

Спектр и частота мутаций гена *GJB2* (Cx26) у пациентов с нарушениями слуха в Республике Бурятия

Пшенникова В.Г.¹, Чердонова А.М.², Терютин Ф.М.¹, Романов Г.П.², Соловьев А.В.^{1,2}, Федорова С.А.², Барашков Н.А.¹

1 — ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем»
677018, г. Якутск, ул. Ярославского, д. 6/1

2 — ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»
677000, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58

В диагностике наследственной несиндромальной потери слуха высокую информативность обеспечивают методы молекулярно-генетического анализа мутаций гена *GJB2* (Cx26). Впервые в Республике Бурятия (Восточная Сибирь) путем прямого секвенирования были определены спектр и частота мутаций гена *GJB2* у 165 индивидов с нарушениями слуха. В обследованной выборке было обнаружено 13 известных аллельных вариантов гена *GJB2* (с.-254C>T, с.-49G>A, с.-23+1G>A, с.35delG, с.79G>A, с.101T>C, с.109G>A, с.235delC, с.299_300delAT, с.327_328delinsA, с.341A>G, с.457G>A и с.516G>C). У пациентов бурятской мутационный спектр был представлен пятью патогенными *GJB2*-вариантами: с.-23+1G>A (4,1%), с.109G>A (0,6%), с.235delC (1,4%), с.327_328delGinsA (0,6%), с.516G>C (0,6%). Среди русских пациентов было обнаружено пять мутаций: с.35delG (25,7%), с.-23+1G>A (3,3%), с.101T>C (0,6%), с.109G>A (1,9%), с.299_300delAT (0,6%). Вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха в общей выборке пациентов из Бурятии составил 15,8% (26/165). При распределении пациентов по этнической принадлежности вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у русских составил 28,9% (22/76), в то время как у бурятских лишь 5,1% (4/79). Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что мутации гена *GJB2* не являются основной причиной потери слуха у бурятских. Вероятно, у большей части *GJB2*-негативных пациентов потеря слуха может быть обусловлена мутациями в других генах, ответственных за развитие наследственных нарушений слуха.

Ключевые слова: аутосомно-рецессивная глухота 1А типа; мутации гена *GJB2* (Cx26); Республика Бурятия.

Для цитирования: Пшенникова В.Г., Чердонова А.М., Терютин Ф.М., Романов Г.П., Соловьев А.В., Федорова С.А., Барашков Н.А. Спектр и частота мутаций гена *GJB2* (Cx26) у пациентов с нарушениями слуха в Республике Бурятия. *Медицинская генетика* 2021; 20(7): 26–36.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.26-36

Автор для корреспонденции: Пшенникова Вера Геннадиевна; e-mail: psennikovavera@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2020-0016), НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии в популяциях Республики Саха (Якутия)» и при поддержке грантов РФФИ (№18-05-600035_Арктика и №20-015-00328_А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.06.2021.

Spectrum and frequency of GJB2 (Cx26) gene mutations in patients with hearing impairments in the Republic of Buryatia

Pshennikova V.G.¹, Cherdonova A.M.², Teryutin F.M.¹, Romanov G.P.², Solovyev A.V.^{1,2}, Fedorova S.A.², Barashkov N.A.¹

1 — Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems
6/1, Yaroslavsky str., Yakutsk, 677010, Russian Federation

2 — M.K. Ammosov North-Eastern Federal University,
58, Belinsky str., Yakutsk, 677000, Russian Federation

In the diagnosis of hereditary non-syndromic hearing loss (HL), the methods of molecular genetic analysis of the *GJB2* (Cx26) gene mutations provide high valuable information. For the first time, in the Republic of Buryatia (Eastern Siberia), the spectrum and frequency of *GJB2* gene mutations were determined in a sample of 165 individuals with HL using sequencing of significant regions of the *GJB2* gene. A total of 13 known allelic variants were found (с.-254C>T, с.-49G>A, с.-23+1G>A, с.35delG, с.79G>A, с.101T>C, с.109G>A, с.235delC, с.299_300delAT, с.327_328delinsA, с.341A>G, с.457G>A и с.516G>C). In the sample of Buryat patients, the mutation spectrum was represented by five *GJB2* variants: с.-23+1G>A (4.1%), с.109G>A (0.6%), с.235delC (1.4%), с.327_328delGinsA (0.6%), с.516G>C (0.6%). Five mutations were found among Russian patients: с.35delG (25.7%), с.-23+1G>A (3.3%), с.109G>A (1.9%), с.101T>C (0.6%), с.299_300delAT (0.6%). In general, the contribution of biallelic mutations of the *GJB2* gene to the etiology of HL in the total sample of patients in Buryatia was 15.8% (26/165). When the total sample of patients was divided by ethnicity the contribution of biallelic mutations of the *GJB2* gene to the etiology of HL in Buryat patients was 5.1% (4/79), and in Russian patients –

28.9% (22/76). Thus, the results of our study indicate that the mutations in the *GJB2* gene are not the main cause of HL in Buryats. Probably, in some *GJB2*-negative patients (84.2% in our study), HL may be due to the mutations in other genes responsible for the development of hereditary hearing impairments.

Key words: deafness, autosomal recessive 1A; mutations of the *GJB2* (Cx26) gene; Republic of Buryatia.

For citation: Pshennikova V.G., Cherdonova A.M., Teryutin F.M., Romanov G.P., Solovyev A.V., Fedorova S.A., Barashkov N.A. Spectrum and frequency of *GJB2* (Cx26) gene mutations in patients with hearing impairments in the Republic of Buryatia. *Meditsinskaya genetika* [Medical genetics] 2021; 20(7): 26-36. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.26-36

Corresponding author: Vera G. Pshennikova; **e-mail:** psennikovavera@mail.ru

Funding. Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (FSRG-2020-0016), «Study of the genetic structure and burden of hereditary pathology in the populations of the Republic of Sakha (Yakutia)», Russian Foundation for Basic Research (No. 18-05- 600035_Arctic and No. 20-015-00328_A).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 30.06.2021.

Введение

В диагностике наследственной несиндромальной потери слуха высокую информативность обеспечивают методы молекулярно-генетического анализа мутаций гена *GJB2* (Cx26) (13q12.11, MIM 121011). У подавляющего большинства пациентов с глухотой/тугоухостью идентифицируются рецессивные мутации в гене *GJB2* в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии (биаллельные мутации), наличие которых соответствует диагнозу аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа (OMIM#220290). В настоящее время известно более 420 изменений последовательности гена *GJB2* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=GJB2%5Bgene%5D>), что существенно затрудняет разработку рутинных методов ДНК-диагностики данного заболевания.

