

# Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва. Сообщение II. Оценка спектра мутаций в гене *GJB2* (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха\*

Бады-Хоо М.С.<sup>1,2</sup>, Бондарь А.А.<sup>3</sup>, Морозов И.В.<sup>3,4</sup>, Зыцарь М.В.<sup>1,4</sup>, Михальская В.Ю.<sup>1,4</sup>,  
Скиданова О.В.<sup>5</sup>, Барашков Н.А.<sup>6,7,8</sup>, Монгуш Р.Ш.<sup>2</sup>, Омзар О.С.<sup>2</sup>, Тукар В.М.<sup>2</sup>, Посух О.Л.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> — ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН,

630090, г.Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д.10, факс: 8 (383) 333-12-78, e-mail: posukh@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> — ГБУЗ РТ «Республиканская больница №3»,

667010, г.Кызыл, ул. Московская, д.28, тел./факс: 8 (39422) 5-25-77, e-mail: nefrogen@mail.ru

<sup>3</sup> — ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

630090, г.Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д.8, факс: 8 (383) 363-51-53, e-mail: sequest@niboch.nsc.ru

<sup>4</sup> — ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

630090, г.Новосибирск, ул. Пирогова, д.2, тел./факс: 8 (383) 363-43-33, e-mail: posukh@bionet.nsc.ru

<sup>5</sup> — ГБУЗ РТ «Республиканская детская больница»,

667003, г.Кызыл, ул. Кечил-оола, д.26, факс: 8 (39422) 6-15-20, e-mail: ms.oskidanova@mail.ru

<sup>6</sup> — ФГБУ «Якутский научный центр Комплексных медицинских проблем» СО РАМН,

677010, г.Якутск, Сергеляхское ш., д.4. тел./факс: 8 (4112) 32-19-81, e-mail: barashkov2004@mail.ru

<sup>7</sup> — ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»,

677000, г.Якутск, ул. Кулаковского, д.46, тел./факс: 8 (4112) 32-03-70, e-mail: nelloann@mail.ru

<sup>8</sup> — Академия наук Республики Саха (Якутия),

677000, г.Якутск, пр-т Ленина, д.33 тел./факс: 8 (4112) 33-57-10, e-mail: barashkov2004@mail.ru

Представлены результаты изучения генетической компоненты потери слуха, обусловленной мутациями в гене *GJB2* (Cx26), у 201 больного из Республики Тыва с врождённой или возникшей в раннем детском возрасте нейросенсорной тугоухостью III–IV степени/глухотой. Рецессивные мутации в гене *GJB2* p.W172C (с.516G>C), IVS1+1G>A (с.-23+1G>A), с.235delC, p.V37I (с.109G>A), с.299\_300delAT, с.35delG) в гомозиготном, компаунд-гетерозиготном или гетерозиготном состояниях были выявлены у 70 больных (34,8% обследованных), у 38 из которых (18,9%) обнаружено две *GJB2*-мутации, а у 32 (15,9%) — только одна мутация в гене *GJB2*. Мутационный спектр гена *GJB2* в обследованной выборке тувинских больных характеризуется наличием пяти мутаций (p.W172C, IVS1+1G>A, с.235delC, p.V37I, с.299\_300delAT) и полиморфных вариантов этого гена p.V27I (с.79G>A), p.E114G (с.341A>G), p.V153I (с.457G>A), p.F191L (с.571T>C), p.I203T (с.608T>C), часто встречающихся в азиатском регионе, а у русских больных выявлена только одна мутация с.35delG, характерная для европейцев. Частота аллелей с мутациями p.W172C, IVS1+1G>A, с.235delC, p.V37I и с.299\_300delAT среди всех мутантных хромосом обследованных пациентов-тувинцев — 51,49%, 38,61%, 4,95%, 2,97% и 1,98% соответственно. Суммарная частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций в гене *GJB2* в популяционной выборке тувинцев (n = 121) составила 11,57% (p.W172C — 4,96%, IVS1+1G>A — 4,13%, p.V37I — 2,48%). Обнаружение мутаций в гене *GJB2* в группе пациентов, в анамнезе которых имеются указания на средовые этиологические факторы, предположительно приведшие к потере слуха, свидетельствует о необходимости проведения генетического тестирования и в группе больных сотягощённым анамнезом. Выявленные нами семейные (наследуемые) случаи «Cx26-негативной» потери слуха в Республике Тыва свидетельствуют о наличии других, пока не установленных, генов, ассоциированных с этой патологией. Доля больных с потерей слуха, обусловленной наличием двух рецессивных мутаций в гене *GJB2* (18,9%), является минимальной оценкой доли наследственной тугоухости у населения Тывы.

**Ключевые слова:** нейросенсорная тугоухость/глухота; мутации в гене *GJB2* (Cx26), Республика Тыва

\* Работа выполнена в рамках проекта VI.58.1.1 программы фундаментальных исследований СО РАН при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ №11-04-01221-а и 14-04-90010 Бел\_а, гранта Председателя Правительства Республики Тыва для поддержки молодых учёных Республики Тыва (2011—2012 гг.), гранта ФНМ-30 программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2013—2015 гг.), экспедиционных грантов СО РАН (2010—2013 гг.), интеграционного проекта СО РАН №92 и проектов Министерства образования и науки РФ («Совместные лаборатории НГУ-ННЦ СО РАН» и №6.656.2014).

## Введение

Нарушения слуховой функции могут быть обусловлены как средовыми (инфекции, травмы, ототоксичность лекарственных препаратов и т.д.), так и генетическими причинами. Наследственная потеря слуха характеризуется высокой клинической и генетической гетерогенностью. Примерно в 30% случаев потеря слуха — один из клинических признаков большого числа (несколько сотен) синдромов, в 70% — потеря слуха является изолированной (несиндромальной) патологией. В настоящее время известно, что с изолированной потерей слуха ассоциировано около 140 генетических локусов, в которых идентифицировано более 80 генов [44].

