

ТЕРЮТИН ФЕДОР МИХАЙЛОВИЧ

**ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ СЛУХА У
ИНДИВИДОВ С МУТАЦИЯМИ ГЕНА *GJB2* (Cx26) В ЯКУТИИ**

14.01.03 – болезни уха, горла и носа

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы, в ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» и в ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова».

Научные руководители:

Кунельская Наталья Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы

Барашков Николай Алексеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем»

Официальные оппоненты:

Морозова Светлана Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры болезней уха, горла и носа ГОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М.Сеченова»

Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр оториноларингологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита состоится «24» марта 2016 г. в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 850.003.01 при ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы, по адресу: 117152, г. Москва, Загородное шоссе, д.18 а, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы и на сайте института (www.mnrco.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Лучшева Ю.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Аутосомно-рецессивная глухота 1А типа – наследственное заболевание врожденного нарушения слуха преимущественно по сенсоневральному типу (ОМIM 220290), характеризующееся отсутствием патологии со стороны других органов и систем. В основе данного заболевания лежат изменения электрофизиологии улитки вследствие нарушения функции межклеточных каналов щелевого контакта (gap-junction), которые образуют белки семейства коннексинов с молекулярной массой 26 кДа, 30 кДа и 31 кДа [Kikuchi T. et al., 1995]. Белки межклеточных щелевых контактов коннексин 26, коннексин 30 и коннексин 31 кодируются генами *GJB2*, *GJB6* и *GJB3*, которые локализованы в хромосомных регионах 13q11-q12, 13q12 и 1p35.1 [Mignon C. et al., 1996], соответственно. Однако, основная причина аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа в различных популяциях человека – мутации в гене *GJB2*, их насчитывается более 300 [Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org/>, 2015].

С пониманием этиологии и патогенеза аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа стали актуальны исследования, направленные на генотип-фенотипические сопоставления нарушений слуха у пациентов в зависимости от характера мутационных повреждений в гене *GJB2*. Однако, из всех известных мутаций гена *GJB2* генотип-фенотипические исследования в основном касались наиболее частой для Европы мутации с.35delG (в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии с другими более редкими мутациями гена *GJB2*), а также распространенных в Азии мутаций с.235delC и р.Val37Ile [Gryns K. et al., 2004; Snoeckx R.L. et al., 2005; Oguchi T. et al., 2005; Tsukada K. et al., 2010].

В настоящее время территория Восточной Сибири известна как самый крупный мировой кластер накопления редкой в других регионах мира мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A гена *GJB2*. В этом регионе распространенность аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа,

обусловленной мутацией с.-23+1G>A гена *GJB2* в гомозиготном состоянии, оценивается как 16,2 на 100 000, а частота гетерозиготного носительства является одной из самых высоких в мире (3%-11% коренного населения являются гетерозиготными носителями данной мутации) [Barashkov N.A. et al., 2011]. Однако, до сих пор отсутствуют детальные исследования, посвященные генотип-фенотипической характеристике индивидов с мутацией с.-23+1G>A гена *GJB2*, что обуславливает актуальность настоящего исследования. Поскольку на территории Восточной Сибири эта мутация распространилась локально, в результате эффекта основателя, то именно в Якутии возможно проведение сопоставимого по масштабности с мировыми аналогами исследования генотип-фенотипической корреляции порогов слышимости у лиц с мутациями гена *GJB2*, в том числе у гомо- и гетерозигот по мутации с.-23+1G>A.

Цель исследования

Генотип-фенотипический анализ состояния слуха у индивидов с распространенными мутациями гена *GJB2* в Якутии.

Задачи:

1. Провести аудиологическое исследование у индивидов с тремя наиболее распространенными в Якутии *GJB2*-генотипами: [wt];[wt], с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух»), с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») и выявить характерный для них аудиопрофиль.
2. Провести корреляционный анализ зависимости порогов слышимости от возраста в речевом диапазоне частот у индивидов с *GJB2*-генотипами [wt];[wt], с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») и пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»).
3. Изучить гендерные отличия порогов слышимости у индивидов с *GJB2*-генотипами [wt];[wt], с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») и пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»).
4. Провести сравнительный анализ порогов слышимости у индивидов с *GJB2*-генотипами [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух»), с.[-

23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») с порогами слышимости у индивидов с другими редкими *GJB2*-генотипами, выявленными в Якутии.

Научная новизна

Впервые в Якутии проведены масштабные клинико-аудиологические и молекулярно-генетические исследования как пациентов с нарушениями слуха, так и индивидов с нормальным слухом (n=458 индивидов). Проведенные исследования впервые позволили провести генотип-фенотипический анализ нарушения слуха у пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа, обусловленной мутантным *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (n=99 индивидов). Впервые проведены генотип-фенотипические сопоставления порогов слышимости у индивидов с *GJB2*-генотипами [wt];[wt] (n=97 индивидов), с.[-23+1G>A];[wt] (n=48 индивидов), позволившие ассоциировать гетерозиготное носительство мутации с.-23+1G>A с возрастными изменениями слуха (пресбиакузис) в популяции якутов. Впервые проведен сравнительный аудиологический анализ у индивидов с *GJB2*-генотипами [wt];[wt], с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») и с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»), показавший гендерные отличия порогов слышимости и отличия порогов слышимости от других идентифицированных в якутской популяции *GJB2*-генотипов.

Практическая значимость

Практическая значимость работы состоит в том, что разработаны прогностические подходы для генотип-фенотипической оценки состояния слуха у пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа при некоторых *GJB2*-генотипах. Данные о патологическом эффекте при различных *GJB2*-генотипах могут быть использованы в выборе тактики ведения и технических средств реабилитации пациентов как с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа, так и пациентов с возрастными изменениями слуха (пресбиакузис), что будет способствовать их более успешной абилитации и реабилитации. Результаты данной работы могут быть использованы оториноларингологами, сурдологами, медицинскими

генетиками, сурдопедагогами, логопедами, слухопротезистами и реабилитологами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Характерным для лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») является прямой горизонтальный на уровне 10,0 дБ аудиопрофиль, не коррелирующий с возрастом; для лиц с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») – близкий к горизонтальному нисходящий (уклон 1,25 дБ) на уровне 10,0 дБ аудиопрофиль, коррелирующий с возрастом (ассоциирован с пресбиакузисом); а для пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») – «плоский» полого-нисходящий (уклон 25,0 дБ) на уровне 85,41 дБ аудиопрофиль, не коррелирующий с возрастом.
2. Пороги слышимости у лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») в речевом диапазоне частот ниже, чем у лиц с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt]; пороги слышимости у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») в речевом диапазоне частот ниже, чем у пациентов с *GJB2*-генотипами с.[35delG];[35delG], но выше, чем у пациентов с *GJB2*-генотипами с.[109G>A];[109G>A] и с.[-23+1G>A];[109G>A].
3. У лиц мужского пола с *GJB2*-генотипами с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») и с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») пороги слышимости в речевом диапазоне частот достоверно ($p<0,05$) выше, чем у лиц женского пола.

