>A. Мутация встретилась на пяти хромосомах – у троих больных в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией c.35delG, у двоих – с неидентифицированной мутацией на второй хромосоме (табл. 2). Аллельная частота варианта c.-23+1G>A среди больных с двухаллельными мутациями составила 12.5% (табл. 3). Мутация c.-23+1G>A впервые описана в 1999 г. [28], однако долгое время не входила в рутинную диагностику *GJB2*-тугоухости во многих лабораториях мира [29, 30]. После включения в тестирование, а также поиска данного варианта у больных с одной выявленной мутацией, оказалось, что вариант c.-23+1G>A является достаточно распространенным во многих популяциях во всем мире [29, 30]. Максимальная аллельная частота наблюдается в Якутии – 11.7% [31], у азербайджанско-турецких пациентов из Ирана частота – 4.9% [29], в иранской популяции курдов – 1.4% [23], в Европе максимальная частота зафиксирована в Чехии – 4% [30]; в России и Белоруссии частота составила 4 и 2% соответственно [11, 12].

Вариант нуклеотидной последовательности c.551G>C приводит к миссенс-замене аргинина на пролин в 184 положении белка. Вариант c.551G>C был выявлен у одного больного в гомозиготном состоянии (табл. 2). Впервые мутация c.551G>C (p.R184P) была описана в 1997 г. у больного из Австралии [32]. Вариант достаточно редкий и отсутствует во многих популяциях по результатам многих исследований [11]. Однако вариант c.551G>C встречается в популяциях, в которых значительный вклад вносят варианты c.358_360delGAG и c.-23+1G>A: у иранских курдов – 0.2% [23], у турецких – 3.2% [26] и иранских больных – 0.74% [27].

Таким образом, спектр мутаций у грузинских больных GJB2-тугоухостью схож со спектром турецких и иранских пациентов. Также все выявленные мутации зафиксированы у российских пациентов [11, 19]. У всех больных с двухаллельными мутациями в гене *GJB2* наблюдалась четвертая степень долигвалльной тугоухости. Что можно объяснить тем, что для всех выявленных мутаций характерно серьезное нарушение функции белка, что ведет к потере активности канала и, в свою очередь, к тяжелым фенотипическим проявлениям, т.е. к тяжелой степени тугоухости [15, 33].

Система для регистрации частых у российских пациентов патогенных вариантов в гене *GJB2* также эффективна и среди грузинских больных с тугоухостью и выявляет причину заболевания не менее чем у 28% больных. Добавление в систему регистрации частых для российской популяции мутаций, возможность регистрации патогенного варианта с.551G>C повысит информативность диагностики до 31%.

Часто встречающиеся в России патогенные варианты в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* не были выявлены среди грузинских больных. Так как патогенные варианты в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4* вносят значительный вклад в причину тугоухости в различных популяциях мира [22, 34], поиск мутации во всей кодирующей последовательности этих генов, вероятно поможет определить генетическую причину у части и грузинских больных. Также возможно окажется более дешевым и эффективным для рутинной диагностики тугоухости у грузинских больных создание системы регистрации частых для турецких и иранских больных мутаций в этих генах.

Потеря слуха генетически неоднородна и как правило моногенная. В настоящее время идентифицировано 123 гена, вызывающих несиндромальную тугоухость [35], а многие гены еще предстоит идентифицировать. Мутации в *GJB2* на сегодняшний день считаются основной генетической причиной несиндромальной потери слуха во всем мире. По результатам настоящего исследования, после скрининга на частые мутации в гене *GJB2* следующим этапом для поиска причины заболевания у грузинских больных можно предложить полноэкзомное или полногеномное секвенирование.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хель-

синкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kenneson A., Van Naarden Braun K., Boyle C.* GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review // *Genet. Med.* 2002. V. 4(4). № 258. P. 74. <https://doi.org/10.1097/00125817-200207000-00004>
2. *Kral A., O'Donoghue G.M.* Profound deafness in childhood // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. № 15. P. 1438–1450. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0911225>
3. ACMG. Genetics evaluation guidelines for the etiologic diagnosis of congenital hearing loss. Genetic evaluation of congenital hearing loss expert panel: ACMG statement // *Genet. Med.* 2002. V. 4. P. 162–171.
4. *Hone S.W., Smith R.J.* Medical evaluation of pediatric hearing loss: laboratory, radiographic, and genetic testing // *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2002. V. 35. P. 751–764.
5. *Bolz H.* Hereditary hearing loss and its syndromes third edition // *Eur. J. Hum. Genet.* 2016. V. 24. P. 1650. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.67>
6. *Kumar N.M., Gilula N.B.* The gap junction communication channel // *Cell.* 1996. V. 84. № 3. P. 381–388. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81282-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81282-9)
7. *Söhl G., Willecke K.* Gap junctions and the connexin protein family // *Cardiovasc. Res.* 2004. V. 62. № 2. P. 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.013>
8. *Lee S.W., Tomasetto C., Paul D. et al.* Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines // *J. Cell Biol.* 1992. V. 118. P. 1213–1221.
9. *Green G.E., Scott D.A., McDonald J.M. et al.* Carrier rates in the midwestern United States for *GJB2* mutation causing inherited deafness // *JAMA.* 1999. V. 28. P. 2211–2216.
10. *Sobe T., Vreugde S., Shahin H. et al.* The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population // *Hum. Genet.* 2000. V. 106. P. 50–57.
11. *Близнец Е.А., Галкина В.А., Матющенко Г.Н. и др.* Изменения в гене коннексина 26 – GJB2 – при нарушениях слуха у российских пациентов: результаты многолетней молекулярной диагностики наследственной несиндромальной тугоухости // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 1. С. 112–124.
12. *Близнец Е.А., Марицук Д.Н., Хоров О.Г. и др.* Спектр мутаций в гене *GJB2* у белорусских пациентов с тугоухостью. Результаты пилотного генетического