Наиболее частой причиной несиндромальной ауто-сомно-рецессивной глухоты у человека (DFNB1A, MIM 220290) являются мутации в гене *GJB2* (gap junction  $\beta 2$ , MIM 121011, 13q11-q12), кодирующем трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26, MIM 121011), который участвует в образовании коннексонов — структур, состоящих из шести белковых субъединиц Cx26. Коннексоны образуют межклеточные каналы, по которым обеспечивается ионный ( $K^+$  и другие малые молекулы) обмен между соседними клетками. Сохранение ионного гомеостаза эндолимфы в тканях внутреннего уха необходимо для нормального процесса звуковосприятия. При дефектах коннексина 26, приводящих к нарушению работы щелевых каналов, ионный баланс эндолимфы тканей внутреннего уха не восстанавливается, что приводит к необратимой потере слуха [31].

В большинстве европейских стран мутации в гене *GJB2* (Cx26) являются причиной врождённой несиндромальной нейросенсорной тугоухости/глухоты у 50–60% больных, в азиатских популяциях вклад *GJB2*-мутаций несколько меньше (10–20%) [26, 32, 43, 49]. К настоящему времени известно более 300 вариаций последовательности гена *GJB2* (мутации, полиморфные и пока ещё неклассифицированные варианты) [21, 42]. Выявлена этническая и территориальная специфичность мутационного спектра и распространённости отдельных мутаций в гене *GJB2* в различных регионах мира, обусловленная в ряде случаев эффектом основателя, и, вероятно, географической и социальной изоляцией некоторых популяций. Так, мутация с.35delG широко распространена в популяциях европейского происхождения [26], мутация с.235delC часто встречается в ряде азиатских стран [24, 32, 36, 37], с.167delT — у евреев ашкенази [34], р.R143W — в некоторых популяциях Западной Африки [27], р.V37I характерна для Юго-Восточной Азии [46], р.W24X широко распространена в Индии [39], мутация сайта сплайсинга IVS1+1G>A (с.-23+1G>A), редкая в других регионах мира, превалирует в Республике Саха (Якутия) [22].

В связи с тем, что мутации в гене *GJB2* являются наиболее важной причиной наследуемых форм потери слуха, во многих странах разработана и успешно применяется молекулярная диагностика случаев тугоухости/глухоты, основанная на поиске у пациентов мутаций в этом гене. В первую очередь, производится скрининг мутации с.35delG, которая является основной причиной потери слуха в европейских странах. В России, до недавнего времени, молекулярная диагностика случаев потери слуха ограничивалась поиском только этой мутации [7, 8, 10, 12, 13, 17–19], что с учётом этнической и географической специфичности мутационного спектра *GJB2* вряд ли может быть адекватной методологией в применении ко всему многонациональному населению страны. Но за последние годы стало возможным внедрение метода ДНК-секвенирования для молекулярной диагностики наследственной тугоухости, в результате которого для ряда российских популяций был выявлен более широкий мутационный спектр гена *GJB2* [3–5, 14, 38].

Исследования, направленные на оценку генетической компоненты в этиологии потери слуха и выявление наиболее значимых факторов, влияющих на распространённость наследуемых форм потери слуха у населения Тувы, были начаты нами в 2010 г. Результаты эпидемиологического анализа нарушений слуха у населения Республики Тыва представлены в работе Бады-Хоо с соавторами [2].

Целью данной работы является оценка спектра мутаций в гене *GJB2* (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха в Республике Тыва.

## Материалы и методы

Республика Тыва расположена в географическом центре Азии на юге Восточной Сибири и граничит с Монголией, Красноярским краем, Иркутской областью, Республиками Хакасия, Бурятия, Алтай. Население Тувы (на 2012 г.) — 309 347 чел. Этнический состав: тувинцы — 81%, русские — 16%, другие национальности — около 3%. В Республике Тыва 17 административно-территориальных районов (кожуунов).

## Характеристика выборки больных

Выборка больных составила 201 человек в возрасте от 2 до 69 лет. Для каждого больного имелся сурдологический диагноз, поставленный на основании отолитического осмотра и результатов пороговой тональной аудиометрии, была заполнена специальная информационная карта, содержащая сведения о поле, возрасте, этнической принадлежности (преимущественно до третьего поколения), месте рождения и проживания, а также составлена родословная, позволяющая уточнить родственные связи пробандов (табл. 1). Больные до 18–20 лет (112 чел.), в основном (95 чел.), являлись учащимися специальной (коррекционной) общеобразовательной школы-интерната I-го вида для незлышащих детей (г.Кызыл). Больные с врождённой (или возникшей в раннем детском возрасте) нейросенсорной тугоухостью III–IV степени и/или глухотой составляли наибо-

льшую часть выборки. На основе наличия или отсутствия информации о средовых факторах, предположительно приведших к потере слуха, обследованные больные были подразделены на две подгруппы: I и II. В подгруппу I включено 147 больных, в анамнезе которых нет указаний на вероятные этиологические факторы потери слуха. Для 54 больных (подгруппа II) имелась информация о средовых факторах, вероятно приведших к потере слуха, таких, как перенесённые в раннем детском возрасте инфекционные заболевания (менингит и другие нейроинфекции), прием антибиотиков, родовая травма, асфиксия новорождённого, недоношенность и низкий вес при рождении, черепно-мозговая травма. Кроме того, в анамнезе 22 больных были указания (в качестве сопутствующего заболевания) на зоб и другие нарушения функции щитовидной железы.

#### Контрольная выборка

Контрольная выборка (121 чел., в возрасте от 9 до 72 лет, женского пола — 81 чел., мужского пола — 40 чел.) представляет собой неродственных тувинцев, не состоящих на учёте у сурдолога, без признаков снижения слуха (кроме пяти человек, указавших на некоторое снижение слуха, возникшее в разном возрасте).

У всех участников исследования после письменного информированного согласия на обследование (у детей — после письменного информированного согласия родителей или опекунов) был осуществлен забор венозной

крови из локтевой вены для выделения образцов ДНК. Исследование одобрено комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (г.Новосибирск).