Апробация работы

Результаты исследования доложены на 8-ом Международном симпозиуме «Современные проблемы физиологии и патологии слуха» (г. Суздаль, 2011 г.), на X-Всероссийском конгрессе «Профессия и здоровье» (г. Москва, 2011 г.), на международной конференции ЕНГС-2012 (г. Нюрнберг, Германия, 2012 г.), на международной конференции IPY-2012 (г. Монреаль,

Канада, 2012 г.) на VII съезде Российского общества медицинских генетиков (г. Санкт-Петербург, 2015 г.).

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И.Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы, ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» и ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» 23 октября 2015 г. (Протокол №23).

Внедрение в практику

Результаты проведенной работы используются в практической работе ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Республиканского сурдологопедического центра ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №1 – Национальный центр медицины», Республиканского центра профессиональной патологии и оториноларингологического отделения ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №2 – центр экстренной медицинской помощи», ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И.Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы. Результаты проведенной работы используются в педагогическом процессе в ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И.Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы и факультета последипломного образования медицинского института ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова».

Публикации

По материалам настоящего исследования опубликованы 12 научных работ, из которых 7 статей опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для соискателей ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 125 страницах машинописного текста. Включает введение, обзор литературы, две главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы, включающий 135 печатных работ, в том числе 15 отечественных и 120 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 29 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период с 2006 по 2012 гг. было обследовано 458 индивидов, из которых 214 человек не предъявляли жалобы на снижение слуха, 244 – предъявляли жалобы на сниженный слух.

Критерии включения в исследование:

1. Наличие результатов клинико-аудиологического и молекулярно-генетического исследования;
2. Отсутствие соматических заболеваний с возможным негативным влиянием на состояние слуха;
3. Отсутствие контакта с производственным шумом;
4. Этническая принадлежность к якутской национальности для генотип-фенотипического анализа и к любой национальности для сравнительного анализа.

Согласно критериям включения в исследование из 458 обследованных были исключены 144 человека: 22 – имеющие заболевания с возможным негативным влиянием на состояние слуха, 2 – имеющие длительный контакт с производственным шумом, 49 – с неподтвержденным аудиологическим фенотипом, 9 – с недостоверными результатами аудиометрии, 5 – со смешанной этнической принадлежностью, 57 – с фенотипом «тугоухость» при непатогенном *GJB2*-генотипе. Таким образом, из оставшихся 314 участников исследования были сформированы три группы лиц с наиболее распространенными *GJB2*-генотипами для генотип-фенотипического анализа (Рис.1):

- 1-я группа – 88 человек (n=176 ушей) якутской национальности в возрасте от 20 до 59 лет (средний возраст $34,53 \pm 10,2$ лет) с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух»);
- 2-я группа – 48 человек (n=96 ушей) якутской национальности в возрасте от 20 до 59 лет (средний возраст $36,15 \pm 10,2$ лет) с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух»);
- 3-я группа – 99 пациентов (n=198 ушей) якутской национальности в возрасте от 2 до 24 лет (средний возраст $14,15 \pm 4,8$ лет) с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»).

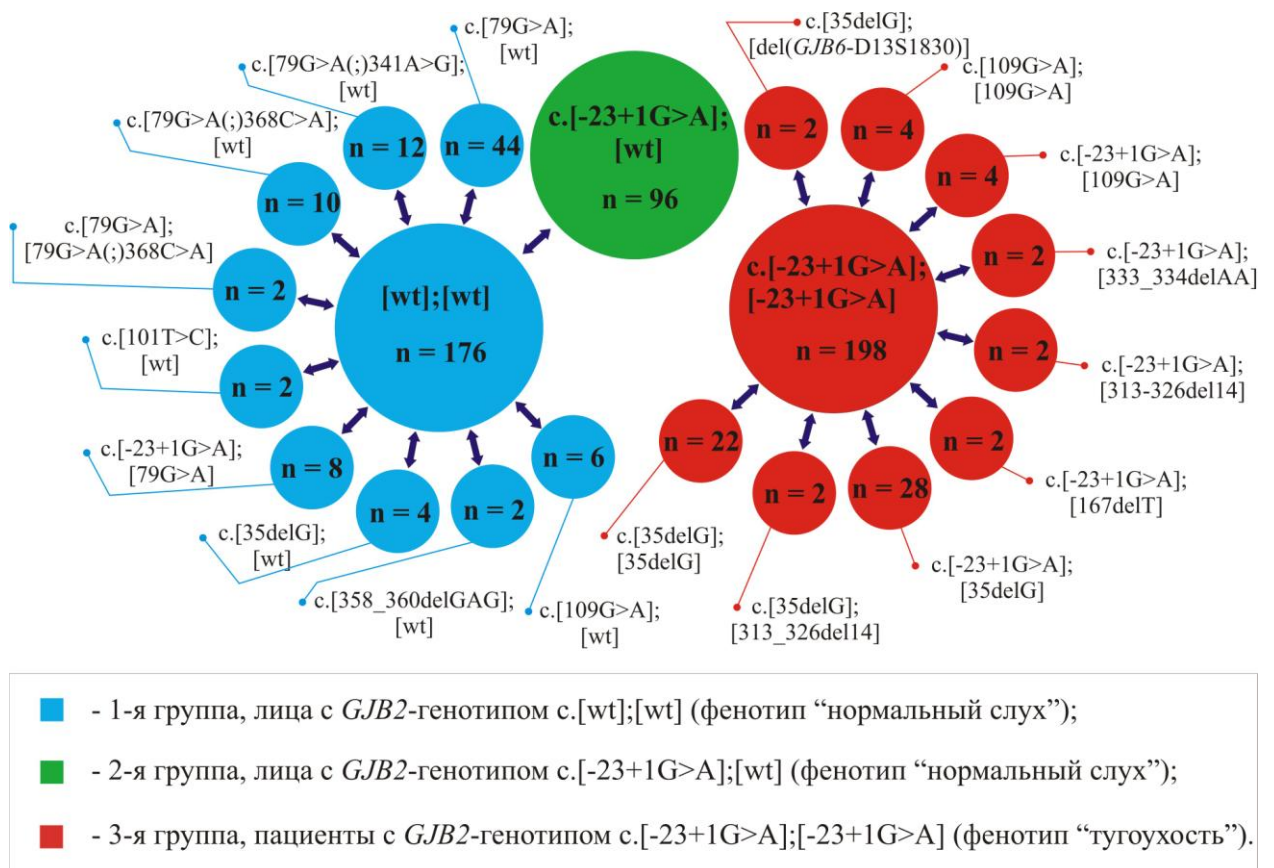


Рисунок 1. Схема сформированных выборок для генотип-фенотипического анализа. Примечание: стрелками показаны сравниваемые *GJB2*-генотипы, n – количество ушей.

Методы медицинского осмотра

С помощью опроса выясняли жалобы на состояние слуха, наличие отделяемого из уха, шума в ушах, головокружения. Выясняли анамнез заболевания, анамнез жизни, включая перенесенные заболевания, травмы

и/или операции, контакт с производственным шумом, сведения об аллергических реакциях. С помощью анкетирования выясняли этническую принадлежность (до третьего поколения включительно). Отологический осмотр проводили с применением отоскопа KaWe Комбилайт по унифицированным алгоритмам. Физикальный осмотр проводили с участием врача офтальмолога, эндокринолога, педиатра, генетика по унифицированным алгоритмам. Кроме этого, обследованные были осмотрены сурдопедагогом.