- скрининга нарушения слуха у новорожденных // Генетика. 2014. Т. 50. № 2. С. 214–221.
<https://doi.org/10.7868/S0016675814020039>
13. *Джемилева Л.У., Барашков Н.А., Посух О.Л. и др.* Анализ гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, и 167delT в гене *GJB2* в популяциях Евразии // Мед. генетика. 2009. Т. 8. № 8. С. 20–28.
 14. *Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J. et al.* Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness // N. Engl. J. Med. 1998. V. 339. P. 1500–1505.
 15. *Cryns K., Orzan E., Murgia A. et al.* A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness // Med. Genet. 2004. V. 41. P. 147–154.
 16. *Chan D.K., Chang K.W.* GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype // Laryngoscope. 2014. V. 124. № 2. P. E34–E53.
<https://doi.org/10.1002/lary.24332>
 17. *Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А. и др.* Мутации гена коннексина 26 (*GJB2*) у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухостью в Республике Саха (Якутия) // Вестник оториноларингологии. 2008. № 5. С. 23–29.
 18. *Близнец Е.А., Саркисян Т.Ф., Манукян Т.А. и др.* Тугоухость у армян, обусловленная мутациями в гене коннексина 26 – *GJB2* // Мед. генетика. 2012. Т. 11. № 5(119). С. 23–28.
 19. *Bliznetz E.A., Lalayants M.R., Markova T.G. et al.* Update of the *GJB2/DFNB1* mutation spectrum in Russia: A founder Ingush mutation del (*GJB2-D13S175*) is the most frequent among other large deletions // J. Hum. Genet. 2017 V. 8. № 62(8). P. 789–795.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2017.42>
 20. *Liu X.Z., Yuan Y., Yan D. et al.* Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins *Cx26* and *Cx31* // Hum. Genet. 2009. V. 125(1) P. 53–62.
<https://doi.org/10.1007/s00439-008-0602-9>
 21. *Yu X., Lin Y., Xu J. et al.* Molecular epidemiology of Chinese Han deaf patients with bi-allelic and mono-allelic *GJB2* mutations // Orphanet. J. Rare Dis. 2020. V. 28. № 15(1). P. 29.
<https://doi.org/10.1186/s13023-020-1311-2>
 22. *Baux D., Vaché C., Blanchet C. et al.* Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients // Sci. Rep. 2017. V.1 № 7(1). P. 16783.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16846-9>
 23. *Najmabadi H., Nishimura C., Kahrizi K. et al.* GJB2 mutations: passage through Iran // Am. J. Med. Genet. 2005. V. 1 № 133A(2). P. 132–137.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30576>
 24. *Murgia A., Orzan E., Polli R. et al.* Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability // J. Med. Genet. 1999. V. 36(11). P. 829–832.
 25. *Mahdieh N., Nishimura C., Ali-Madadi K. et al.* The frequency of *GJB2* mutations and the Delta (*GJB6-D13S1830*) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population // Clin. Genet. 2004. V. 65(6). P. 506–508.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00262.x>
 26. *Yilmaz A., Menevse S., Bayazit Y. et al.* Two novel missense mutations in the connexin 26 gene in Turkish patients with nonsyndromic hearing loss // Biochem. Genet. 2010. V. 48(3–4). P. 248–256.
<https://doi.org/10.1007/s10528-009-9314-7>
 27. *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. V. 77(6). P. 945–957.
<https://doi.org/10.1086/497996>
 28. *Denoyelle F., Marlin S., Weil D. et al.* Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: Implications for genetic counselling // Lancet. 1999. V. 17. № 353(9161). P. 1298–1303.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11071-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11071-1)
 29. *Bonyadi M., Fotouhi N., Esmaeili M.* Prevalence of IVS1+1G>A mutation among Iranian Azeri Turkish patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2011. V. 75(12). P. 1612–1615.
<https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.09.024>
 30. *Seeman P., Sakmaryová I.* High prevalence of the IVS1 + 1 G to A/*GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2* // Clin. Genet. 2006. V. 69(5). P. 410–413.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00602.x>
 31. *Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A. et al.* Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: Extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene as a result of founder effect // J. Hum. Genet. 2011. V. 56(9). P. 631–619.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2011.72>
 32. *Denoyelle F., Weil D., Maw M.A. et al.* Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene // Hum. Mol. Genet. 1997. V. 6(12). P. 2173–2177.
<https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2173>
 33. *Pfenniger A., Wohlwend A., Kwak B.R.* Mutations in connexin genes and disease // Eur. J. Clin. Invest. 2011. V. 41(1). P. 103–116.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02378.x>
 34. *Marková S.P., Brožková D.Š., Laššuthová P. et al.* *STRC* gene mutations, mainly large deletions, are a very important cause of early-onset hereditary hearing loss in the Czech population // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2018. V. 22(2). P. 127–134.
<https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0155>
 35. <https://hereditaryhearingloss.org/>

Molecular Genetic Study of the Causes of Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss in Patients from Georgia

A. A. Stepanova^{a, *}, O. A. Ismagilova^a, N. M. Galeeva^a, N. G. Markova^b,
G. A. Tavartkiladze^{b, c}, O. Kvlividze^{c, d}, and A. V. Polyakov^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

^bNational Research Centre for Audiology and Hearing Rehabilitation, Moscow, 117513 Russia

^cGeorgian Foundation for Genetic and Rare Diseases, Tbilisi, 0162 Georgia

^d“New Vision” University, Medical School, Tbilisi, 0159 Georgia

*e-mail: cany@yandex.ru

Pathogenic variants in the *GJB2* gene are the most common reason for nonsyndromic sensorineural hearing loss. In this study, we examined Georgian patients with sensorineural hearing loss. We establish the ratio of *GJB2*-related deafness among patients with impaired hearing. The mutation spectrum of the *GJB2* gene in Georgia is represented by the following pathogenic variants: c.35delG, c.358_360delGAG, c.-23+1G>A, and c.551G>C. The estimated *GJB2*-related hearing loss carrier frequency is 2.6%. The following variants, which are common in Russian patients, were not detected in Georgian patients: *STRC* (c.2171_2174delTTTG), *USH2A* (c.11864G>A), *SLC26A4* (c.1001G>T and c.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (c.1121G>A). Molecular genetic diagnosis was established for 30.8% of patients.

Keywords: hearing loss, *GJB2*, GJB2-hearing loss, Georgia.