#### Анализ мутаций в гене *GJB2* (Cx26, MIM121011)

Для выявления мутаций в гене *GJB2* проведено ре-секвенирование всего белок-кодирующего района (экзон 2), экзон 1-интронной области и фланкирующих последовательностей гена *GJB2* в 201 образце ДНК больных и в 121 образце ДНК контрольной выборки. Геномная ДНК экстрагирована из лейкоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом.

Аmplификация кодирующего района (экзон 2), экзон 1-интронной области и фланкирующих последовательностей гена *GJB2* (Cx26) проводилась с помощью ПЦР на амплификаторе «Mastercycler Gradient» («Eppendorf»). Для амплификации белок-кодирующего района (экзон 2) использовались две пары олигонуклеотидных праймеров: 835F: 5'-TGCTTGCTTACCCAGACTCA-3' и 835R: 5'-CCTCATCCCTCTCATGCTGT-3', подобранные с помощью программы Primer Premier 5, либо CX26-F: 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' и CX26-R: 5'-CTGGGCAATGCGTTAAACTGG-3' [29]. Амплификация экзон 1-интронной области осуществлялась с использованием праймеров Ex1-F: 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' и Ex-R: 5'-CTGGGCAATGCGTTAAACTGG-3' [41], либо прай-

Таблица 1

#### Характеристика выборки больных

Количество больных	Общее число больных	201
	Число неродственных семей с больными индивидами *	174
Пол	Мужской	99
	Женский	102
Этнический состав	Тувинцы	192
	Русские	7
	Смешанная этническая принадлежность	2
Место проживания	г. Кызыл	76
	Улуг-Хемский район	27
	Кызылский район	20
	Дзун-Хемчикский район	15
	Другие районы Республики Тыва (n = 14)	63
Тип потери слуха	Нейросенсорный	122
	Смешанный	3
	Недифференцированный тип потери слуха (диагноз "врождённая глухота" или "врождённая глухонмота")	76
Степень потери слуха	III—IV степень и/или глухота	197
	II—III степень	4
Начало манифестация заболевания	Врождённая или раннего начала (до 2—3 лет) потеря слуха	188
	С 5—10 лет	13
Примечание. * — в 154 из 174 неродственных семей было обследовано по одному больному, в 20 семьях — от 2 до 4 больных		

меров Ex1-792F: 5'-GCGTTCGTTCCGGATTGGT-3' и Ex1-2239R: 5'-CGGAAACAGACCCTC-GTGAAGT-3', подобранных с помощью программы Primer Premier 5.

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена *GJB2* осуществлялось методом секвенирования по Сэнгеру на генном анализаторе ABI 3130xl («Applied Biosystems», США) в центре коллективного пользования СО РАН «Геномика» (г.Новосибирск). Анализ ресеквенированных фрагментов гена *GJB2* проводился сопоставлением с референсными нуклеотидными последовательностями M86849.2 и U43932.1 (GenBank) гена *GJB2*.

Для статистического анализа полученных данных применяли точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Генотипы и мутационный спектр гена *GJB2* в исследованной выборке больных

Генотипы, полученные при ресеквенировании всего белок-кодирующего района (экзон 2), экзон 1-интронной области и фланкирующих последовательностей гена *GJB2* у обследованных больных, приведены в табл. 2. Рецессивные мутации p.W172C (с.516G>C), IVS1+1G>A (с.-23+1G>A), с.235delC, p.V37I (с.109G>A), с.299\_300delAT, с.35delG в гомозиготном, компаунд-гетерозиготном или гетерозиготном состоянии выявлены у 70 больных (34,8% обследованных), у 38 из которых (18,9%) обнаружено две *GJB2*-мутации, а у 32 больных (15,9%) — только одна мутация в гене *GJB2* (табл. 2). Полиморфные варианты гена *GJB2*: p.V27I (с.79G>A), p.E114G (с.341A>G), p.V153I (с.457G>A), p.F191L (с.571T>C), p.I203T (с.608T>C), обнаруженные у тувинских больных (табл. 2), часто встречаются в азиатских регионах. У четырёх русских больных, принадлежащих к двум неродственным семьям (всего обследовано 7 русских больных из пяти неродственных семей) выявлена характерная для европейцев мутация с.35delG в гомо- (2 чел.) и гетерозиготном (2 чел.) состояниях.

У обследованных тувинских пациентов мутационный спектр гена *GJB2* представлен пятью мутациями — p.W172C, IVS1+1G>A, с.235delC, p.V37I и с.299\_300delAT, среди которых преобладают мутации p.W172C и IVS1+1G>A: доля p.W172C среди всех мутантных хромосом обследованных тувинских пациентов составляет 51,49%, IVS1+1G>A — 38,61%, а доля мутаций с.235delC, p.V37I, с.299\_300delAT — 4,95%, 2,97% и 1,98% соответственно.

### Мутация p.W172C (с.516G>C)

Несинонимичная однонуклеотидная замена гуанина на цитозин в позиции 516 последовательности кодирующей области гена *GJB2* (с.516G>C) приводит к за-

мене триптофана на цистеин (p.W172C) во втором внеклеточном домене белка коннексина 26 (Cx26) (рис. 1А, Б). Впервые эта мутация (в компаунд-гетерозиготном состоянии с рецессивной мутацией с.235delC) была обнаружена у одного пациента-алтайца в Республике Алтай [38]. В работе Tekin с соавторами сообщается о наблюдении этой мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии у глухого пациента из Монголии [43]. Другие сведения о *GJB2*-мутации p.W172C на сегодняшний момент в литературе отсутствуют. С помощью программы PolyPhen2, согласно используемой модели HumVar [20], позволяющей различать мутации со значительным повреждающим эффектом и остальную вариабельность генома человека, включая «слабо-повреждающие» аллели, мутация p.W172C (с.516G>C) была классифицирована как «возможно повреждающая» (PolyPhen2 score = 0,901) (рис. 1В). Выравнивание аминокислотных последовательностей коннексинов у разных организмов выявило высокую консервативность триптофана в 172 аминокислотной позиции Cx26 (рис. 1Г).

