

Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей, страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью

НЕКРАСОВА Н.Ю., ШАГИНА И.А., ПЕТРИН А.Н., ПОЛЯКОВ А.В.

ГУ Медико-генетический научный центр РАМН Москва, ул. Москворечье, 1.

Проведен анализ частоты встречаемости мутации 35delG в гене коннексина 26 у 148 слабослышащих и глухих детей. У детей с ранней детской нейросенсорной тугоухостью (НСТ), имеющих родителей или родственников со снижением слуха, частота мутации 35delG составила 86%. У детей с не выявленными внешнесредовыми факторами риска НСТ и неотягощенным семейным анамнезом данная мутация была обнаружена в 44% случаев. Частота мутации 35delG среди всех мутантных аллелей по коннексину 26 составила 82%. Высокая частота данной мутации среди пациентов с ранней детской НСТ позволяет проводить эффективное медико-генетическое консультирование семей, отягощенных по глухоте.

Введение

В структуре наследственной патологии детского возраста патология органов слуха занимает существенное место. Раннее снижение слуха обуславливает недоразвитие речи, снижение социальной адаптации, поэтому такие дети нуждаются в своевременно начатой коррекции, а семьи должны быть проинформированы о возможности медико-генетического консультирования с целью уточнения причин возникновения тугоухости и риска рождения других детей с данной патологией. По данным М.Г. Блюминой, в структуре детской тугоухости преобладает НСТ, она встречается у 91,4% больных детей [2].

По своей причине тугоухость можно разделить на две большие группы: генетически обусловленная и приобретенная. Приобретенная тугоухость возникает в результате действия различных неблагоприятных внешнесредовых факторов на плод, новорожденного или ребенка старшего возраста. Наиболее значимыми факторами риска являются: врожденные инфекции; низкий вес при рождении; гипербилирубинемия, лечение ототоксическими лекарственными препаратами и др.

Частота наследственной тугоухости и глухоты около 1 больного на 1000 новорожденных детей, что составляет около 60% всех случаев врожденной и ранней детской тугоухости [6, 14]. Ряд форм поздней тугоухости у взрослых также может определяться наследственными факторами.

Наследственные формы тугоухости/глухоты представляют собой генетически и клинически гетерогенную группу заболеваний, что составляет основную сложность для клинической диагностики. Чаще всего они классифицируются на **несиндромальные** (изолированные) и **синдромальные** формы, при которых поражаются и другие органы и системы.

Несиндромальная тугоухость составляет 70—80% [8] среди всех наследственных форм нарушений слуха. Для несиндромальной НСТ показаны все

типы наследования, включая X-сцепленный и митохондриальный. На сегодняшний день благодаря методам анализа генетического сцепления идентифицировано около 70 генных локусов, сцепленных с несиндромальными наследственными нарушениями слуха.

В отягощенных семьях преобладает аутосомно-рецессивный тип наследования НСТ, на его долю приходится 80% всей НСТ [1, 2, 4, 10]. Известно 29 генетических локусов аутосомно-рецессивной (АР) НСТ, в 10 из них идентифицированы гены, мутации в которых приводят к развитию тугоухости (<http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>). АР НСТ в большинстве своем является непрогрессирующей тугоухостью с началом в доречевой период. К 1999 г. рядом исследователей Европы и США было показано, что около 50% всех случаев АР НСТ/глухоты в больших семьях Франции, Великобритании, Туниса, США и Новой Зеландии связаны с изменениями только в одном локусе — DFNB1, локализованном на хромосоме 13q11 [13]. В данном локусе расположен ген коннексина 26 (GJB2).

Коннексин 26 относится к порообразующим белкам, которые представляют собой высокоспециализированные структуры, создающие каналы для прямого межклеточного обмена ионов и малых молекул. Каналы участвуют в быстром распространении электрического сигнала и синхронизации активности в возбудимых тканях, а также обмену метаболитами и сигнальными молекулами в невозбудимых тканях. Показано, что коннексин 26 экспрессируется почти во всех типах клеток внутреннего уха: в сосудистой полоске улитки, базилярной мембране, в области limbus и в спиральном возвышении улитки. Было показано, что клетки улитки соединяются посредством порообразующих белков, коннексоны которых формирует коннексин 26 [7]. При нарушении синтеза этого белка именно в тканях внутреннего уха не происходит замены белка Cx26

на другой тип коннексина, что прослеживается в других тканях [15].