Ранее были опубликованы данные мета-анализа, в которых систематическому изучению были подвергнуты 216 научных статей, содержащих результаты молекулярно-генетических исследований гена *GJB2* у пациентов с потерей слуха из различных регионов мира [1]. Мета-анализом в общей сложности было охвачено 43530 пробандов из 63 стран, где было идентифицировано 7518 индивидов с биаллельными патогенными вариантами гена *GJB2*, ассоциированными с потерей слуха. В целом, вклад патогенных вариантов гена *GJB2* в этиологию потери слуха в мире, в среднем оказался равен 17,3%. Среди изученных стран, наибольший вклад патогенных вариантов гена *GJB2*, обуславливающих аутосомно-рецессивную глухоту, был показан в странах Европы (в среднем 27,1%), а наименьший — в странах Африки, расположенных южнее Сахары (в среднем 5,6%) [1].

Кроме того, известно, что у представителей различных этнических групп спектр и частота наиболее распространенных рецессивных мутаций гена *GJB2* имеют существенные различия [1]. Среди мажорных *GJB2*-

мутаций наиболее распространенной в мире является мутация с.35delG p.(Gln12fs), характерная для стран Европы, Америки, Северной Африки и Ближнего Востока [1, 2]. В странах Восточной Азии широко распространена мутация с.235delC p.(Leu79fs), в этой части света часто встречается мутация с.109G>A p.(Val37Ile), которая также была зарегистрирована с относительно высокой частотой в странах Океании и Австралии [1]. Мутация с.427C>T p.(Arg143Trp) впервые была описана как этноспецифичная для популяций Ганы (Западная Африка). Однако в последующем данная мутация была обнаружена в странах Ближнего Востока, Восточной Азии и в некоторых странах Европы [2, 3].

Существуют редкие мутации гена *GJB2*, специфичные только для отдельных (изолированных) этнических групп [1, 2]. Так, среди евреев ашкенази встречается делеция с.167delC p.(Leu56fs), среди потомков индейцев майя в Центральной Америке (Гватемала) преобладает нонсенс замена с.131G>A p.(Trp44*), в Южной Америке встречаются мутации с.19C>T p.(Gln7*) (Эквадор) и с.596C>T p.(Ser199Phe) (Колумбия) [4-7].

В России с ее многонациональным составом населения изучение специфики спектра мутаций гена *GJB2* и их вклада в этиологию нарушений слуха с учетом территориальной распространенности является актуальной задачей для разработки регионально-адаптированных методов ДНК-диагностики наследственных нарушений слуха. Ранее по вкладу мутаций гена *GJB2* (Cx26) в выборках пациентов с нарушениями слуха из регионов Сибири подробно были охарактеризованы Республика Алтай [8], Республика Саха (Якутия) [9, 10] и Республика Тыва [11, 12]. Изучение наследственной глухоты в Республике Бурятия является логическим продолжением исследований популяций

Сибири, что позволяет закрыть множество «белых пятен», касающихся вопросов генетической эпидемиологии наследственных форм глухоты.

В связи с этим целью настоящей работы является изучение спектра и частоты мутаций гена *GJB2* у пациентов с нарушениями слуха в Республике Бурятия.

Методы

Выборка исследования

Выборку исследования составили 165 (из них 160 неродственных) членов Всероссийского общества глухих Республики Бурятия (г. Улан-Удэ). Лица мужского пола составили 41,2% (n=68), женского 58,8% (n=97). Средний возраст $50,7 \pm 15,5$ года. Этнический состав выборки: буряты 79 чел. (47,9%), русские 76 чел. (46,1%) и представители других национальностей 10 чел. (6%) (бурят/русский 2 чел., монголы 3 чел., нанец, немец, узбек, чуваш и эвенк). Характеристика выборки представлена в табл. 1.

Клинико-аудиологический анализ

При опросе выясняли жалобы на состояние слуха, наличие отделяемого из уха, шума в ушах, головокружения. У каждого пациента были выяснены анамнез жизни, анамнез заболевания (включая перенесенные заболевания), аллергологический анамнез, сведения о травмах и/или операциях, применении ототоксичных препаратов, контакте с производственным шумом [13]. Отологический осмотр проводили с применением отоскопа KaWe Комбилайт по унифицированным алгоритмам. Полное аудиологическое обследование проводили с использованием тимпанометра и аудиометра «AA222» («Interacoustics», Дания). Пороги слышимости измеряли 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 по международной классификации, согласно которой I степень соответствует 26–40 дБ в речевом диапазоне частот, II степень — 41–55 дБ, III степень — 56–70 дБ, IV степень — 71–90 дБ, глухота >90 дБ.

Анализ последовательности гена *GJB2*

ДНК выделяли из фракции лейкоцитов крови фенол-хлороформным методом. Амплификацию некодирующего (экзон 1), кодирующего (экзон 2) и фланкирующих областей гена *GJB2* проводили методом ПЦР на термоциклере «MJ Mini» (Bio-Rad) с использованием праймеров: экзон 1 — F-5'-CCGGGAAGCTCTGAGGAC-3' и R-5'-GCAACCGCTCTGGGTCTC-3' [14]; экзон 2 — F-5'-TCGGCCCCAGTGGTACAG-3' и R-5'-CTGGGCAATGCGTTAAACTGG-3' [15–17]. Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом (использовали горизонтальные электрофорезные камеры 15 x 15 см) в 4%-ном агарозном геле. Визуализацию гелей после электрофореза проводили с помощью системы гель-видеодокументации Molecular Imager Gel Doc XR («Bio-Rad», США). Амплифицированные фрагменты очищали от компонентов ПЦР на магнитных частицах AMPure XP («Beckman Coulter», США) и проводили реакции секвенирования по Сэнгеру с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Невключившиеся флуоресцентные BigDye терминаторы удаляли при помощи гель-фильтрации через колонку с сорбентом Sephadex G-50 DNA grade («GE Healthcare», Германия). Определение нуклеотидной последовательности фрагментов гена *GJB2* проводили на автоматическом анализаторе ABI Prism 3130XL («Applied Biosystems», США) в ЦКП «Геномика» СО РАН (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск). Для анализа секвенограмм использовали программы Sequence Analysis Version 5.4

Таблица 1

Характеристика выборки пациентов с нарушениями слуха в Бурятии

Выборка исследуемых	Количество n (%)	Количество неродственных n (%)	Пол		Средний возраст, лет
			Мужчины	Женщины	
Буряты	79 (47,9%)	74 (46,2%)	31 (39,2%)	48 (60,8%)	46,9±14,3
Русские	76 (46,1%)	76 (47,6%)	32 (42,1%)	44 (57,9%)	54,8±15,7
Другие*	10 (6%)	10 (6,2%)	5 (50%)	5 (50%)	49,2±15,6
Всего	165 (100%)	160 (100%)	68 (41,2%)	97 (58,8%)	50,7±15,5

Примечание: * — представители других национальностей, а также потомки от межэтнических браков.