### *GJB2*-генотипы в подгруппах больных

Распределение полученных генотипов по гену *GJB2* в подгруппах I (в анамнезе нет указаний на средовые факторы) и II (есть указания на возможное воздействие средовых факторов) приведено в табл. 2. Между этими подгруппами больных обнаружены статистически значимые ( $p = 0,0235$ ) различия в доле индивидуумов с двумя *GJB2*-мутациями (22,4% и 9,3% в подгруппах I и II соответственно), в то время как доли индивидуумов с одной *GJB2*-мутацией (15,0% и 18,5% в подгруппах I и II соответственно) значимых различий не наблюдалось ( $p = 0,340$ ) (табл. 2).

### Частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *GJB2* в контрольной выборке тувинцев

В контрольной выборке тувинцев ( $n = 121$ ) обнаружено 14 индивидуумов, гетерозиготных по рецессивным *GJB2*-мутациям: p.W172C (6 чел.), IVS1+1G>A (5 чел.), и p.V37I (3 чел.). Кроме того, у значительной части тувинцев были выявлены полиморфные варианты гена *GJB2* (p.V27I, p.E114G, p.V153I и p.F191L), характерные для азиатских регионов [24, 32, 36, 37]. Суммарная частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций в гене *GJB2* в изученной выборке тувинцев составила 11,57% (14/121), в том числе: p.W172C — 4,96% (6/121), с.IVS1+1G>A — 4,13% (5/121) и p.V37I — 2,48% (3/121). Трое из пяти индивидуумов, указавших при опросе на некоторое снижение слуха, но не состоявших на сурдологическом учёте, оказались гетерозиготными по мутациям p.W172C, IVS1+1G>A и p.V37I.

**Распределение генотипов гена *GJB2*,  
выявленных у обследованных больных и в контрольной выборке тувинцев**

Генотипы		Обследованные больные			Контрольная вы- борка тувинцев (n = 121)
		Общая выборка больных (этническая принадлежность) (n = 201)	Подгруппа I (n = 147)	Подгруппа II (n = 54)	
Генотипы с двумя мутация- ми в гене <i>GJB2</i>	p.W172C/p.W172C	17 (тув.)	17	—	—
	IVS1+1G>A/IVS1+1G>A	6 (тув.)	4	2	—
	IVS1+1G>A/p.W172C	6 (тув.)	4	2	—
	c.235delC /p.W172C	3 (тув.)	3	—	—
	c.299_300delAT/p.W172C	2 (тув.)	2	—	—
	IVS1+1G>A/c.299_300delAT	1 (тув.)	—	1	—
	p.V37I/c.235delC	1 (тув.)	1	—	—
c.35delG/c.35delG	2 (рус.)	2	—	—	
Общее число индивидуумов с двумя мутациями <i>GJB2</i> (%)		38 (18,9%)	33 (22,4%) *	5 (9,3%) *	—
Генотипы с одной мутацией в гене <i>GJB2</i>	p.V27I/p.W172C	1 (тув.)	—	1	—
	p.W172C/wt	6 (тув.)	5	1	6
	IVS1+1G>A/p.V27I	5 (тув.)	3	2	2
	IVS1+1G>A/p.I203T	1 (тув.)	1	—	—
	IVS1+1G>A/p.V27I+p.E114G	2 (тув.)	1	1	—
	IVS1+1G>A/wt	13 (12 тув., 1 мет.)	8	5 (тув., 1 мет.)	3
	p.V37I/wt	1 (тув.)	1	—	2
	p.V27I/ p.V37I	—	—	—	1
	c.235delC/wt	1 (тув.)	1	—	—
c.35delG/wt	2 (рус.)	2	—	—	
Общее число индивидуумов с одной мутацией <i>GJB2</i> (%)		32 (15,9%) ##	22 (15,0%) #	10 (18,5%) #	14 (11,6%) ##
Общее число индивидуумов с мутациями <i>GJB2</i> (%)		70 (34,8%)	55 (37,4%)	15 (27,8%)	14 (11,6%)
Генотипы с поли- морфны- ми вари- антами гена <i>GJB2</i>	p.V27I/wt	20 (тув.)	15	5	21
	p.V27I+p.E114G/wt	11 (тув.)	9	2	12
	p.V27I/ p.V27I	6 (тув.)	3	3	5
	p.V27I/p.V27I+p.E114G	1 (тув.)	1	—	2
	p.V27I+p.E114G/p.F191L	1 (тув.)	1	—	—
	p.V27I/ p.F191L	1 (тув.)	1	—	—
	p.V27I+p.E114G/p.V153I	—	—	—	1
p.V153I/wt	1 (тув.)	—	1	—	
Общее число индивидуумов с поли-морфными вариантами		41 (20,4%)	30 (20,4%)	11 (20,4%)	41 (33,9%)
Нормаль- ный geno- тип по ге- ну <i>GJB2</i>	wt/wt	90 (86 тув., 3 рус., 1 мет.)	62	28	66
Общее количество обследованных		201	147	54	121

Примечание. Подгруппа I — больные без каких-либо указаний в анамнезе на предполагаемый средовой этиологический фактор потери слуха, подгруппа II — больные, у которых в анамнезе такие указания есть (см. в тексте). Патогенные рецессивные мутации в гене *GJB2* выделены жирным шрифтом; тув. — тувинцы, рус. — русские, мет. — смешанная этническая принадлежность. \* — различия между сравниваемыми подгруппами I и II в числе больных с двумя *GJB2*-мутациями статистически значимы ( $p = 0,0235$ ); # — отсутствуют статистически значимые различия между подгруппами I и II в числе больных с одной *GJB2*-мутацией ( $p = 0,340$ ); \*\* — отсутствуют статистически значимые различия в числе индивидуумов с одной *GJB2*-мутацией между выборкой больных (для корректности сопоставления расчёт производился только по тувинским больным) и контрольной выборкой тувинцев ( $p = 0,202$ ).



При сопоставлении доли индивидуумов, гетерозиготных по мутациям в гене *GJB2*, в выборке больных (расчёт проводился по тувинским больным) и в контрольной выборке тувинцев статистически значимых различий не наблюдалось ( $p = 0,2019$ ) (табл. 2).