Мутации в гене коннексина 26 ответственны примерно за половину всех случаев АР НСТ. На сегодняшний день известно 75 различных мутаций в этом гене [9, 12].

Среди них, мутация 35delG (делеция одного из шести гуанидинов в 30–35-й позиции) является наиболее частой среди пациентов большинства стран Европы, Северной Африки, Новой Зеландии, США. Средняя частота носительства данной мутации в Европе — 1/51,1 [5], в популяциях России (мари, коми, чуваша, якуты, башкиры) — 1/46,7 [3]. Частота мутации 35delG среди всех мутантных аллелей по коннексину 26 варьирует от 55 до 88%. Значимость мутации 35delG для медико-генетического консультирования чрезвычайно высока, поскольку ее частота среди пациентов с врожденным снижением слуха (семейным или спорадическим) составляет около 40%.

Здесь мы приводим результаты оценки частоты мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей, страдающих ранней детской НСТ.

Материалы и методы

Обследовано 148 слабослышащих и глухих не родственных пациентов. Возраст пробандов варьировал от 7 до 20 лет. Все они были учащимися школ для слабослышащих или глухих детей. Степень снижения слуха у них была различной. Преобладали пациенты с 3–4-й степенью тугоухости (88 пробандов) и глухотой (48 пробандов), хотя некоторые обследованные дети имели 1–2-ю степень тугоухости (12 пробандов). Анамнестические данные были собраны путем анкетирования родителей.

Все пациенты были разделены на 3 большие группы (рис. 1).

В первую группу вошли дети с отягощенным семейным анамнезом. Эта группа состояла из 49 пациентов. У 29 детей оба родителя были слабослышащими или глухими, у 5 — снижение слуха имел один из родителей, 15 пробандов имели здоровых родителей, но снижение слуха имелось либо у сибсов, либо у родственников 2–3-й степени родства.

148 пробандов

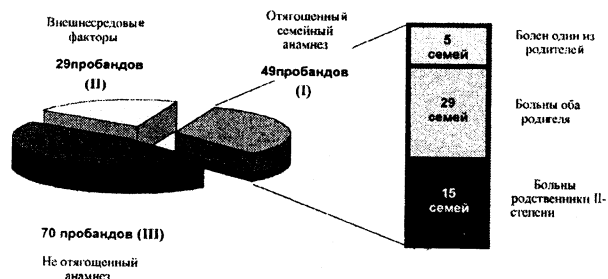


Рис. 1. Структура выборки больных с НСТ

Вторая группа пациентов состояла из 70 человек. У них родители имели нормальный слух, в семейном анамнезе не было случаев НСТ, снижение слуха было единичным в семье, и у больных не было выявлено влияния внешнесредовых факторов риска НСТ.

Третья группа включала пациентов с неотягощенным семейным анамнезом, но с наличием тех или иных внешнесредовых факторов риска НСТ. Учитывались заболевания матери краснухой во время беременности, вес при рождении менее 1500 г, недоношенность с более высоким весом и тяжелым неонатальным периодом, гнойные менингиты в возрасте до двух лет. Таких пациентов было 29.

Молекулярно-генетический анализ

Забор крови проводился при помощи медицинского скарификатора из пальца на фильтровальную бумагу в виде двух пятен диаметром 15–20 мм. Пятна крови высушивали и хранили при комнатной температуре. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови, используя набор реактивов Diatom™ DNA Prep100 (производство фирмы “Диатом”), предназначенный для выделения ДНК из различных биологических тканей, по методике, рекомендованной изготовителем.

Аmplификацию проводили с использованием праймеров: F: 5'-CTTTTCCAGAGCAAACCGCCC; R: 5'-TGCTGGTGGAGTGTTTGTTTAC.

Длина амплификационного фрагмента в норме составила 89 п.н., при мутации 35delG — 88 п.н.

Аmplификацию проводили по следующей схеме: 0,5 мкг геномной ДНК, 0,5 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата помещали в 25 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 67 mM Tris-HCl, pH 8,8; 1,6 mM MgCl₂; 16,6mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Twin-20. В полученную смесь добавляли одну единицу термофильной ДНК-полимеразы *Terminus aquaticus* производства института прикладной энзимологии “Ферментас” (г. Вильнюс) и 25–30 мкл минерального масла.

Проводили 30 циклов в следующем режиме:
 первоначальная денатурация 95°C — 3–5 мин,
 94°C — 45 с,
 55°C — 45 с,
 72°C — 45 с,
 финальная достройка 72°C — 7 мин.