и Chromas v.2.0. Вариации последовательностей ДНК идентифицировали путем сравнения с эталонными последовательностями гена *GJB2*: chr13(GRCh38.p13): NC_000013.11, NG_008358.1, NM_004004.6, NP_003995.2 XP_011533351.1 (NCBI, Gene ID: 2706).

Краткие сведения о регионе исследования

Республика Бурятия занимает значительную часть юга Восточной Сибири (южнее и восточнее озера Байкал), общая площадь 351,3 тыс. км². Регион граничит с Иркутской областью, Республикой Тыва, Забайкальским краем и Монголией. Административно-территориальное деление Бурятии включает 21 муниципальный район, два городских округа (ГО г. Улан-Удэ и ГО г. Северобайкальск), 16 городских и 248 сельских поселений (из официального портала: <https://egov-buryatia.ru>). Численность постоянного населения Республики Бурятия на 01.01.2020, составила 971,8 тыс. человек (59,2% городское население) со средней плотностью 2,8 человека чел./км². Национальный состав республики, по данным Всероссийской переписи населения-2010: русские 66,1%, буряты 30%, украинцы 0,6%, другие национальности 3,3%. Из представителей коренных малочисленных народов, эвенки составили 0,3% и сойоты 0,4% (<https://burstat.gks.ru/perepisi>).

Этический контроль

Обследования, предусмотренные рамками данной научно-исследовательской работы, проводились после информированного письменного согласия участников или их родителей. Научно-исследовательская работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской

этике при ЯНЦ КМП в 2019 году (г. Якутск, протокол №50 от 24 декабря 2019 г.).

Результаты

Спектр и частота аллельных вариантов гена *GJB2*

В результате секвенирования 5'-фланкирующих областей и экзонов гена *GJB2* у 165 пациентов из Республики Бурятия, было обнаружено 13 аллельных вариантов (с.-254C>T, с.-49G>A, с.-23+1G>A, с.35delG, с.79G>A, с.101T>C, с.109G>A, с.235delC, с.299_300delAT, с.327_328delinsA, с.341A>G, с.457G>A и с.516G>C) (рис. 1). В белок-кодирующей области (экзон 2) гена *GJB2* были идентифицированы 10 вариантов, в интронной области сайта сплайсинга, прилежащей к экзону 1 — один вариант (с.-23+1G>A) и в не-транслируемой области — два варианта (с.-254C>T и с.-49G>A) (рис. 1). Все выявленные в исследовании аллельные варианты гена *GJB2* являются известными и присутствуют в базах данных аннотированных вариантов HGMD/ClinVar.

Анализ частоты встречаемости выявленных аллельных вариантов гена *GJB2*, проводился на выборке из неродственных семей (160 из 165 обследованных индивидов). Частота 8 патогенных вариантов (патогенных рецессивных мутаций) гена *GJB2* составила 18,7% (n=60) от числа исследованных неродственных хромосом (n=320). Среди них наиболее распространенными были три мутации (аллельная частота >1%): с.35delG (12,2%), с.-23+1G>A (3,4%) и 109G>A (1,3%). При рас-

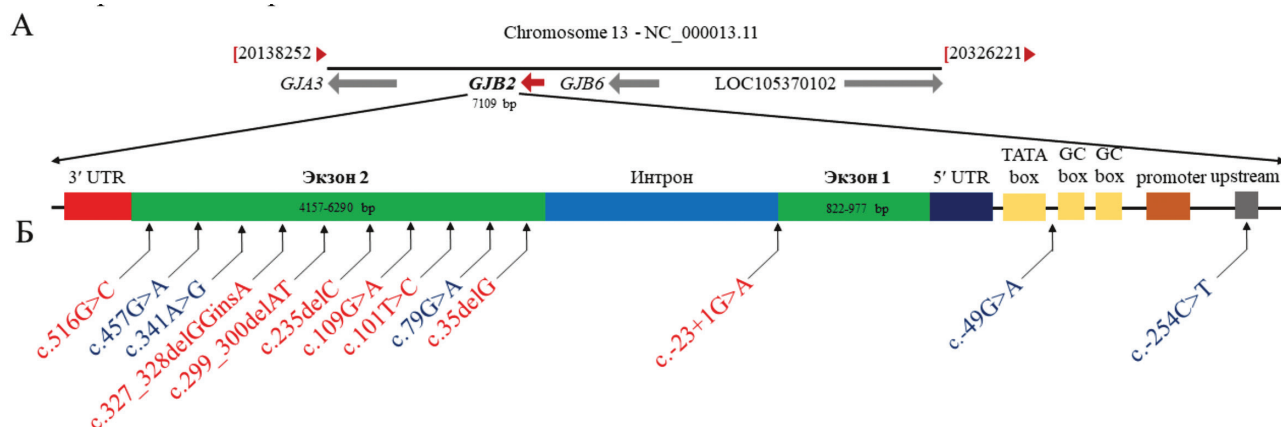


Рис. 1. Аллельные варианты гена *GJB2*, обнаруженные у 165 пациентов с нарушениями слуха в Бурятии. **А** – Схематическое изображение структуры гена *GJB2* NC_000013.11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2706>); **Б** – Аллельные варианты гена *GJB2*, обнаруженные у пациентов с нарушениями слуха в Бурятии. *Примечание:* красным шрифтом показаны патогенные варианты, синим – доброкачественные варианты, не имеющие клинического значения.

пределении данной выборки по этнической принадлежности у пациентов бурятов наиболее частыми были мутации с.-23+1G>A (4,1%) и с.235delC (1,4%). У русских пациентов чаще всего обнаруживалась мутация с.35delG (25,7%), затем с.-23+1G>A (3,3%) и с.109G>A (1,9%). У пациентов другой этнической принадлежности мутаций не было обнаружено (табл. 2).

На полиморфные варианты гена *GJB2*, не имеющие клинического значения, в выборке неродственных пациентов пришлось 10,3% (n=33) всех исследованных хромосом (табл. 2). Среди полиморфных *GJB2*-вариантов самым распространенным был вариант с.79G>A с аллельной частотой 6,6% (n=21). В 71% (n=227 хромосом) исследованных аллелей изменений в нуклеотидной последовательности гена *GJB2* не было обнаружено (табл. 2).