#### Частота *GJB2*-мутаций у тувинских больных и в контрольной выборке

В табл. 3 представлены частоты мутаций и полиморфных вариантов гена *GJB2* в выборке тувинских больных и в контрольной выборке несвязанных родством тувинцев. Для исключения возможного смещения оценок частоты мутаций в общей выборке тувинских больных за счёт присутствия в ней некоторого числа родственных индивидов, была сформирована выборка неродственных больных (167 чел.). Статистически значимые различия между выборкой неродственных тувинских больных и контрольной выборкой тувинцев получены для мутаций  $p.W172C$  — 0,132 и 0,025 соответственно ( $p < 10^{-4}$ ) и  $IVS1+1G>A$  — 0,108 и 0,021 соответственно ( $p < 10^{-4}$ ) (табл. 3).

#### Обсуждение

В Республике Тыва проведена оценка спектра мутаций в гене *GJB2* (*Cx26*) и их вклада в возникновение потери слуха в выборке больных с врождённой или возникшей в раннем возрасте нейросенсорной тугоухостью тяжелой степени / глухотой, рассматриваемой в качестве наиболее адекватной когорты для оценки генетиче-

ской компоненты потери слуха, и проанализирована распространённость мутаций в гене *GJB2* в контрольной выборке тувинцев.

#### Специфика мутационного спектра в гене *GJB2* у коренного населения Республики Тыва

Мутационный спектр гена *GJB2* у обследованных тувинцев с потерей слуха ограничен пятью мутациями ( $p.W172C$ ,  $IVS1+1G>A$ ,  $c.235delC$ ,  $p.V37I$  и  $c.299_300delAT$ ). Суммарная доля мутаций  $p.W172C$  и  $IVS1+1G>A$  ( $n = 91$ ) составляет 90,1% среди всех обнаруженных мутантных хромосом ( $n = 101$ ) (табл. 3), таким образом, вероятно, эти *GJB2*-мутации являются основными (мажорными) для представителей коренного населения Тувы.

Существенное преобладание мутаций  $p.W172C$  и  $IVS1+1G>A$  в мутационном спектре гена *GJB2* у тувинцев позволяет предположить роль эффекта основателя в происхождении этих мутаций, а их широкая распространённость по всей территории Тывы (рис. 2) может косвенно свидетельствовать об относительно давнем возникновении мутаций  $p.W172C$  и  $IVS1+1G>A$  в популяции коренного населения Республики Тыва. Мутация  $p.W172C$  была ранее обнаружена только в Республике Алтай [38] и в Монголии [43], граничащих с Республикой Тыва. Высокая частота мутации  $p.W172C$  у тувинцев, встречаемость этой мутации на территории Алтая и Монголии, её отсутствие в других регионах мира и тот факт, что современные коренные жители Алтая, Тывы и Монголии, в той или иной степени, являются потомками древних кочевых тюрко- и монголоязычных племен, мигриру-

Таблица 3

Частоты мутаций и полиморфных вариантов гена *GJB2* у тувинских больных и в контрольной выборке тувинцев

Мутация / полиморфный вариант	Число мутантных аллелей у 192 тувинских больных (у 167 неродственных больных)	Частота мутантного аллеля у 192 тувинских больных (у 167 неродственных больных)	Число мутантных аллелей в контрольной выборке тувинцев ( $n = 121$ )	Частота мутантного аллеля в контрольной выборке тувинцев ( $n = 121$ )
<b>p.W172C</b>	52 (44)	0,135 * (0,132 *)	6	0,025 *
<b>IVS1+1G&gt;A</b>	39 (36)	0,102 ** (0,108 **)	5	0,021 **
c.235delC	5 (5)	0,013 (0,015)	—	—
c.299_300delAT	3 (2)	0,008 (0,006)	—	—
p.V37I	2 (2)	0,005 (0,006)	3	0,012
Всего мутантных хромосом	101 (89)	0,263 (0,266)	14	0,058
p.V27I	40 (38)	0,104 (0,114)	36	0,149
p.V27I+p.E114G	15 (12)	0,039 (0,036)	15	0,062
p.I203T	1 (1)	0,003 (0,003)	—	—
p.F191L	2 (2)	0,005 (0,006)	—	—
p.V153I	1 (1)	0,003 (0,003)	1	0,004
Всего хромосом	384 (334)		242	

Примечание. Патогенные рецессивные мутации в гене *GJB2* выделены жирным шрифтом; \* — статистически значимые различия в частоте мутации  $p.W172C$  между выборкой больных и контрольной выборкой тувинцев ( $p < 10^{-4}$ ); \*\* — статистически значимые различия в частоте мутации  $IVS1+1G>A$  между выборкой больных и контрольной выборкой тувинцев ( $p < 10^{-4}$ )

ющих в прошлом по территории Центральной Азии [9, 15, 16], — все эти факты позволяют выдвинуть гипотезу о возникновении мутации р.W172C и ведущей роли эффекта основателя в её распространённости на территории современной Республики Тыва и географически близких регионах.

Выраженный эффект основателя, приведший к уникально высокой частоте мутации IVS1+1G>A у якутов, коренного населения Республики Саха (Якутия), был недавно показан при реконструкции гаплотипов хромосом, несущих эту мутацию, что позволило также ориентировочно оценить время её возникновения в Якутии (~800 лет) [22]. Реконструкция гаплотипов хромосом с IVS1+1G>A у тувинцев, принадлежащих, как и якуты, к одной (тюркской) языковой семье и имеющих с ними общие этапы этногенеза [1, 6, 9], вероятно, позволит уточнить регион происхождения мутации IVS1+1G>A.

#### **Вклад мутаций в гене *GJB2* в этиологию потери слуха у населения Республики Тыва**

У 34,8% (70 чел.) обследованных больных обнаружены рецессивные мутации в гене *GJB2*, однако, только 38 из них (18,9%) имели две *GJB2*-мутации, в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии (табл. 2). Подавляющая часть обследованных больных (192 из 201) представлена тувинцами, поэтому полученные данные о вкладе мутаций в гене *GJB2* в этиологию потери слуха, в целом, соответствуют сведениям об относительно меньшей доле случаев *GJB2*-обусловленной потери слуха в азиатских популяциях по сравнению с европейскими [26, 32, 43, 49].