Результаты амплификации оценивали в 9%-ном полиакриламидном геле (АА:БисАА = 29:1,3) длиной 20 см. В качестве буфера для электрофореза использовали 1xTBE. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 320 В. В качестве маркера молекулярно-веса использовали ДНК фага λ, обработанную эндонуклеазой Pst I.

После разделения продуктов ПЦР гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,1 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете.

Результаты

Мутация 35delG была выявлена нами во всех группах больных (рис. 2). Результаты молекулярно-генетических исследований представлены в табл. 1, 2 и 3.

Мутация 35delG была обнаружена нами у 76 пробандов: у 53 в гомозиготном состоянии и у 23 — в гетерозиготном. Учитывая соотношение числа гомо- и гетерозиготных носителей мутации, мы провели оценку доли (р) делеции 35delG среди всех мутаций в локусе DFNB1.

Действительно, число гомозиготных носителей мутации равно:

$$p^2 = 53/N (1),$$

где N — общее число пробандов с мутациями в локусе DFNB1.

Число гетерозиготных носителей равно:

$$2p(1 - p) = 23/N (2)$$

Деля равенство (1) на равенство (2), получаем: $p/2(1 - p) = 53/23$.

Решение этого линейного уравнения дает значение р, равное 0,822. Таким образом, доля мутации

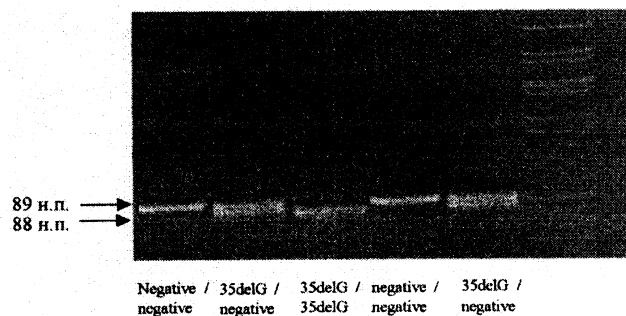


Рис. 2. Электрофореграмма результатов анализа мутации 35delG в гене GJB2

35delG составляет 82% среди всех мутаций в локусе DFNB1.

Обсуждение

Различные случаи врожденной нейросенсорной тугоухости могут иметь одинаковую клиническую картину, а этиологический диагноз может быть очень важен для большинства семей. Проведение медико-генетического консультирования семей,

Таблица 1

Распределение мутации 35delG в гене GJB2 у слабослышащих и глухих пациентов

Группа	I		II		III		Всего	
	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%
Всего семей	49	100	70	100	29	100	148	100
35delG/35delG	32	65	21	30	—	—	53	36
35delG/negative	10	21	10	14	3	10	23	16
Negative/negative	7	14	39	56	26	90	72	48

Таблица 2

Распределение мутации 35delG в гене GJB2 в группе пробандов с отягощенным семейным анамнезом (группа I)

Подгруппа	С двумя глухими родителями		С одним глухим родителем		Со слышащими родителями и отягощенным семейным анамнезом		Всего	
	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%
Всего семей	29	100	5	100	15	100	49	100
35delG/35delG	23	79	—	—	9	60	32	65
35delG/negative	5	17	1	20	4	27	10	21
Negative/negative	1	3,5	4	80	2	13	7	14

Таблица 3

Частота хромосом с мутацией 35delG по группам больных

Группа	Число неродственных хромосом	35delG	
		Число	%
I	98	74	76
II	140	52	37
III	58	3	5
Всего	296	129	44

имеющих глухого ребенка, до последнего времени осуществлялось только с использованием эмпирических таблиц повторного риска. Мы провели оценку частоты мажорной мутации в локусе *DFNB1* в выборке российских больных с НСТ, различающихся степенью отягощенности семейного анамнеза и влиянием внешнесредовых факторов риска тугоухости.

Мутация *35delG* была выявлена у большей части больных, что согласуется с литературными данными. Особенно высокая частота мутации *35delG* обнаружена у пробандов, в семьях которых регистрировались повторные случаи заболевания (группа I). Доля таких пациентов в группе составила 86%.