Методы клинико-аудиологического анализа

Импедансометрию проводили с использованием тимпанометра и аудиометра «AA222» («Interacoustics», Дания). Пороговую тональную аудиометрию проводили с использованием аудиометра «MAICO ST 20» (Германия) по воздушному проведению на частотах 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 кГц и по костному проведению на частотах 0.25, 0.5, 1.0, 4.0 кГц шагом 5,0 дБ. Степень потери слуха оценивали по порогам слышимости лучше слышащего уха в речевом диапазоне частот 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 кГц по международной классификации, согласно которой I степень тугоухости соответствует 26-40 дБ, II степень – 41-55 дБ, III степень – 56-70 дБ, IV степень – 71-90 дБ, глухота >90 дБ, а для сравнения с *GJB2*-генотипом с.[35delG];[35delG] по классификации, согласно которой «легкая» степень соответствует 21-40 дБ в диапазоне частот 0,5, 1,0 и 2,0 кГц (РТА), «умеренная» – 41-70 дБ, «тяжелая» – 71-95 дБ, «глубокая» – >95 дБ.

Методы молекулярно-генетического анализа

Для молекулярно-генетического исследования были использованы образцы геномной ДНК (n=458 индивидов), экстрагированные из лейкоцитов периферической крови. Амплификацию фрагментов гена *GJB2*, включающих экзон 1 и экзон 2 гена *GJB2* с фланкирующими областями проводили с помощью ПЦР на термоциклере «MJ Mini» (Bio-Rad), с использованием последовательности праймеров, описанных ранее [Kelsell et al., 1997; Kelley et al., 1998 Sirmaci et al., 2006]. Определение первичной нуклеотидной последовательности осуществляли на капиллярном секвенаторе «ABI Prism

3130XL Genetic Analyser» (Applied Biosystems, USA) (ЦКП «Геномика», Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск). Для расшифровки секвенограмм использована компьютерная программа «Chromas». Анализ секвенограмм был проведен с помощью сопоставления с референсными нуклеотидными последовательностями гена *GJB2* M86849.2 и U43932.1 (GenBank). Скрининг делеций 309 kb и 232 kb - *del(GJB6-D13S1830)* и *del(GJB6-D13S1854)* выполнен с использованием методики, описанной ранее [del Castillo et al., 2005].

Методы статистического анализа

При сравнении возраста манифестации нарушений слуха, встречаемости соматических заболеваний, типов потери слуха, степени потери слуха, междушумной разницы порогов слышимости у индивидов мужского и женского пола применяли определение значения хи-квадрат (χ^2) с использованием программного обеспечения Biostatd (McGraw-Hill, Inc. Version 3.03). Корреляционная зависимость порогов слышимости с возрастом была оценена с помощью r линейной регрессии. Доверительный интервал устанавливали при определении междушумной разницы с использованием программы «Sampling», предоставленной V.Macaulau и M.Metspalu. Статистическая оценка значимости отличий порогов слышимости на измеренных частотах была проведена с помощью непараметрического критерия U Манна-Уитни с использованием программного обеспечения «STATISTICA version 8.0» (StatSoft Inc, USA). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Аудиограммы, имеющие обрыв, были нормализованы путем внесения максимальных показателей (120,0 дБ) в местах отсутствия ответа пациента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генотип-фенотипический анализ лиц 1-й группы с *GJB2*-генотипом

[wt];[wt] (фенотип «нормальный слух»)

Выборку для генотип-фенотипического анализа у лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] составили 88 человек ($n=176$ ушей), якуты от 20 до 59

лет. Для детального аудиологического анализа были обобщены аудиограммы всех 176 ушей 88 индивидов и представлены на рисунке 2 А. Анализ полученных данных показал, что характерным для лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] является горизонтальный в пределах нормы (по международной классификации) аудиопрофиль в речевом диапазоне частот (Рис. 2 А). Пороги слышимости были вариабельны, особенно в диапазоне частот 4.0-8.0 кГц, но не превышали максимальные возрастные нормы согласно приложению 2 ГОСТ 12.4.062-78. У всех 88 лиц оба уха (n=176 ушей) звуковые стимулы воспринимали на всех измеренных частотах вплоть до 8.0 кГц включительно (аудиограмма не имела «обрыва»).

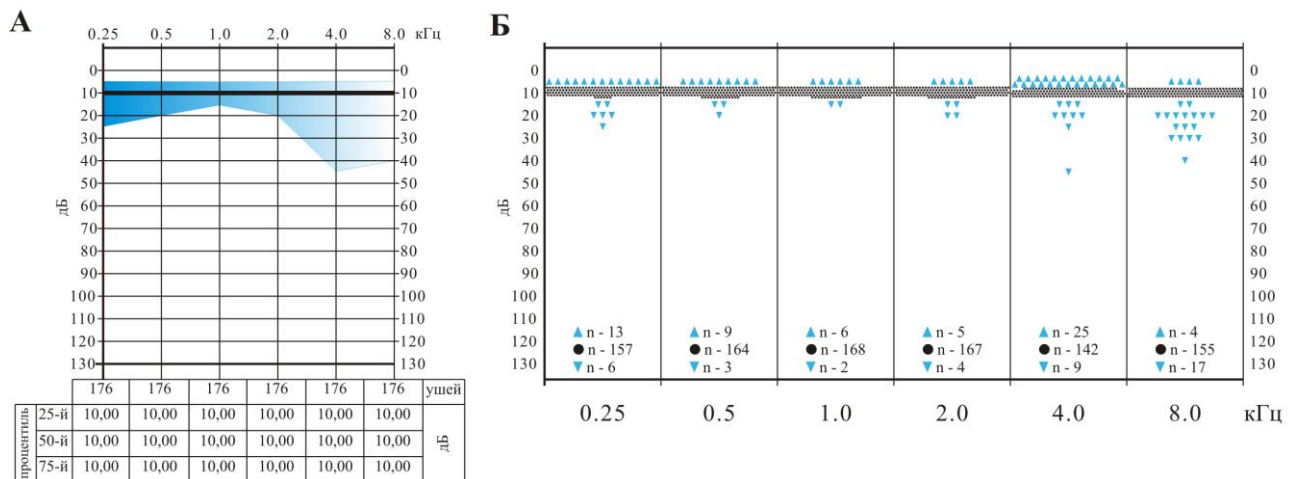


Рисунок 2. Пороги слышимости лиц 1-й группы с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух»). Примечание: **А** – обобщенная аудиограмма, где синей градиентной заливкой показаны пределы порогов слышимости; сплошной линией показана медиана; **Б** – диаграмма разброса порогов слышимости, где черными кружками показаны пороги слышимости, соответствующие медиане; треугольниками вершиной вверх – пороги слышимости ниже, чем медиана, вершиной вниз – выше.

Диаграмма разброса порогов слышимости лиц 1-й группы (Рис. 2 Б) показывает, что фактически пороги слышимости распределены равномерно, за исключением частот 4.0 и 8.0 кГц, на которых у ряда обследованных регистрировались высокие пороги до 40,0-45,0 дБ, не превышающие максимальные возрастные значения (от 20 до 60 лет) согласно приложению С ГОСТ Р ИСО 7029-2011 «Акустика. Статистическое распределение порогов

слышимости в зависимости от возраста человека». Для определения возрастных изменений слуха индивидов с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») нами проведен корреляционный анализ регрессии порогов слышимости в речевом диапазоне частот с возрастом, который не выявил зависимости порогов слышимости от возраста ($p=0,184416$).