#### **Необходимость генетического тестирования в более широкой категории больных с потерей слуха**

Потенциальные средовые этиологические факторы (перенесённые инфекции, осложнения в родах, низкий вес при рождении и т.д.) и дополнительные клинические признаки ранее часто являлись критерием, исключающим проведение генетического тестирования на наличие мутаций в гене *GJB2* у пациентов с потерей слуха. В нашей работе у больных из Республики Тыва были обнаружены мутации в гене *GJB2* как в подгруппе I (больные без указаний на средовые этиологические факторы потери слуха), так и в подгруппе II (больные с отягощённым анамнезом). Эти данные подтверждают мнение современных исследователей о необходимости проведения генетической диагностики мутаций в гене *GJB2* в более широкой категории больных с потерей слуха [11, 30, 40, 45, 48].

#### **Группа больных, имеющих одну *GJB2*-мутацию**

Ранее, во многих исследованиях было показано, что у определённой доли больных с потерей слуха выявляется только одна рецессивная *GJB2*-мутация, и причины потери слуха у таких больных остаются неясными. В Республике Тыва мы не выявили достоверно значи-

мых различий в числе индивидуумов с одной *GJB2*-мутацией в выборке тувинских больных (29/192 — в общей выборке, 27/167 — в группе неродственных больных) с числом гетерозиготных носителей *GJB2*-мутаций в контрольной выборке тувинцев (14/121) (табл. 2). Можно предположить, что определённая часть больных с одной *GJB2*-мутацией также являются случайными гетерозиготными носителями *GJB2*-мутаций, и потеря слуха у них напрямую не связана с наличием одной копии мутации в гене *GJB2*. Ожидаемое количество таких случайных гетерозиготных носителей *GJB2*-мутаций в выборке больных можно оценить на основе суммарной частоты гетерозиготного носительства *GJB2*-мутаций, обнаруженной в контрольной выборке несвязанных родством тувинцев (0,116 = 14/121) (табл. 2). При таком подходе, ожидаемое число индивидуумов с одной *GJB2*-мутацией в группе неродственных тувинских больных, не имеющих биаллельных *GJB2*-мутаций ( $n = 167 - 31 = 136$ ), составило 16 чел. ( $136 \times 0,116 = 15,8$ ) и, таким образом, в анализируемой группе тувинских больных наблюдается определённый «избыток» реального числа гетерозиготных по *GJB2*-мутациям больных по сравнению с ожидаемым (27 и 16,  $p < 0,05$ ). Анализ родословных больных с одной *GJB2*-мутацией показал, что у существенной части больных, гетерозиготных по *GJB2*-мутациям, имеются близкие родственники (один или оба родителя, братья, сёстры) с потерей слуха (семейные случаи), что может свидетельствовать об участии каких-либо генетических факторов в возникновении патологии слуха у таких больных. Так, например, это могут быть невыясненные пока нарушения регуляторных структур гена *GJB2*, обусловленные тяжёлыми делециями в близлежащих участках хромосомы 13 [47], присутствие которых не анализировалось в рамках данной работы, а также мутации в других генах.

#### **«Сх26-негативные» больные**

У существенной части обследованных больных (131 чел.), так называемых «Сх26-негативных» больных, мутации в гене *GJB2* (Сх26) не были выявлены. У 28 таких больных имеются близкие родственники (один или оба родителя и/или братья, сестры) с потерей слуха [35]. Таким образом, потеря слуха у определённой части «Сх26-негативных» больных может определяться другими, нежели мутации в гене *GJB2*, генетическими факторами. Одним из вероятных генов-кандидатов является ген *SCL26A4* (7q22-q31), кодирующий трансмембранный белок пендрин — многофункциональный анионный транспортер, который экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек [33]. Мутации в гене *SCL26A4* (MIM 605646) могут приводить к несиндромальной потере слуха (DFNB4, MIM 600791). У пациентов с DFNB4 часто наблюдается расширение вестибулярного водопровода (EVA, enlarged vestibular aqueduct) и/или дисплазия Мондини (Mondini

dysplasia). Мутации в гене *SCL26A4* могут также приводить к некоторым формам синдрома Пендреда (MIM 274600) — заболевания, проявляющегося зобом и потерей слуха [25]. Кроме того, в литературе описаны редкие случаи потери слуха, обусловленной сегрегацией мутаций генов *GJB2* и *SCL26A4* в семьях с нарушениями слуховой функции [23, 28]. Так, у одного из членов большой семьи с близкородственными браками из Туниса выявлено сочетанное присутствие двух копий мутации p.E47X в гене *GJB2* и одной мутации c.451delG в гене *SCL26A4* у [23], а у больного из Китая — уникальное сочетание двух биаллельных мутаций (p.T86R и c.299\_300delAT) в гене *GJB2* и двух биаллельных мутаций (p.T410M и p.A360V) в гене *SCL26A4* [28]. Индивидуальный патогенетический эффект мутаций каждого из этих генов и их возможное аддитивное негативное воздействие на слуховую функцию оценить пока сложно из-за редкой встречаемости таких случаев. У 22 обследованных больных с потерей слуха из Республики Тыва, в качестве сопутствующего заболевания, были выявлены нарушения функции щитовидной железы (зоб разной степени, гипотиреоз и др.). У девяти таких больных были обнаружены мутации в гене *GJB2*: у двух — две *GJB2*-мутации (генотипы IVS1+1G>A/IVS1+1G>A и IVS1+1G>A/p.W172C), семь индивидумов оказались гетерозиготными по *GJB2*-мутациям (6 — с генотипом IVS1+1G>A/wt, 1 — с генотипом p.W172C/wt). У восьми больных с потерей слуха и нарушениями функции щитовидной железы имелись близкие родственники с нарушениями слуха (семейные случаи потери слуха).