Следует отметить, что две пары гетерозиготных замес с.[-254C>T(;);516G>C] и с.[79G>A(;);341A>G] пред-

положительно находятся в *цис*-положении, что ранее было показано в других исследованиях [8, 10, 12, 18-20]. Так, в результате анализа мутационного спектра гена *GJB2* у пациентов с нарушениями слуха из Республики Тыва было показано, что все гетерозиготные носители мутации с.516G>C также имели вариант с.-254C>T, который предположительно находился в *цис*-положении. Данная связь была подтверждена тем, что все тувинцы с потерей слуха (n=38) с мутацией с.516G>C в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, имели в нетранслируемой области гена вариант с.-254C>T [12]. Исходя из того, что тувинцы и буряты являются соседними популяциями, в нашем случае оба варианта с.-254C>T и с.516G>C, обнаруженные у пациента буряты, скорее всего, являются *цис*-гетерозиготой (с.[-254C>T(;);516G>C]). В пользу того, что варианты с.79G>A и с.341A>G вероятно находятся в *цис*-конфигурации, в нашем исследовании свиде-

Таблица 2

Аллельная частота вариантов гена *GJB2* у пациентов с нарушениями слуха в Бурятии

Аллельные варианты гена <i>GJB2</i>			Буряты n=74 (неродственные)		Русские n=76 (неродственные)		Другие n=10 (неродственные)		Всего n=160 (неродственные)	
#	Нуклеотидный вариант (NM_004004.5)	Аминокислотный вариант (NP_003995.2)	148 хромосом	АЧ (%)	152 хромосомы	АЧ (%)	20 хромосом	АЧ (%)	320 хромосом	АЧ (%)
Патогенные <i>GJB2</i> -варианты (мутации)										
1	с.[-23+1G>A]	-	6	4,1	5	3,3	-	-	11	3,4
2	с.[35delG]	p.[Gly12fs]	-	-	39	25,7	-	-	39	12,2
3	с.[101T>C]	p.[Met34Thr]	-	-	1	0,6	-	-	1	0,3
4	с.[109G>A]	p.[Val37Ile]	1	0,6	3	1,9	-	-	4	1,3
5	с.[235delC]	p.[Leu79fs]	2	1,4	-	-	-	-	2	0,6
6	с.[299_300delAT]	p.[His100fs]	-	-	1	0,6	-	-	1	0,3
7	с.[327_328delGGinsA]	p.[Glu110fs]	1	0,6	-	-	-	-	1	0,3
8	с.[-254C>T(;); 516G>C]*	p.[5'-UTR(;) Trp172Cys]*	1	0,6	-	-	-	-	1	0,3
Всего			11	7,4	49	32,2	-	-	60	18,7
Полиморфные <i>GJB2</i> -варианты (варианты не имеющие клинического значения)										
9	с.[-49G>A]	5'-UTR	-	-	1	0,6	-	-	1	0,3
10	с.[79G>A]	p.[Val27Ile]	18	12,2	2	1,3	1	5	21	6,6
11	с.[79G>A(;);341A>G]*	p.[Val27Ile(;); Glu114Gly]*	6	4,1	2	1,3	2	10	10	3,1
12	с.[457G>A]	p.[Val153Ile]	-	-	1	0,6	-	-	1	0,3
Всего			24	16,3	6	3,9	3	15	33	10,3
с.[wt]			113	76,4	97	63,8	17	85	227	71

Примечание: аллельная частота вариантов гена *GJB2* была рассчитана на неродственных пациентов; n – количество пациентов, АЧ – аллельная частота, 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, wt – норма (дикий тип), * – вероятно, в *цис*-положении.

тельствует обнаружение варианта с.79G>A в гомозиготном состоянии в сочетании с гетерозиготным вариантом с.341A>G (табл. 3).

Частота генотипов гена *GJB2*

Идентифицированные варианты в различных сочетаниях составили 17 генотипов гена *GJB2* (табл. 3). Из них 7 *GJB2*-генотипов с биаллельными мутациями (в гомозиготном или в компаунд-гетерозиготном состоянии) были обнаружены у 15,8% (n=26) человек. Таким образом, доля (15,8%) казуативных *GJB2*-генотипов определила вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* (Cx26), обуславливающих аутосомно-рецессивную

потерю слуха у пациентов в Бурятии (табл. 3). Среди биаллельных *GJB2*-генотипов чаще всего встречались генотипы с.[35delG];[35delG] с частотой 9,7% (n=16) и с.[-23+1G>A];[35delG] с частотой 3% (n=5). Остальные 5 *GJB2*-генотипов (с.[-23+1G>A];[-23+1G>A], с.[-23+1G>A];[327_328delGGinsA], с.[-23+1G>A];[-254C>T(;)516G>C], с.[35delG];[299_300delAT] и с.[235delC];[235delC]) были зарегистрированы с частотой меньше 1% (табл. 3).

Среди бурятов (n=79) *GJB2*-генотипы, обуславливающие потерю слуха, были обнаружены только у 4 (5,1%) пациентов (табл. 3). Среди них чаще (у трех пациентов) обнаруживался вариант с.-23+1G>A, в го-

Таблица 3

Генотипы гена *GJB2* у пациентов с нарушениями слуха в Бурятии

#	GJB2-генотипы	Буряты		Русские		Другие		Всего неродственных		Всего	
		n=79	ЧГ (%)	n=76	ЧГ (%)	n=10	ЧГ (%)	n=160	ЧГ (%)	n=165	ЧГ (%)
GJB2-генотипы с биаллельными рецессивными мутациями											
1	c.[-23+1G>A];[-23+1G>A]	1	1,2	-	-	-	-	1	0,6	1	0,6
2	c.[-23+1G>A];[35delG]	-	-	5	6,6	-	-	5	3,1	5	3
3	c.[-23+1G>A];[327_328delGGinsA]	1	1,2	-	-	-	-	1	0,6	1	0,6
4	c.[-23+1G>A];[-254C>T(;)516G>C]	1	1,2	-	-	-	-	1	0,6	1	0,6
5	c.[35delG];[35delG]	-	-	16	21	-	-	16	10	16	9,7
6	c.[35delG];[299_300delAT]	-	-	1	1,3	-	-	1	0,6	1	0,6
7	c.[235delC];[235delC]	1	1,2	-	-	-	-	1	0,6	1	0,6
Всего		4	5,1	22	28,9	-	-	26	16,2	26	15,8
GJB2-генотипы с моноаллельными рецессивными мутациями											
8	c.[-23+1G>A];[wt]	1	1,2	1	1,3	-	-	2	1,2	2	1,2
9	c.[35delG];[wt]	-	-	1	1,3	-	-	1	0,6	1	0,6
10	c.[101T>C];[wt]	-	-	1	1,3	-	-	1	0,6	1	0,6
11	c.[109G>A];[wt]	-	-	2	2,6	-	-	2	1,2	2	1,2
12	c.[109G>A];[79G>A]	1	1,2	1	1,3	-	-	2	1,2	2	1,2
Всего		2	2,5	6	7,9	-	-	8	5	8	4,8
GJB2-генотипы с полиморфными вариантами											
13	c.[-49G>A];[wt]	-	-	1	1,3	-	-	1	0,6	1	0,6
14	c.[79G>A];[wt]	18	22,8	1	1,3	1	10	20	12,5	20	12,1
15	c.[79G>A(;)341A>G];[wt]	5	6,3	2	2,6	2	20	9	5,6	9	5,5
16	c.[79G>A(;)341A>G];[79G>A]	1	1,2	-	-	-	-	1	0,6	1	0,6
17	c.[457G>A];[wt]	-	-	1	1,3	-	-	1	0,6	1	0,6
Всего		24	30	5	6,5	3	30	32	20	32	19,4
GJB2-генотипы без изменений («дикий» тип)											
c.[wt];[wt]		49	62,1	43	56,6	7	60	94	58,8	99	60