Генотип-фенотипический анализ лиц 2-й группы с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух»)

Выборку для генотип-фенотипического анализа у лиц с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] составили 48 человек ($n=96$ ушей), Якуты в возрасте от 20 до 59 лет. Рисунок 3 А демонстрирует, что характерным для лиц с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] является близкий к горизонтальному (уклон 1,25 дБ) в пределах нормы (по международной классификации) аудиопрофиль в речевом диапазоне частот. В диапазоне частот 0.25-8.0 кГц пороги слышимости превышали максимальные возрастные значения согласно приложению 2 ГОСТ 12.4.062-78.

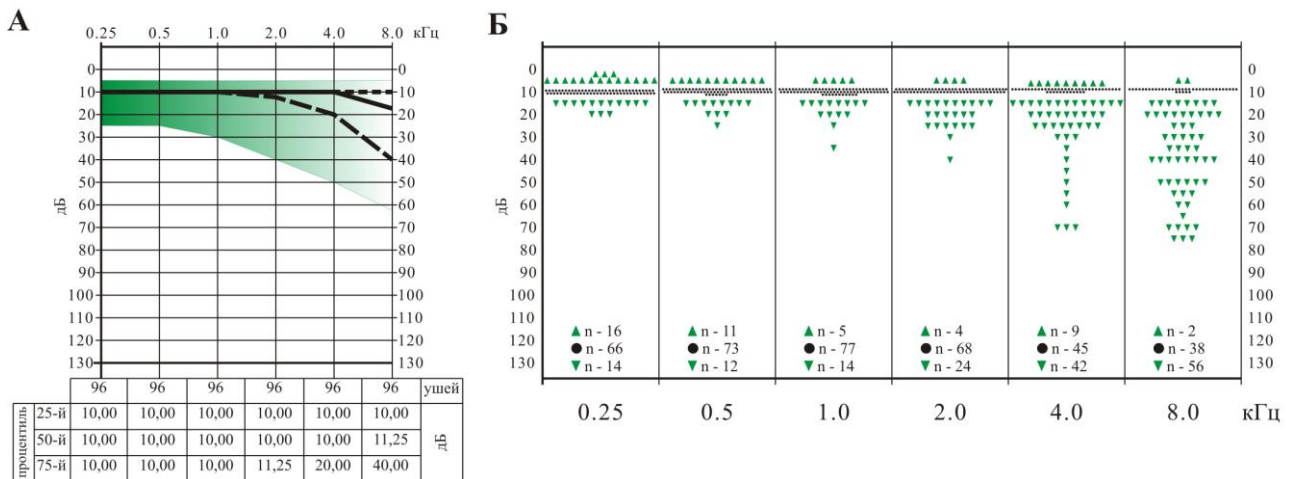


Рисунок 3. Пороги слышимости лиц 2-й группы с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух»). Примечание: **А** – обобщенная аудиограмма, где зеленой градиентной заливкой показаны пределы порогов слышимости, сплошной линией – 50-й, частым пунктиром – 25-й и редким пунктиром – 75-й процентиля; **Б** – диаграмма разброса порогов слышимости, где черными кружками показаны пороги слышимости, соответствующие медиане; треугольниками вершиной вверх – пороги слышимости ниже, чем медиана, вершиной вниз – выше.

Рисунок 3 Б демонстрирует превышение максимальных значений отклонения от медианы порогов слышимости (ГОСТ Р ИСО 7029-2011), что отчетливо видно в диапазоне частот 2.0-8.0 кГц.

Был проведен корреляционный анализ регрессии порогов слышимости в речевом диапазоне частот с возрастом, результаты которого свидетельствуют о линейной регрессии порогов слышимости с возрастом ($p < 0,05$) (Рис. 4 А).

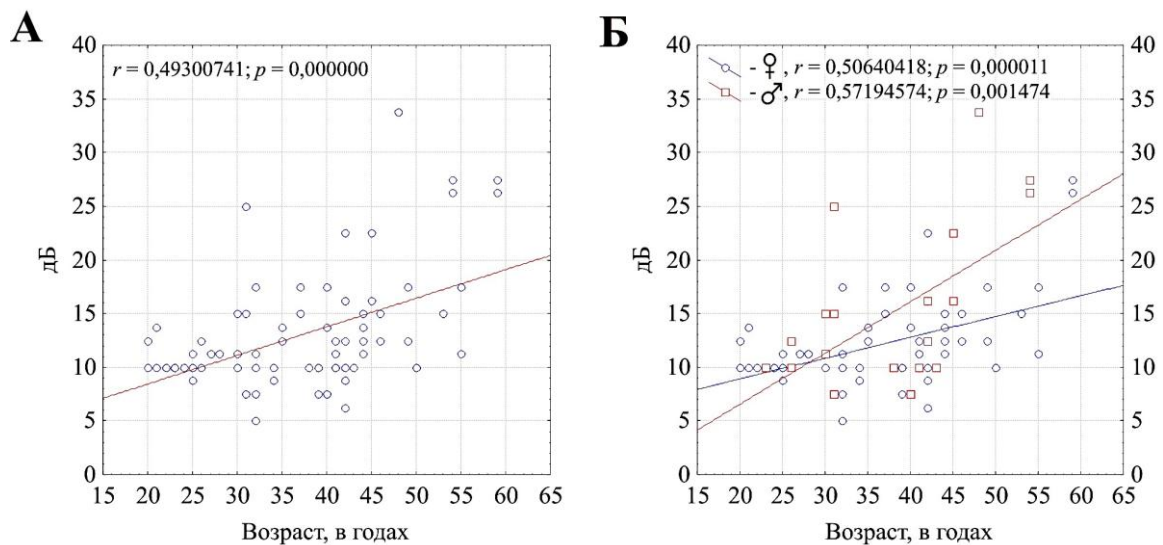


Рисунок 4. Корреляционный анализ регрессии порогов слышимости в речевом диапазоне частот с возрастом лиц 2-й группы с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt]. Примечание: **А** – до стратификации по полу, $n=96$ ушей; **Б** – после стратификации по полу, ♀ – индивиды женского пола, $n=68$ ушей, ♂ – индивиды мужского пола, $n=28$ ушей.

Впервые у гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A обоего пола выявлено достоверное ($p < 0,05$) линейное повышение порогов слышимости в клинически значимом речевом диапазоне частот в зависимости от возраста, более выраженное у лиц мужского пола, что, вероятно, связано с физиологическими особенностями и факторами среды (Рис. 4 Б).

Для определения возрастных границ манифестации изменений порогов слышимости группы наблюдения были подразделены на возрастные когорты (20-29, 30-39, 40-49 и 50-59 лет) согласно приложению 2 ГОСТ 12.4.062-78. В данных группах был проведен корреляционный анализ регресса порогов слышимости в речевом диапазоне частот с возрастом (Табл. 1). В результате, у индивидов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] в возрастной когорте 20-29

и 30-39 лет данная корреляция не выявлена. Статистически достоверную ($p < 0,05$) корреляционную зависимость порогов слышимости в речевом диапазоне частот показали обследованные возрастной когорты 40-49 и 50-59 лет (Табл. 1).