Выявление семейных (наследуемых) случаев «Cx26-негативной» потери слуха в Республике Тыва является прямым свидетельством наличия других, пока неустановленных, генов, ассоциированных с этой патологией. Таким образом, доля больных с потерей слуха, обусловленной наличием двух рецессивных мутаций в гене *GJB2* (18,9%), является минимальной оценкой генетической компоненты в этиологии потери слуха у населения Тувы, величина которой, вероятно, может быть больше за счёт других, пока неустановленных, генетических факторов.

### Список литературы

1. Алексеев А.Н. Древняя Якутия. Неолит и эпоха бронзы. — Новосибирск: Изд-во Института археологии и этнографии СО РАН, 1996. — 143 с.
2. Бады-Хоо М.С., Посух О.Л., Зоркольева И.В. и др. Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва Сообщение I. Эпидемиология нарушений слуха в Республике Тыва // Медицинская генетика. — 2014. — Т. 13, №1. — С. 17—26.
3. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А. и др. Мутации гена коннексина 26 (GJB2) у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухостью в Республике Саха (Якутия) // Вестник оторинолар. — 2008. — №5. — С. 23—28.
4. Блинец 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. — Т. 48, №1. — С. 112—124.
5. Божкова В.П., Хашаев З.Х., Магомедов Ш.М. Изучение наследственных нарушений слуха у детей Северного Кавказа // Фундаментальные исследования. — 2011. — №5. — С. 23—27.
6. Гоголев А.И. Этническая история народов Якутии (до начала XX в.). — Якутск: Изд-во ЯГУ, 2004. — 104 с.
7. Журавский С.Г., Иванов С.А., Тараскина А.Е. и др. Распространение «глухой» мутации 35delG гена GJB2 среди здорового населения Северо-Западного региона России // Медицинский академический журнал. — 2009. — Т. 9. — С. 41—45.
8. Зинченко (Мамедова) Р.А., Галкина В.А., Ельчинова Г.И. и др. Распространенность и молекулярно-генетическое типирование несиндромальной нейросенсорной тугоухости в республике Чувашия // Генетика. — 2003. — Т. 39, №9. — С. 1275—1284.
9. Маннай-оол М.Х. Тувинцы: происхождение и формирование этноса. — Новосибирск: Наука, 2004. — 166 с.
10. Маркова Т.Г., Мегрелишвили С.М., Зайцева Н.Г. и др. ДНК-диагностика при врожденной и ранней детской тугоухости/глухоте // Вестник оторинолар. — 2002. — №6. — С. 12—15.
11. Маркова Т.Г. Генодиагностика и профилактика наследственных форм тугоухости: несиндромальная нейросенсорная тугоухость // Рос. оторинолар. — 2007. — №2. — С. 55—62.
12. Маркова Т.Г., Поляков А.В., Кунельская Н.Л. Клиника нарушений слуха, обусловленных изменениями в гене коннексина 26 // Вестник оторинолар. — 2008. — №2. — С. 4—9.
13. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н. и др. Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей, страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью // Медицинская генетика. — 2002. — Т. 1, №6. — С. 290—294.
14. Осетрова А.А., Шаронова Е.И., Российская Т.Г. и др. Изучение генетических причин врожденной и ранней детской тугоухости в специализированных школах для детей с нарушением слуха в Кировской области // Медицинская генетика. — 2010. — №9. — С. 30—40.
15. Потапов Л.П. Этнический состав и происхождение алтайцев. Историко-этнографический очерк. — Л.: Наука, 1969. — 196 с.
16. Сердобов Н.А. История формирования тувинской нации. — Кызыл: Тувинское книжное изд-во, 1971. — 482 с.
17. Хидиятова И.М., Джемилева Л.У., Хабибуллин Р.М. и др. Анализ частоты мутации 35delG в гене коннексина 26(GJB2) у больных с несиндромальной аутосомно-рецессивной глухотой из Башкортостана и в популяциях народов Волго-Уральского региона // Молекулярная биология. — 2002. — Т. 36, №3. — С. 438—441.
18. Шаронова Е.И., Осетрова А.А., Зинченко Р.А. Наследственные нарушения слуха в Кировской области // Якутский медицинский журнал. — 2009. — №2(29). — С. 28—31.
19. Шокарев Р.А., Амелина С.С., Кривенцова Н.В. и др. Генетико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое исследование наследственной тугоухости в Ростовской области // Медицинская генетика. — 2005. — Т. 4, №12. — С. 556—567.
20. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations // Nat. Methods. — 2010. — Vol. 7(4). — P. 248—249.