Примечание: n – количество пациентов, ЧГ – частота генотипа в %, wt – норма (wild type).

мозиготном состоянии в одном случае, в остальных — в компаунде с другими патогенными вариантами (с.[-23+1G>A];[35delG], с.[-23+1G>A];[327_328delGGinsA] и с.[-23+1G>A];[-254C>T(;516G>C)] (табл. 3). Среди русских пациентов (n=76) были обнаружены три *GJB2*-генотипа с биаллельными мутациями, выявленные у 22 (28,9%) человек. Самым частым *GJB2*-генотипом из них оказался с.[35delG];[35delG], выявленный у 16 (21%) пациентов. У пациентов другой этнической принадлежности (n=10), *GJB2*-генотипов, обуславливающих потерю слуха, не обнаружено (табл. 3). Таким образом, вклад биаллельных мутаций в этиологию потери слуха в выборке бурятов составил 5,1%, а у русских — 28,9%.

В общей выборке исследуемых 5 различных *GJB2*-генотипов были представлены моноаллельными (гетерозиготными) рецессивными мутациями в сочетании с полиморфным вариантом или «диким» типом последовательности гена *GJB2*, которые были обнаружены у 8 (4,8%) пациентов. Данные пациенты могут быть как гетерозиготными носителями мутации гена *GJB2*, так и иметь в *транс*-положении патогенную мутацию, находящуюся за пределами анализируемой области гена *GJB2* (табл. 3).

С полиморфными вариантами, не имеющими клинического значения, были обнаружены 6 *GJB2*-генотипов, выявленных у 32 (19,4%) пациентов. У 99 (60%) пациентов в результате секвенирования гена *GJB2* изменений на обоих аллелях не было обнаружено (табл. 3). В целом, у 139 (84,3%) пациентов потеря слуха не связана с мутациями гена *GJB2* (*GJB2*-негативные пациенты).

Обсуждение

Впервые в Республике Бурятия путем прямого секвенирования значимых (экзон 1, экзон 2) областей гена *GJB2* были определены спектр и частота мутаций на выборке из 165 индивидов с нарушениями слуха. Всего было обнаружено 13 известных (HGMD/ClinVar) аллельных вариантов (8 патогенных рецессивных мутаций, 5 полиморфных вариантов). Из них на долю 8 выявленных рецессивных мутаций пришлось 18,7% (60/320) всех исследованных хромосом неродственных пациентов, среди которых наибольшую распространенность (>1%) имели три мутации — с.35delG (12,2%), с.-23+1G>A (3,4%) и с.109G>A (1,3%).

В выборке пациентов бурятов мутационный спектр был представлен пятью *GJB2*-вариантами: с.-23+1G>A (4,1%), с.109G>A (0,6%), с.235delC (1,4%), с.327_328delGGinsA (0,6%), с.516G>C (0,6%)

(табл. 2). Представленные варианты являются наиболее распространенными в восточноазиатских популяциях [1, 2, 8, 9, 12]. Важно отметить, что из них три мутации — с.-23+1G>A, с.235delC и с.516G>C, имеют уникальный характер распространения на территории Сибири вследствие эффекта основателя и, возможно, других популяционно-генетических факторов [8-10, 12, 21]. Так, мутация сайта сплайсинга с.-23+1G>A имеет чрезвычайно высокую частоту распространения 51,8% (92% всех мутантных хромосом) среди пациентов якутов [10]. Делеция с.235delC является мажорной у алтайских пациентов, ее частота составила 7,5% (66,7% всех мутантных хромосом) [8]. В недавнем исследовании, проведенном в Республике Тыва, интересной находкой стала высокая распространенность редкого варианта с.516G>C среди тувинских пациентов, обнаруженного с частотой 13,9% (62,9% всех мутантных хромосом) [12]. Данный вариант ранее был выявлен только в гетерозиготном состоянии у одного алтайца в компаунде с мутацией с.235delC [8] и в одном случае у пациента из Монголии в сочетании с делецией с.299_300delAT [19]. Примечательно то, что в нашем исследовании пациент с наличием с.516G>C был из Тункинского района Бурятии, который с южной стороны граничит с Монголией, а с западной — с Республикой Тыва (<https://egov-buryatia.ru/about-republic/geografic-and-weather/>).

Интересным результатом также является обнаружение редкой мутации с.327_328delGGinsA у одного пациента бурята (с сенсоневральной тугоухостью IV степени справа, глухотой слева) в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией сайта сплайсинга с.[-23+1G>A];[327_328delGGinsA]. Мутация с.327_328delGGinsA ранее была обнаружена только в одной инбредной иранской семье в гетерозиготном состоянии в компаунде с другими *GJB2*-мутациями (с.35delG и с.176_191del) [22]. На рис. 2 представлена идентификация мутации с.327_328delGGinsA, которая приводит к сдвигу рамки считывания нуклеотидной последовательности гена, вследствие выпадения двух гуаниновых оснований и вставки на их позицию одного аденинового.