Таблица 1

Корреляционный анализ регресса порогов слышимости с возрастом в речевом диапазоне частот у индивидов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt].

<i>GJB2</i> -генотип	Критерий	20-29 лет	30-39 лет	40-49 лет	50-59 лет
с.[-23+1G>A];[wt]	n = ушей	28	26	32	10
	r_s	0,228	-0,125	0,504	0,697
	p	0,243	0,542	0,003	0,024

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически достоверные значения ($p < 0,05$).

Таким образом, за условную границу манифестации был принят возраст ~40 лет. В целом, данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что гетерозиготное носительство мутации с.-23+1G>A в популяции якутов ассоциируется с возрастными нарушениями слуха (пресбиакузис).

Сравнительный аудиологический анализ у лиц с фенотипом «нормальный слух»

Самая многочисленная среди индивидов с фенотипом «нормальный слух» 1-я группа лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (n=176 ушей) была выбрана в качестве референтной. Был проведен сравнительный аудиологический анализ порогов слышимости лиц референтной выборки с пороговыми слышимости лиц с редкими *GJB2*-генотипами (Рис. 5). Анализ показал, что у лиц с *GJB2*-генотипами с.[79G>A];[79G>A(;368C>A)] и с.[-23+1G>A];[wt] пороги слышимости в клинически значимом речевом диапазоне частот достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у лиц референтной выборки (Рис. 5). Полученные данные могут указывать на то, что гетерозиготные мутации и гомозиготные полиморфизмы в гене *GJB2* могут негативно сказываться на состоянии слуха.

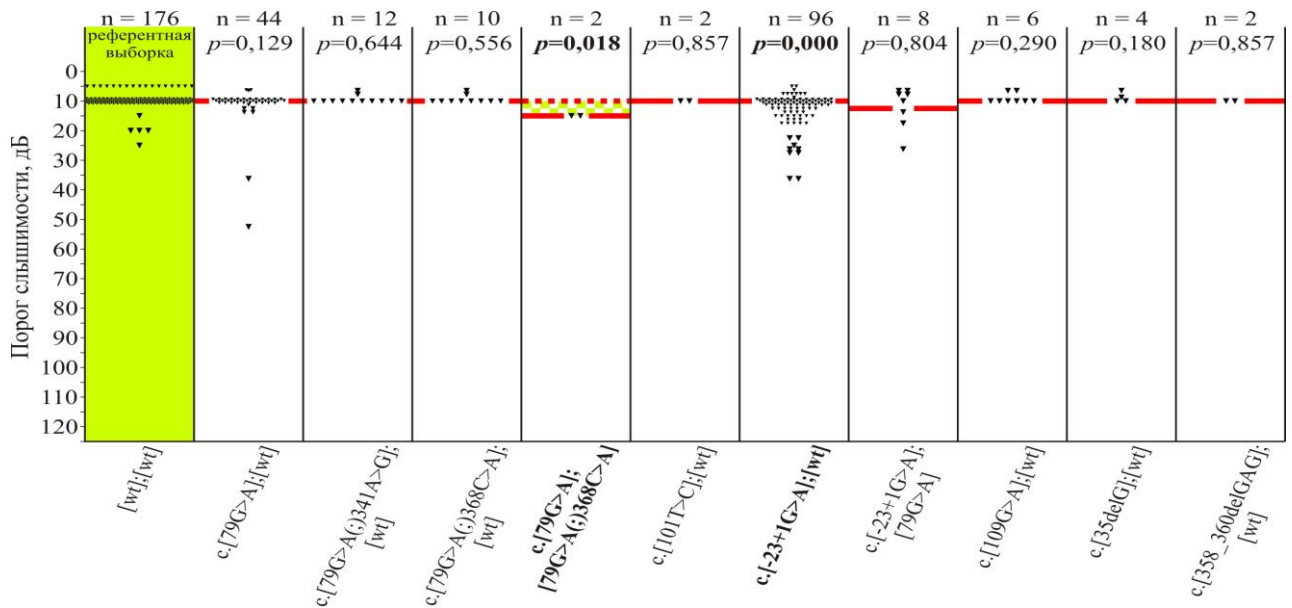


Рисунок 5. Сравнение порогов слышимости 1-й группы и лиц с редкими *GJB2*-генотипами (фенотип «нормальный слух») в речевом диапазоне частот. Примечание: n – количество ушей; p – значение p критерия U Манна-Уитни; сплошной заливкой обозначен референтный *GJB2*-генотип, текстурной – статистически достоверная разница; сплошная линия – медиана порогов слышимости в речевом диапазоне частот, пунктирная – медиана референтного *GJB2*-генотипа; жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

Генотип-фенотипический анализ 3-й группы пациентов с *GJB2*-генотипом **c.[23+1G>A];[23+1G>A]** (фенотип «тугоухость»)

Выборку составили 99 пациентов ($n=198$ ушей) якутской национальности в возрасте от 2 до 24 лет (средний возраст $14,15 \pm 4,8$ лет) с *GJB2*-генотипом **c.[23+1G>A];[23+1G>A]** (фенотип «тугоухость»).

Мы провели анализ возраста начала заболевания у пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа с *GJB2*-генотипом **c.[23+1G>A];[23+1G>A]**. Полученные результаты показали, что в 41,7% всех случаев заболевание было зарегистрировано до 12 месяцев после рождения, а в 50,0% случаев – от 1 года до 3 лет и в 8,3% – после 4 лет (Рис. 6 А). Анализ возраста начала заболевания свидетельствует о том, что, по крайней мере, в половине случаев нарушения слуха стали очевидными только после первого года жизни ребенка. С одной стороны, это может объясняться отсутствием

неонатального аудиологического скрининга на момент рождения большинства обследованных пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа (с 1988 г. по 1998 г.), а с другой стороны – нельзя исключить вероятность постепенной потери слуха, ставшей очевидной только к 4 годам.

В целом, анализ подтверждает врожденный характер заболевания у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A], но не исключает вероятность прогрессирования нарушения слуха с рождения до 4 лет.