21. Ballana E., Ventayol M., Rabionet R. et al. Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.crg.es/deafness> (2014).
22. 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. — Vol. 56. — P. 631–639.
23. Ben Said M., Dhoubi H., BenZina Z. et al. Segregation of a new mutation in SLC26A4 and p.E47X mutation in GJB2 within a consanguineous Tunisian family affected with Pendred syndrome // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* — 2012. — Vol. 76(6). — P. 832–836.
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. — Vol. 7. — P. 26.
25. Everett L.A., Glaser B., Beck J.C. et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS) // *Nat. Genet.* — 1997. — Vol. 17(4). — P. 411–422.
26. Gasparini P., Rabionet R., Barbujani G. et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 8. — P. 19–23.
27. Hamelmann C., Amedofu G.K., Albrecht K. et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana // *Hum. Mutat.* — 2001. — Vol. 18. — P. 84–85.
28. Huang S., Han D., Wang G. et al. Sensorineural hearing loss caused by mutations in two alleles of both GJB2 and SLC26A4 genes // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* — 2013. — Vol. 77(3). — P. 379–383.
29. 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. — Vol. 62(4). — P. 792–799.
30. Kenna M.A., Rehm H.L., Robson et al. Additional clinical manifestations in children with sensorineural hearing loss and biallelic GJB2 mutations: who should be offered GJB2 testing? // *Am. J. Med. Genet. A.* — 2007. — Vol. 143A (14) — P. 1560–1566.
31. Kikuchi T., Kimar R.S., Paul D.L. et al. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis // *Anat. Embryol.* — 1995. — Vol. 191. — P. 101–118.
32. Liu X.Z., Xia X.J., Ke X.M. et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population // *Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 111(4–5). — P. 394–397.
33. Mount D.B., Romero M.F. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers // *Pflugers Arch.* — 2004. — Vol. 447(5). — P. 710–721.
34. Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J. et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 339. — P. 1500–1505.
35. Nance W.E., Liu X.Z., Pandya A. Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness // *Lancet.* — 2000. — Vol. 356(9228). — P. 500–501.
36. Ohtsuka A., Yuge I., Kimura S. et al. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation // *Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 112(4). — P. 329–333.
37. Park H.J., Hahn S.H., Chun Y.M. et al. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss // *Laryngoscope.* — 2000. — Vol. 110. — P. 1535–1538.
38. Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V. et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population // *BMC Med. Genet.* — 2005. — Vol. 6(1). — P. 12.
39. Ramchander P.V., Nandur V.U., Dwarakanath K. et al. Prevalence of Cx26 (GJB2) gene mutation causing recessive nonsyndromic hearing impairment in India // *Int. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 5. — P. 241–246.
40. Salvador M.Q., Fox M.A., Schimmenti L.A. et al. Homozygosity for the connexin-26 167delT mutation in an Ashkenazi Jewish family. (Abstract). Annual Meeting, American Society of Human Genetics, Philadelphia, PA // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67 (Suppl. 2). — P. 202.
41. 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. — Vol. 85, №3. — P. 213–216.
42. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V. et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine // *Hum. Genet.* — 2014. — Vol. 133(1). — P. 1–9.
43. 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. — Vol. 74(2). — P. 155–164.
44. Van Camp G., Smith R.J.H. Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://webhost.ua.ac.be/hhh> (2014).
45. Venail F., Roux A.F., Pallares-Ruiz N. et al. Nonsyndromic 35 delG mutation of the connexin 26 gene associated with deafness in syndromic children: two case reports // *Laryngoscope.* — 2004. — Vol. 114(3). — P. 566–569.
46. Wattanasirichaigoon D., Limwongse C., Jariengpraser C. et al. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals // *Clin. Genet.* — 2004. — Vol. 66. — P. 452–460.
47. Wilch E., Azaiez H., Fisher R.A. et al. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression // *Clin. Genet.* — 2010. — Vol. 78(3). — P. 267–274.
48. Wiley S., Choo D., Meinzen-Derr J. et al. GJB2 mutations and additional disabilities in a pediatric cochlear implant population // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* — 2006. — Vol. 70(3). — P. 493–500.
49. Yuan Y., You Y., Huang D. et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China // *J. Transl. Med.* — 2009. — Vol. 7. — P. 79.

## 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

Bady-Khoo M.S.<sup>1,2</sup>, Bondar A.A.<sup>3</sup>, Morozov I.V.<sup>3,4</sup>, Zytsar M.V.<sup>1,4</sup>,  
Mikhalskaya V.Yu.<sup>1,4</sup>, Skidanova O.V.<sup>5</sup>, Barashkov N.A.<sup>6,7,8</sup>,  
Mongush R.Sh.<sup>2</sup>, Omzar O.S.<sup>2</sup>, Tukar V.M.<sup>2</sup>, Posukh O.L.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> – Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>2</sup> – Republican Hospital #3, Kyzyl

<sup>3</sup> – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

<sup>4</sup> – Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk

<sup>5</sup> – Republican Children's Hospital, Kyzyl

<sup>6</sup> – Yakut Scientific Centre of Complex Medical Problems, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Yakutsk

<sup>7</sup> – Institute of Natural Sciences, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

<sup>8</sup> – Academy of Sciences of the Republic of Sakha, Yakutsk

Here we present the results of the hearing loss genetic component study caused by mutations in the *GJB2* (Cx26) gene. The study was conducted in 201 patients from the Republic of Tuva with congenital or early onset severe-profound sensorineural hearing loss. The *GJB2* gene recessive mutations p.W172C (c.516G>C), IVS1+1G>A (c.-23+1G>A), c.235delC, p.V371 (c.109G>A), c.299\_300delAT, c.35delG) in homozygous, compound heterozygous or heterozygous mutation states were identified in 70 patients (34.8% of patients), 38 of whom (18.9%) had two *GJB2*-mutation, and 32 (15.9%) – only one *GJB2*-mutation. Mutational spectrum of the *GJB2* gene in studied Tuvian patients was characterized by the presence of five mutations (p.W172C, IVS1+1G>A, c.235delC, p.V371, and c.299\_300delAT) and *GJB2* gene polymorphic variants p.V271 (c.79G>A), p.E114G (c.341A>G), p.V153I (c.457G>A), p.F191L (c.571T>C), p.I203T (c.608T>C), common in the Asian regions while the only mutation c.35delG characteristic for Caucasians has been found in Russian patients. The frequencies of mutations p.W172C, IVS1+1G>A, c.235delC, p.V371, and c.299\_300delAT among all mutant chromosomes in examined Tuvian patients were 51.49%, 38.61%, 4.95%, 2.97%, and 1.98%, respectively. Total carrier frequency of recessive *GJB2* mutations in Tuvian population sample (n = 121) was 11.57% (p.W172C – 4.96%, IVS1 +1 G>A – 4.13%, p.V371 – 2.48%, respectively). We detected *GJB2* mutations in patients that had a history of various environmental etiological factors, presumably leading to their hearing loss. This strongly suggests the necessity for genetic testing in such group of patients as well. Familial cases of «Cx26-negative» hearing loss identified in the Republic of Tuva suggests the presence of other, yet unidentified, genes associated with this pathology. The proportion of patients with hearing loss due to the presence of two recessive *GJB2* mutations of the gene is 18.9%, which is a minimal estimation of the genetic component in etiology of hearing loss in the Tuva population.

**Key words:** sensorineural hearing loss, *GJB2* (Cx26) gene mutations, the Republic of Tuva