У русских пациентов, проживающих в Республике Бурятия, были обнаружены следующие *GJB2*-мутации: с.35delG (25,7%), с.-23+1G>A (3,3%), с.109G>A (1,9%), с.101T>C (0,6%), с.299_300delAT (0,6%) (табл. 2). Обнаруженная высокая частота мутации с.35delG в данной группе пациентов, на которую приходится 79,6% всех патогенных аллелей, согласуется с данными исследования, проведенного у пациентов (n=705) с несиндромальной глухотой из различных регионов России. В этом исследовании выявлено 20 различных *GJB2*-

мутаций (46,7%), мутация с.35delG превалировала с частотой 37,7% (81% всех патогенных аллелей) [23]. В других исследованиях у русских пациентов со снижением слуха в Сибири данная мутация также обнаруживалась с максимальными аллельными частотами: в Якутии 22,3% (21/94 хромосом) [10], на Алтае 47,1% (16/34 хромосом) [8] и в Тыве 42,9% (6/14 хромосом) [11]. Остальные *GJB2*-мутации в данной выборке пациентов характерны для восточноазиатских и европейских популяций [1, 2, 24, 25].

В результате анализа частоты генотипов гена *GJB2* установлено, что вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха в общей выборке исследования составил 15,8% (26/165). При распределении пациентов по этнической принадлежности, вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у пациентов бурятов оказался ниже — 5,1% (4/79), по сравнению с обнаруженным у русских пациентов — 28,9%, (22/76) (рис. 3).

В сравнении с ранее изученными регионами Азии обнаруженный вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у пациентов бурятов (5,1%) оказался сопоставим с результатами, полученными в Монголии, где в выборке из 534 пробандов с несин-

дромальной нейросенсорной тугоухостью вклад мутаций *GJB2*, обуславливающих потерю слуха, составил 4,5% [19]. Стоит обратить внимание и на выявленный мутационный спектр у монгольских пациентов, среди которых наиболее распространенными были с.-23+1G>A (3,5%) и с.235delC (1,5%) [19]. Из 11 патогенных вариантов выявленных у населения с тугоухостью в Монголии, в нашем исследовании были обнаружены 4 варианта (с.-23+1G>A, с.109G>A, с.235delC, с.516G>C) среди бурятов и 2 варианта среди русских (с.35delG и с.299_300delAT). Отметим, что в настоящее время частота распространения потери слуха ассоциированной с мутациями гена *GJB2* в Монголии (4,5%), является одной из минимальных в мире [1].

Полученные результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что мутации гена *GJB2* не являются основной причиной потери слуха в изученной выборке бурятов. Вероятно, у большей части пациентов, не имеющих биаллельных мутаций в этом гене, потеря слуха может быть обусловлена мутациями в других генах, ответственных за развитие тугоухости/глухоты, которых по последним данным Hereditary Hearing Loss Homepage идентифицировано более 120 (<http://hereditaryhearingloss.org>).

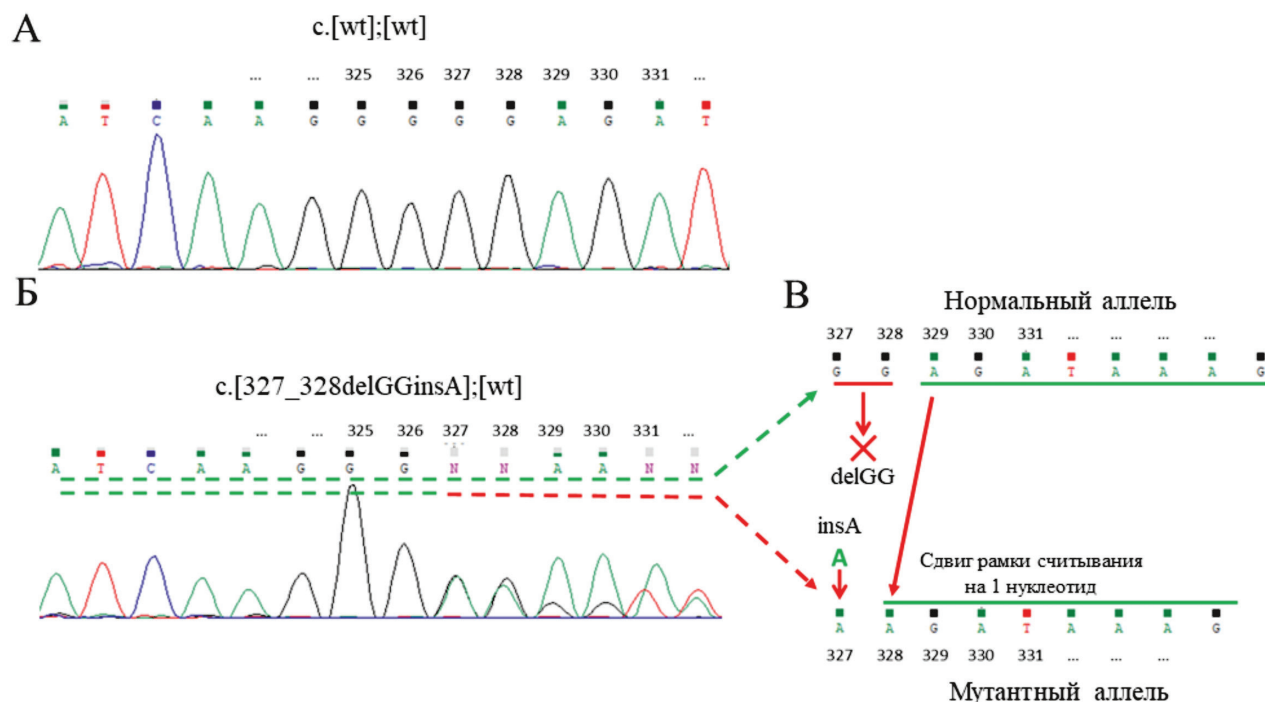


Рис. 2. Идентификация мутации с.327_328delGGinsA гена *GJB2*. **А** – Нуклеотидная последовательность гена в норме (с.[wt]:[wt]). **Б** – Мутация с.327_328delGGinsA в гетерозиготном состоянии (с.[327_328delGGinsA]:[wt]). **В** – Расшифровка секвеннограммы гетерозиготы по мутации с.327_328delGGinsA, где стрелками показаны: выпадение двух гуанинов (делеция – delGG); вставка аденина (инсерция – insA).