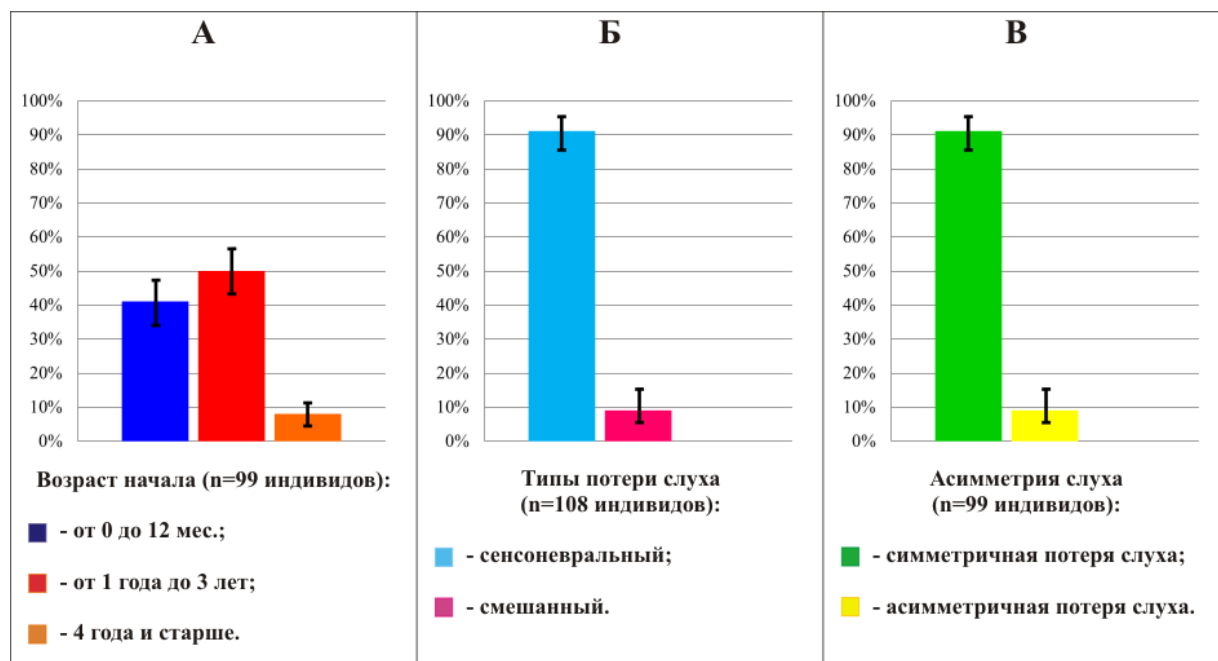


Рисунок 6. Клинико-аудиологические данные 3-й группы пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A].

Считается, что глухота, обусловленная рецессивными мутациями в гене *GJB2*, характеризуется врожденной двусторонней сенсоневральной потерей слуха различной степени тяжести.

Тональная пороговая аудиометрия у 99 пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] показала сенсоневральный и у 9 пациентов смешанный тип снижения слуха (исключены из дальнейшего анализа) (Рис. 6 Б). У 90 пациентов с двусторонней сенсоневральной потерей слуха (90,9%) было выявлено симметричное поражение слуха, у 9 (9,1%) – асимметричное (Рис. 6 В). Вероятно, что ~10% асимметричного поражения слуха либо

является закономерной долей при *GJB2*-обусловленной глухоте, либо является статистической долей экзогенного влияния.

Степень снижения слуха обследованных ($n=99$) была рассчитана по порогам слышимости в речевом диапазоне частот лучше слышащего уха. В результате I степень сенсоневральной тугоухости была выявлена у 3 индивидов (3,0%), II степень – у 13 (13,1%), III степень – у 21 (21,2%), IV степень – у 18 (18,2%) и глухота – у 44 пациентов (44,5%) (Рис. 7).

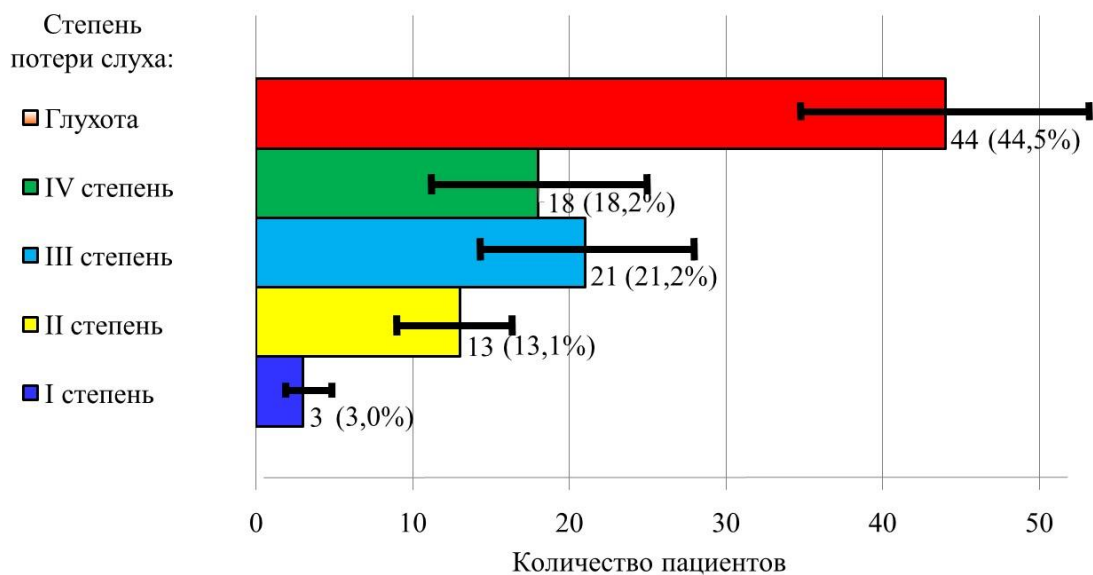


Рисунок 7. Степени потери слуха в 3-й группе пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A].

При этом степень потери слуха «глухота» встречалась достоверно чаще, а I степень – достоверно реже, чем другие степени тугоухости ($p<0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о вариабельности тяжести данной аллельной формы заболевания. Возможно, тяжесть заболевания во многом зависит от влияния генов-модификаторов и экзогенных факторов [Hilgert N. et al., 2008].

Для представления общей характеристики потери слуха у индивидов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] ($n=99$) все аудиограммы (оба уха – 198 ушей) были обобщены (Рис. 8 А). Показано, что характерным для *GJB2*-генотипа с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] является «плоский» полого-нисходящий аудиопрофиль в речевом диапазоне частот на уровне 85,41 дБ

(Рис. 8 А). Диаграмма разброса порогов слышимости у пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (n=99) показывает, что пороги слышимости относительно медианы распределены равномерно (Рис. 8 Б).

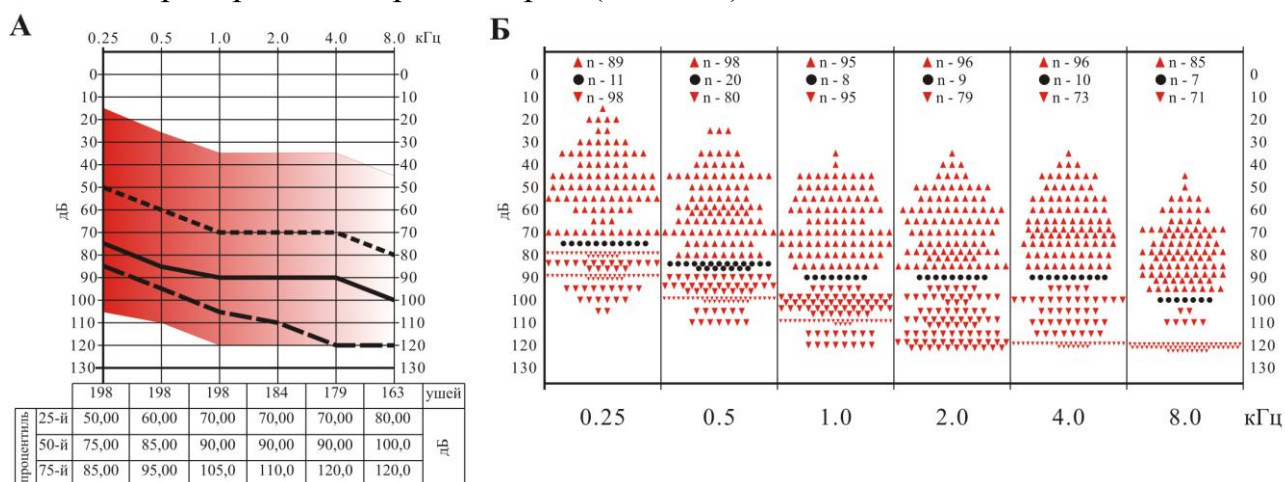


Рисунок 8. Пороги слышимости пациентов 3-й группы с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»). Примечание: **А** — обобщенная аудиограмма, где красной градиентной заливкой показаны пределы порогов слышимости, сплошной линией — 50-й, частым пунктиром — 25-й и редким пунктиром — 75-й перцентили; **Б** — диаграмма разброса порогов слышимости, где черными кружками показаны пороги слышимости, соответствующие медиане; треугольниками вершиной вверх — пороги слышимости ниже, чем медиана, вершиной вниз — выше.