Некоторой неожиданностью оказалось то, что у 23 из 29 детей с двумя глухими родителями мы обнаружили мутацию *35delG* в гомозиготном состоянии, а у 5 — в гетерозиготном. Частота встречаемости мутации в этой подгруппе составила 97%! Так как среди глухих очень распространены ассортативные браки, оценить тип наследования тугоухости по родословной непросто. В связи с большой распространенностью тугоухости, обусловленной мутациями в гене коннексина 26, существует вероятность того, что в брак вступят супруги, имеющие рецессивную форму тугоухости, обусловленную мутациями в гене коннексина 26. При этом родословные будут приобретать нетипичный для аутосомно-рецессивного наследования вертикальный тип передачи глухоты [11, 16]. Полученные нами данные свидетельствуют о преобладающей роли мутации *35delG* в группе семей с ассортативными браками в изученной выборке больных.

Высокая частота мутации *35delG* была обнаружена в подгруппе детей из семей со слышащими родителями и родственниками с тугоухостью. Она составила 87%, причем число гомозиготных носителей мутации было более чем в 2 раза выше, чем гетерозиготных. Полученные данные подтвердили аутосомно-рецессивный характер патологии в этой группе семей, преимущественно обусловленный мутациями в гене коннексина 26.

В подгруппе детей, где был болен ребенок и один из родителей, мутация *35delG* была выявлена только у одного из пяти пробандов в гетерозиготном состоянии. Полученные данные свидетельствуют о наиболее вероятном аутосомно-доминантном типе наследования НСТ в этих семьях и о непричастности мутации *35delG* к развитию данной формы заболевания.

В группе II — в семьях с единичными случаями снижения слуха у ребенка — частота встречаемости мутации *35delG* составила 44%, 30% пробандов имели мутацию в гомозиготном состоянии, 14% — в гетерозиготном. Таким образом, заболевание в этих случаях имеет генетическую природу и мутация *35delG* отвечает за значительную долю изолированных случаев НСТ в изученной выборке.

В группе пациентов с внешнесредовыми факторами риска НСТ (группа III), ни у одного из детей

не было выявлено мутации *35delG* в гомозиготном состоянии. В гетерозиготном состоянии мутация была выявлена у 1 из 9 детей, имеющих в анамнезе указание на заболевание матери краснухой во время беременности, у 1 из 5 детей, имевших вес при рождении менее 1500 гр., у 1 из 10 детей, переболевших гнойным менингитом в возрасте до двух лет. Ни у одного из 5 пациентов, имевших тяжелый перинатальный период, мутация выявлена не была. Таким образом, у 3 из 29 пациентов (10%), имевших в анамнезе указание на действие различных внешнесредовых факторов риска, была выявлена мутация *35delG* в гетерозиготном состоянии. Полученные данные свидетельствуют о приобретенном характере тугоухости у большей части больных в данной группе.

Учитывая соотношение числа гетеро- и гомозиготных носителей мутации *35delG*, мы оценили долю этой мутации среди всех мутаций в локусе *DFNB1*. Она оказалась равной 82%, что еще раз подчеркивает диагностическую значимость данной мутации.

Таким образом, при проведении медико-генетического консультирования поиск мутации *35delG* в гене коннексина 26 может быть рекомендован всем семьям с ранней детской НСТ. Обнаружение мутации в данном гене может являться дифференциально-диагностическим критерием для разграничения приобретенных и наследственных форм тугоухости, что может быть очень существенным для дальнейшего медико-генетического прогноза.

Таким образом, наша работа подтвердила факт, что среди причин доречевой НСТ существенное место занимают мутации в гене коннексина 26, наибольшее распространение имеет мутация *35delG*. Исследование ДНК пациентов с ранней детской НСТ на предмет выявления мутации *35delG* является эффективным молекулярно-генетическим тестом с целью установления этиологического диагноза.

Медико-генетическое консультирование с использованием молекулярно-генетических методов наиболее перспективно и позволяет дать семье более точный риск рождения ребенка, страдающего нарушениями слуха, а также проводить дородовую диагностику и проспективное консультирование семей, отягощенных по глухоте.

Список литературы

1. Блюмина М.Г., Московкина А.Г. Частота и типы наследования генетической нейросенсорной тугоухости у детей // Вестник оториноларингологии. — 1981. — № 3. — С. 21—25.
2. Блюмина М.Г., Московкина А.Г. Этиология нейросенсорной тугоухости, имеющих родителей с нормальным слухом // Вестник оториноларингологии. — 1982. — № 1. — С. 23—25.
3. Anichkina A., Kulenich T., Zinchenko S., Shagina I., Polyakov A., Ginter E., Evgrafov O., Viktorova T., Khusnitdonova E. On the origin and frequency of the *35delG* allele in *GJB2*-linked deafness in Europe // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9 (2). — P. 151.