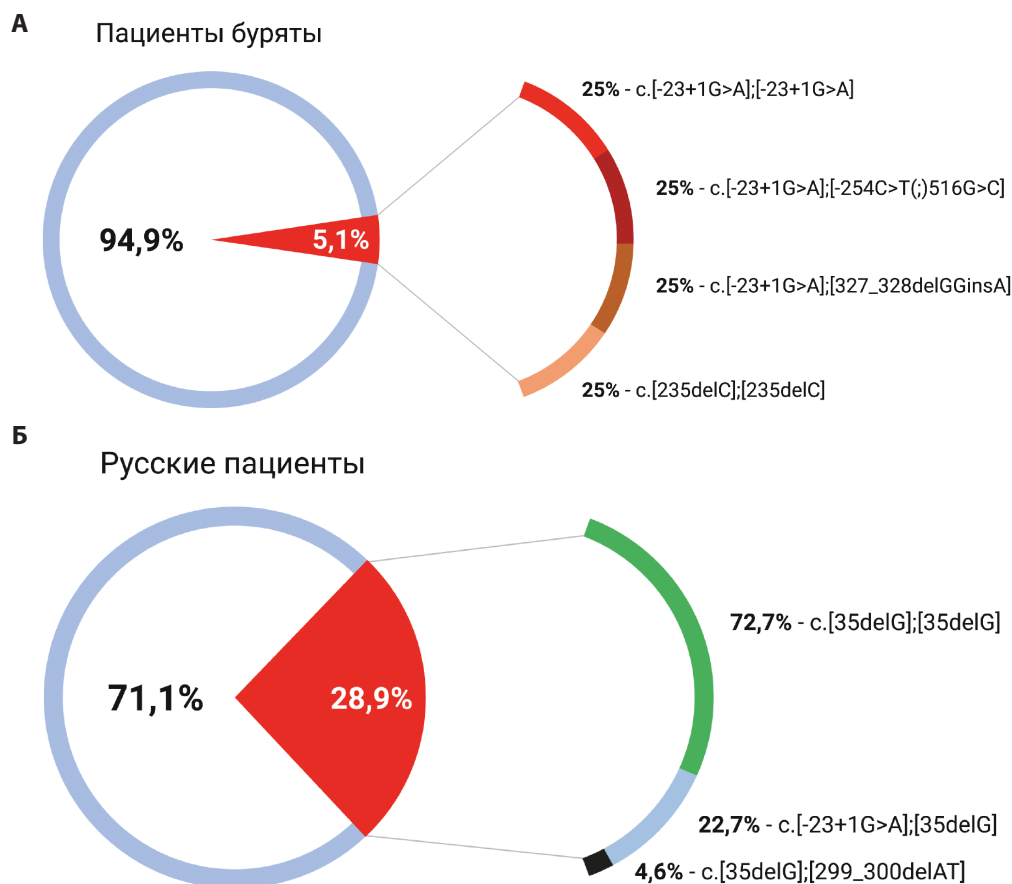


Рис. 3. Вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у пациентов бурятов (n=79) и русских (n=76). **А.** Вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у пациентов бурятов. Справа голубым цветом показана доля *GJB2*-негативных пациентов (потеря слуха не связана с геном *GJB2*), красным – вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у пациентов бурятов. Слева показаны доли генотипов гена *GJB2* с биаллельными мутациями. **Б.** Вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у русских пациентов. Справа голубым цветом показана доля *GJB2*-негативных пациентов (потеря слуха не связана с геном *GJB2*); красным – вклад биаллельных мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха у русских пациентов. Слева показаны доли генотипов гена *GJB2* с биаллельными мутациями.

Литература

- Chan D.K., Chang K.W. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope* 2014; 124(2): E34-53. doi: 10.1002/lary.24332.
- Tsukada K., Nishio S.Y., Hattori M., Usami S. Ethnic-specific spectrum of GJB2 and SLC26A4 mutations: their origin and a literature review. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015; 124. (Suppl): 61-76. doi: 10.1177/0003489415575060.
- Hamelmann C., Amedofu G.K., Albrecht K. et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum. Mutat* 2001; 18(1): 84-85.
- Brownstein Z., Avraham K.B. Deafness genes in Israel: implications for diagnostics in the clinic. *Pediatr Res* 2009; 66(2): 128-34. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181aabd7f.
- Tamayo M.L., Olarte M., Gelvez N. et al. Molecular studies in the GJB2 gene (Cx26) among a deaf population from Bogota, Colombia: results of a screening program. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73(1): 97-101.
- Paz-y-Miño C., Beaty D., López-Cortés A., Proaño I. Frequency of GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations among an Ecuadorian mestizo population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2014; 78(10): 1648-1654. doi: 10.1016/j.ijporl.2014.07.014.
- Carranza C., Menendez I., Herrera M. et al. Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala. *Clin Genet* 2016; 89: 461-465. doi: 10.1111/cge.12676.
- Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V. et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Med. Genet* 2005; 6(1): 12.
- 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; 56(9): 631-639. doi: 10.1038/jhg.2011.72.
- Barashkov N.A., Pshennikova V.G., Posukh O.L. et al. Spectrum and Frequency of the GJB2 Gene Pathogenic Variants in a Large Cohort