Таким образом, полученные нами результаты характеризуют аллельную форму заболевания при *GJB2*-генотипе с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] как врожденную, двустороннюю симметричную (90,1%), сенсоневральную (90,1%), переменную по степени тяжести потерю слуха (от I степени до глухоты), с «плоским» полого-нисходящим аудиопрофилем. Проведенный аудиологический анализ позволяет предположить относительно равномерное, но переменное по тяжести поражение слуха у пациентов, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2*, что является благоприятным прогностическим признаком для слухопротезирования.

Гендерные особенности. Было выявлено, что на всех сравниваемых частотах и в речевом диапазоне частот у пациентов 3-й группы мужского пола пороги слышимости достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у пациентов женского пола (Табл. 2). Свидетельства возможных гендерных особенностей

у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] были получены впервые на масштабной выборке. Эти результаты могут быть сопоставимы и с другими мутациями гена *GJB2*, но такая гипотеза требует дополнительных исследований при *GJB2*-обусловленной врожденной тугоухости.

Таблица 2

Сравнение порогов слышимости у пациентов 3-й группы с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] в зависимости от пола.

Частота, кГц	♀, медиана, n=82 уха	♂, медиана, n=116 ушей	Критерий Т, (значение <i>p</i>)
0.25	60,0	80,0	0,000681
0.5	70,0	85,0	0,001509
1.0	75,0	100,0	0,000591
2.0	80,0	100,0	0,000066
4.0	75,0	100,0	0,000082
8.0	85,0	120,0	0,000004
РДЧ	74,4	99,4	0,000159

Примечание: ♀ – индивиды женского пола, ♂ – индивиды мужского пола.

Сравнительный аудиологический анализ у пациентов с фенотипом «тугоухость»

Самой многочисленной среди обследованных с фенотипом «тугоухость» была выборка пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A], которая была выбрана в качестве референтной (n=198 ушей). Был проведен сравнительный аудиологический анализ порогов слышимости пациентов референтной выборки с порогоми слышимости пациентов с редкими патогенными *GJB2*-генотипами (Рис. 9). Анализ показал, что у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[35delG];[35delG] пороги слышимости в речевом диапазоне частот достоверно ($p<0,05$) выше, а у пациентов с *GJB2*-генотипами с.[109G>A];[109G>A], с.[-23+1G>A];[109G>A] – достоверно ниже, чем у пациентов референтной выборки (Рис. 9). У остальных пациентов с редкими *GJB2*-генотипами с.[-23+1G>A];[35delG],

c.[35delG];[313_326del14], c.[-23+1G>A];[167delT], c.[-23+1G>A];[313_326del14], c.[-23+1G>A];[333_334delAA], c.[35delG];[del(GJB6-D13S1830)] пороги слышимости в речевом диапазоне частот были сопоставимы с референтной выборкой (Рис. 9).

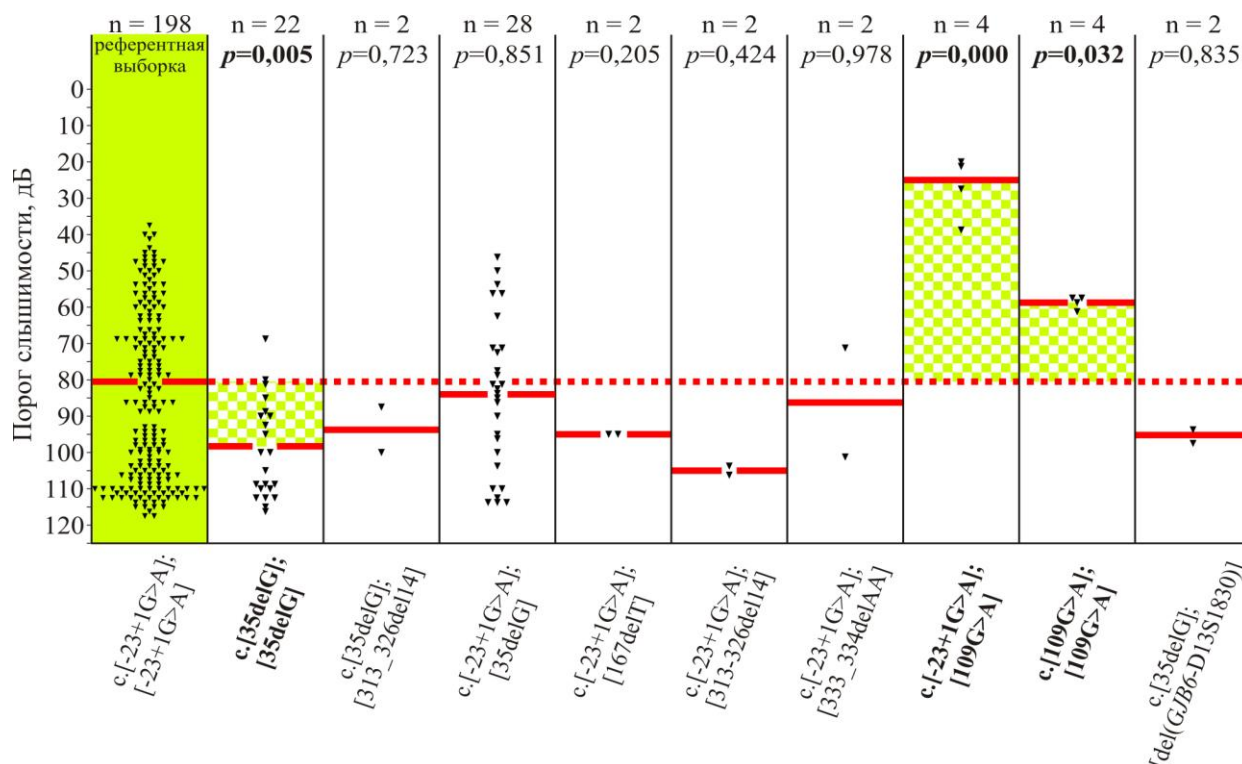


Рисунок 9. Сравнение порогов слышимости 3-й группы и пациентов с редкими GJB2-генотипами (фенотип «тугоухость») в речевом диапазоне частот. Примечание: n – количество ушей; p – значение p критерия U Манна-Уитни; сплошной заливкой обозначен референтный GJB2-генотип, текстурной – статистически достоверная разница; сплошная линия – медиана порогов слышимости в речевом диапазоне частот, пунктирная – медиана референтного GJB2-генотипа; жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что мутация c.35delG обладает более выраженным, а мутация c.109G>A менее выраженным патологическим эффектом на слуховую функцию, чем распространенная в Якутии мутация сайта сплайсинга c.-23+1G>A.