- of Patients with Hearing Impairment Living in a Subarctic Region of Russia (the Sakha Republic). *PLoS One* 2016; 11(5): e0156300. doi: 10.1371/journal.pone.0156300.
11. Бады-Хоо М.С., Бондарь А.А., Морозов И.В. и др. Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва. Сообщение II. Оценка спектра мутаций в гене GJB2 (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха. *Медицинская генетика* 2014; 13(11): 23-33.
 12. Posukh O.L., Zytars M.V., Bady-Khoo M.S. et al. Unique mutational spectrum of the GJB2 Gene and its pathogenic contribution to deafness in Tuvians (Southern Siberia, Russia): A high prevalence of rare variant c.516G>C (p.Trp172Cys). *Genes* 2019; 10(6): 429. doi: 10.3390/genes10060429.
 13. Пшеничкова В.Г., Терютин Ф.М., Барашков Н.А. и др. Клинико-аудиологический и генеалогический анализ случаев нарушения слуха в Республике Бурятия. *Якутский медицинский журнал* 2020; 4(72): 44-49. doi: 10.25789/YMJ.2020.72.12.
 14. Sirmaci A., Akcayoz-Duman D., Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J. Genet* 2006; 85(3): 213-216.
 15. Zelante L., Gasparini P., Estivill X. et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet* 1997; 6(9): 1605-1609.
 16. Kelley P.M., Harris D.J., Comer B.C. et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet* 1998; 62(4): 792-799.
 17. Green G.E., Cuniff C. Genetic evaluation and counseling for congenital deafness. *Adv. Otorhinolaryngol* 2002; 61: 230-240. doi: 10.1159/000066814.
 18. Tang H.Y., Fang P., Ward P.A. et al. DNA sequence analysis of GJB2, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls. *Am J Med Genet A* 2006; 140(22): 2401-2415.
 19. Tekin M., Xia X.J., Erdenetungalag R. et al. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann. Hum. Genet* 2010; 74(2): 155-64.
 20. Choi S.-Y., Lee K.-Y., Kim H.-J. et al. Functional evaluation of GJB2 variants in nonsyndromic hearing loss. *Mol. Med* 2011; 17(5-6): 550-556. doi: 10.2119/molmed.2010.00183.
 21. Zytars M.V., Bady-Khoo M.S., Danilchenko V.Y. et al. High Rates of Three Common GJB2 Mutations c.516G>C, c.-23+1G>A, c.235delC in Deaf Patients from Southern Siberia Are Due to the Founder Effect. *Genes (Basel)* 2020; 11(7): 833. doi: 10.3390/genes11070833.
 22. Davoudi-Dehaghani E., Fallah M.-S., Shirzad T. et al. Reporting the presence of three different diseases causing GJB2 mutations in a consanguineous deaf family. *Int J Audiol* 2014; 53(2): 128-31. doi: 10.3109/14992027.2013.850748.
 23. Близнач Е.А., Галкина В.А., Матюшенко 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; 48(1): 112-124.
 24. Dai P., Yu F., Han B. et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. *J. Transl. Med* 2009; 14: 7-26. doi: 10.1186/1479-5876-7-26.
 25. Liu Q.M., Tian Y., Yu J.J. et al. [A follow-up study of abnormal mutation in neonatal deafness gene screening]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2019; 54(12): 881-887. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.12.001. (In Chinese).
- ## References
1. Chan D.K., Chang K.W. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope* 2014; 124(2): E34-53. doi: 10.1002/lary.24332.
 2. Tsukada K., Nishio S.Y., Hattori M., Usami S. Ethnic-specific spectrum of GJB2 and SLC26A4 mutations: their origin and a literature review. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015; 124. (Suppl): 61-76. doi: 10.1177/0003489415575060.
 3. Hamelmann C., Amedofu G.K., Albrecht K. et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum. Mutat* 2001; 18(1): 84-85.
 4. Brownstein Z., Avraham K.B. Deafness genes in Israel: implications for diagnostics in the clinic. *Pediatr Res* 2009; 66(2): 128-34. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181aabd7f.
 5. Tamayo M.L., Olarte M., Gelvez N. et al. Molecular studies in the GJB2 gene (Cx26) among a deaf population from Bogota, Colombia: results of a screening program. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73(1): 97-101.
 6. Paz-y-Miño C., Beaty D., López-Cortés A., Proaño I. Frequency of GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations among an Ecuadorian mestizo population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2014; 78(10): 1648-1654. doi: 10.1016/j.ijporl.2014.07.014.
 7. Carranza C., Menendez I., Herrera M. et al. Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala. *Clin Genet* 2016; 89: 461-465. doi: 10.1111/cge.12676.
 8. Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V. et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Med. Genet* 2005; 6(1): 12.
 9. 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; 56(9): 631-639. doi: 10.1038/jhg.2011.72.
 10. Barashkov N.A., Pshennikova V.G., Posukh O.L. et al. Spectrum and Frequency of the GJB2 Gene Pathogenic Variants in a Large Cohort of Patients with Hearing Impairment Living in a Subarctic Region of Russia (the Sakha Republic). *PLoS One* 2016; 11(5): e0156300. doi: 10.1371/journal.pone.0156300.
 11. Bady-Khoo M.S., Bondar A.A., Morozov I.V. et al. Izuchenie nasledstvennykh form tugouhosti/gluhoty v Respublike Tyva. Soobshchenie II. Ocenka spektra mutacij v gene GJB2 (Sx26) i ih vklad v etiologiyu poteri sluha. [Study of hereditary forms of hearing loss in the Republic of Tuva. II. Evaluation of the mutational spectrum of the GJB2 (Cx26) gene and its contribution to the etiology of hearing loss]. *Medicinskaya genetika [Medical Genetics]* 2014; 13(11): 30-40. (In Russ.)
 12. Posukh O.L., Zytars M.V., Bady-Khoo M.S. et al. Unique mutational spectrum of the GJB2 Gene and its pathogenic contribution to deafness in Tuvians (Southern Siberia, Russia): A high prevalence of rare variant c.516G>C (p.Trp172Cys). *Genes* 2019; 10(6): 429. doi: 10.3390/genes10060429.
 13. Pshennikova V.G., Teryutin F.M., Barashkov N.A. et al. Clinical, audiological and genealogical analysis of hearing disorders in the Republic of Buryatia. *Yakut Medical Journal* 2020. 4(72). P. 44-49. doi: 10.25789/YMJ.2020.72.12.
 14. Sirmaci A., Akcayoz-Duman D., Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J. Genet* 2006; 85(3): 213-216.
 15. Zelante L., Gasparini P., Estivill X. et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet* 1997; 6(9): 1605-1609.

16. Kelley P.M., Harris D.J., Comer B.C. et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet* 1998; 62(4): 792-799.
17. Green G.E., Cuniff C. Genetic evaluation and counseling for congenital deafness. *Adv. Otorhinolaryngol* 2002; 61: 230-240. doi: 10.1159/000066814.
18. Tang H.Y., Fang P., Ward P.A. et al. DNA sequence analysis of GJB2, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls. *Am J Med Genet A* 2006; 140(22): 2401-2415.
19. Tekin M., Xia X.J., Erdenetungalag R. et al. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann. Hum. Genet* 2010; 74(2): 155-64.
20. Choi S.-Y., Lee K.Y., Kim H.-J. et al. Functional evaluation of GJB2 variants in nonsyndromic hearing loss. *Mol. Med* 2011; 17(5-6): 550-556. doi: 10.2119/molmed.2010.00183.
21. Zytars M.V., Bady-Khoo M.S., Danilchenko V.Y. et al. High Rates of Three Common GJB2 Mutations c.516G>C, c.-23+1G>A, c.235delC in Deaf Patients from Southern Siberia Are Due to the Founder Effect. *Genes (Basel)* 2020; 11(7): 833. doi: 10.3390/genes11070833.
22. Davoudi-Dehaghani E., Fallah M.-S., Shirzad T. et al. Reporting the presence of three different diseases causing GJB2 mutations in a consanguineous deaf family. *Int J Audiol* 2014; 53(2): 128-31. doi: 10.3109/14992027.2013.850748.
23. Bliznetz E.A., Galkina V.A., Matyushchenko G.N., et al. Changes in the connexin 26 gene (GJB2) in Russian patients with hearing loss: Results of long-term molecular diagnostics of hereditary nonsyndromic hearing loss. *Russian Journal Of Genetics* 2012; 48(1): 101-112.
24. Dai P., Yu F., Han B. et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. *J. Transl. Med* 2009; 14: 7-26. doi: 10.1186/1479-5876-7-26.
25. Liu Q.M., Tian Y., Yu J.J. et al. [A follow-up study of abnormal mutation in neonatal deafness gene screening]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2019; 54(12): 881-887. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.12.001. (*In Chinese*)