Выводы:

1. Характерным для лиц с GJB2-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») является прямой горизонтальный аудиопрофиль на уровне 10,0 дБ; для лиц с GJB2-генотипом c.[-23+1G>A];[wt] (фенотип

«нормальный слух») – близкий горизонтальному нисходящий (уклон 1,25 дБ) аудиопрофиль на уровне 10,0 дБ; для пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») – полого-нисходящий (уклон 25,0 дБ) аудиопрофиль на уровне 85,41 дБ.

2. У лиц с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») от 20 до 59 лет, но не у лиц с *GJB2*-генотипами [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») и с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость»), имеется корреляция порогов слышимости в речевом диапазоне частот с возрастом, что свидетельствует об ассоциации *GJB2*-генотипа с.[-23+1G>A];[wt] с пресбиакузисом; при этом манифестация возрастного повышения порогов слышимости определена в возрасте ~40 лет.

3. У лиц мужского пола с *GJB2*-генотипами с.[-23+1G>A];[wt] (фенотип «нормальный слух») и с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») пороги слышимости в речевом диапазоне частот достоверно выше ($p<0,05$), чем у лиц женского пола.

4. Пороги слышимости в речевом диапазоне частот у лиц с *GJB2*-генотипом [wt];[wt] (фенотип «нормальный слух») достоверно ($p<0,05$) ниже, чем у лиц с *GJB2*-генотипами с.[79G>A];[79G>A(;368C>A)] и с.[-23+1G>A];[wt]; пороги слышимости в речевом диапазоне частот у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (фенотип «тугоухость») достоверно ($p<0,05$) ниже, чем у пациентов с *GJB2*-генотипом с.[35delG];[35delG], но выше, чем у пациентов с *GJB2*-генотипами с.[109G>A];[109G>A] и с.[-23+1G>A];[109G>A].

Практические рекомендации:

1. При диспансеризации населения в Якутии у лиц с нормальным слухом необходимо проводить молекулярно-генетический скрининг гена *GJB2* и при выявлении у лиц *GJB2*-генотипов с.[79G>A];[79G>A(;368C>A)] и с.[-23+1G>A];[wt] рекомендовать консультацию сурдолога и медицинского генетика.

2. Лиц с подтвержденным *GJB2*-генотипом с.[-23+1G>A];[wt] необходимо наблюдать в группе риска по раннему развитию пресбиакузиса.

3. Диагностические и абилитационно-реабилитационные мероприятия у пациентов с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа должны учитывать полученные при настоящем исследовании характерные аудиопрофили пациентов с патогенными *GJB2*-генотипами: следует иметь ввиду, что у пациентов при подтверждении *GJB2*-генотипов с. $[-23+1G>A]$; $[-23+1G>A]$, с. $[-23+1G>A]$; $[109G>A]$ с. $[109G>A]$; $[109G>A]$, в ряде случаев, абилитационные мероприятия возможны путем слухопротезирования, а в случае подтверждения у пациента *GJB2*-генотипа с. $[35delG]$; $[35delG]$, в ряде случаев, следует принять решение в пользу кохлеарной имплантации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Посух О.Л., Федотова Э.Е., Гуринова Е.Е., Федорова С.А., Таварткиладзе Г.А., Хуснутдинова Э.К. Кохлеарная имплантация у ребенка с врожденной сенсоневральной глухотой, обусловленной мутацией 35delG в гене *GJB2* (коннексин 26) // Вестник оториноларингологии. 2009. N 2. С. 17–19.
2. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Posukh O.L., Fedotova E.E., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. 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 // Journal of Human Genetics. 2011. N 8. P. 631–639.
3. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Посух О.Л., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К. Аудиологический анализ пациентов с врожденной потерей слуха, гомозиготных по мутации сайта сплайсинга IVS1+1G>A в гене *GJB2* (Cx26) // Материалы 4-го Национального конгресса аудиологов, 8-го международного симпозиума «Современные проблемы физиологии и патологии слуха», Суздаль, 2011 г., С. 195–196.

4. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Рафаилов А.М., Федотова Э.Е., Кожевников А.А., Федорова С.А. Аудиологический анализ состояния слуха у жителей высоких широт в случайной выборке лиц молодого возраста // Материалы X-Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье», Москва, 2011 г., С. 487–450.
5. **Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Федотова Э.Е., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Кларов Л.А., Васильева Л.М., Рафаилов А.М., Аргунова А.Н., Хорунов А.Н., Савельев В.В., Кожевников А.А., Федорова С.А. Аудиологический анализ состояния слуха в случайной выборке лиц молодого возраста // Российская оториноларингология. 2012. N 4. С. 101–110.**
6. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Posukh O.L., Soloviev A.V., Fedotova E.E., Lobov S.L., Zamorshikova L.S., Melnitchuk O.A., Khusnutdinova E.K. and Mikhailova E.I. Autosomal Recessive Deafness 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 // International Polar Year 2012, Montreal, Canada, 2012.
7. Teryutin F.M., Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Posukh O.L., Soloviev A.V., Pshennikova V.G., Vasilieva L.M., Fedotova E.E., Fedorova S.A., Khusnutdinova E.K. Audiological analysis in deaf patients homozygous for the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene // European Human Genetic Conference 2012, Nürnberg, Germany, 2012.
8. **Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Пшенникова В.Г., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Пак М.В., Леханова С.Н., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К. Гетерозиготное носительство мутации сайта сплайсинга IVS1+1G>A гена *GJB2* (Cx26) – фактор риска возрастных изменений слуха (пресбиакузис) в популяции якутов // Медицинская генетика. 2013. N 6. С. 24–36.**

9. Barashkov N.A., Teryutin F.M., Pshennikova V.G., Solovyev A.V., Klarov L.A., Solovyeva N.A., Kozhevnikov A.A., Vasilyeva L.M., Fedotova E.E., Pak M.V., Lekhanova S.N., Zakharova E.V., Savvinova K.E., Gotovtsev N.N., Rafailov A.M., Luginov N.V., Alexeev A.N., Posukh O.L., Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. Age-Related Hearing Impairment (ARHI) Associated with GJB2 Single Mutation IVS1+1G>A in the Yakut Population Isolate in Eastern Siberia // *PLoS One*. 2014. Vol. 9(6). e100848.
10. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Кунельская Н.Л., Пшенникова В.Г., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Пак М.В., Леханова С.Н., Морозов И.В., Бондарь А.А., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Вариабельность порогов слуха у глухих пациентов, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* (коннексин 26) // *Якутский медицинский журнал*. 2015. N 2. С. 100–102.
11. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Кунельская Н.Л., Пшенникова В.Г., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Пак М.В., Леханова С.Н., Морозов И.В., Бондарь А.А., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Гетерозиготное носительство мутации сайта сплайсинга IVS1+1G>A гена *GJB2* (CX26) – фактор риска возрастных изменений слуха (пресбиакузис) в популяции якутов // VII съезд Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург, 2015 г.
12. Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Кунельская Н.Л., Пшенникова В.Г., Соловьев А.В. Аудиологический анализ у пациентов с потерей слуха, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* в Якутии // *Вестник оториноларингологии*. 2016. N 1. С. 19–24.