

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041460**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.26**(51) Int. Cl. *C12Q 1/683* (2018.01)  
*C12Q 1/6883* (2018.01)(21) Номер заявки  
**202092667**(22) Дата подачи заявки  
**2020.12.04****(54) СПОСОБ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЛУХОТЫ DFNB103**(31) **2019141020**(32) **2019.12.12**(33) **RU**(43) **2021.06.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-  
ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К.  
АММОСОВА"; ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "ЯКУТСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
КОМПЛЕКСНЫХ МЕДИЦИНСКИХ  
ПРОБЛЕМ" (RU)**

**Находкин Сергей Сергеевич, Терютин  
Федор Михайлович, Готовцев  
Ньургун Наумович, Никанорова  
Алена Афанасьевна, Кларов Леонид  
Александрович, Посух Ольга  
Леонидовна, Хуснутдинова Эльза  
Камилевна, Федорова Сардана  
Аркадьевна (RU)**

(74) Представитель:  
**Винокуров А.А. (RU)**

(56) SECO C.Z. et al.: "Progressive hearing loss and vestibular dysfunction caused by a ho-mozygous nonsense mutation in CLIC5", European Journal of Human Genetics, 2015, том 23, № 2, с. 189-194, см. весь документ, особенно реферат, с. 192-193

BARASHKOV N.A. et al.: "Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G&gt;A in GJB2 gene as a result of founder effect", Journal of human genetics, 2011, том 56, № 9, с. 631-639, см. реферат

GALLEGO-MARTINEZ A. et al.: "Genetic contribution to vestibular diseases", Journal of neurology, 2018, том 265, № 1, с. 29-34, см. с. 32

**RU-C1-2688180  
CN-A-105624796  
WO-A2-2013054200**

(72) Изобретатель:  
**Барашков Николай Алексеевич,  
Пшеничкова Вера Геннадиевна,  
Романов Георгий Прокопьевич,  
Соловьев Айсен Васильевич,**

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и предназначено для выявления мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей наследственную форму глухоты DFNB103 (тип аутосомно-рецессивной глухоты-103). Способ ДНК-диагностики DFNB103 включает детекцию нонсенс-мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, для чего выделяют геномную ДНК, проводят ПЦР-ПДРФ-анализ с использованием следующих оригинальных праймеров: (F) - SEQ ID NO: 1, (R) - SEQ ID NO: 2 - и эндонуклеазой рестрикции Bsc4I. В результате наличия на электрофореграмме фрагмента длиной 293 пн диагностируют носительство патогенного аллеля в гомозиготном состоянии, что соответствует результатам положительной ДНК-диагностики DFNB103. Предлагаемый способ, разработанный на основе полученных результатов многолетних молекулярно-генетических исследований нейросенсорных нарушений слуха на территории Российского Севера, позволяет быстро и с высокой точностью подтвердить аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293), обусловленную нонсенс-мутацией с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5 в различных регионах мира.

**041460**  
**B1**

**041460**  
**B1**

Изобретение относится к области биотехнологии и предназначено для детекции мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей наследственную форму глухоты DFNB103 (тип аутосомно-рецессивной глухоты-103).

По данным OMIM один из вариантов аутосомно-рецессивной глухоты - DFNB103 (OMIM#616042) - ассоциирован только с одной гомозиготной мутацией с.96T>A (p.Cys32\*) гена CLIC5 на хромосоме 6p21 (OMIM\*607293) (см. <https://omim.org/entry/616042>).

Наиболее близким прототипом изобретения является способ идентификации нонсенс-мутации с.96T>A (p.Cys32\*) в гене CLIC5 описанный в исследовании Seco в соавторстве (см. Progressive hearing loss and vestibular dysfunction caused by a homozygous nonsense mutation in CLIC5 / C.Z. Seco, A.M. Oonk, M. Dominguez-Ruiz et al. // Eur. J. Hum. Genet. - 2015. - Vol. 23(2). - P. 189-194. - DOI: 10.1038/ejhg.2014.83).

Ген CLIC5 был идентифицирован в качестве кандидатного гена на участке хромосомы 6 (6p21.1-q15), локализованном методом гомозиготного картирования, при выяснении причин потери слуха в одной турецкой семье, где потомки от близкородственного брака (двоюродные брат и сестра) имели постлингвальную, прогрессирующую потерю слуха (от легкой до тяжелой степени тугоухости). В результате у брата и сестры на хромосоме 6p21.1-q15 был выявлен гомозиготный участок 47,4 Мб, содержащий 247 генов, из которых наиболее вероятным геном-кандидатом являлся ген CLIC5, мутации в котором предположительно являлись причиной потери слуха в данной семье. Дальнейший мутационный анализ гена CLIC5 был проведен с помощью секвенирования по Сэнгеру. Амплификация, включающая экзоны и экзон-интронные области гена CLIC5 (CLIC5A - NM\_016929.4, CLIC5B - NM\_001114086.1), была проведена с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, разработанных с помощью ExonPrimer (см. <http://www.ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>). Амплификацию ПЦР проводили в присутствии стандартных ионных буферов и термостабильного фермента Taq-полимеразы. Амплифицированные фрагменты очищали от компонентов ПЦР на ПЦР-планшетах NucleoFast 96 и/или ExoI/FastAP в соответствии с протоколом изготовителя. Секвенирование проводили с помощью набора ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing V2.0 Ready Reaction и анализировали с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). На наличие трансверсии с.96T>A гена CLIC5 в контрольной выборке лиц (n=111) проводился ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции HpyCH4III, результаты которого анализировали в 1-1,5% агарозном геле, где наличие мутации с.96T>A в гене CLIC5 приводила к потере сайта рестрикции HpyCH4III.

Известное техническое решение является результатом поискового научного исследования и не предназначено для практического применения в рутинной ДНК-диагностике наследственной формы глухоты DFNB103. В последующем в результате скрининга с.96T>A (p.Cys32\*) у 213 пациентов с аутосомно-рецессивной тугоухостью преимущественно голландского и испанского происхождения, а также среди контрольной выборки индивидуумов (n=111) данная мутация не была обнаружена. Авторы предположили, что идентифицированная нонсенс-мутация с.96T>A (p.Cys32\*) гена CLIC5 является уникальной для данной инбредной семьи или же очень редкой. Исходя из этого использование способа выявления мутации с.96T>A (p.Cys32\*) с помощью ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции HpyCH4III в гене CLIC5 для ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103 не целесообразно.

Ген CLIC5 (chloride intracellular channel 5) является одним из новых "генов глухоты", мутации в котором могут быть ассоциированы с несиндромальной аутосомно-рецессивной потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage - <https://hereditaryhearingloss.org/recessive-genes>). CLIC5 является членом семейства белков внутриклеточного канала, которые участвуют в транспорте иона хлорида в различных субклеточных компартментах. Seco в соавторстве (см. Progressive hearing loss and vestibular dysfunction caused by a homozygous nonsense mutation in CLIC5 / C.Z. Seco, A.M. Oonk, M. Dominguez-Ruiz et al. // Eur. J. Hum. Genet. - 2015. - Vol. 23(2). - P. 189-194. - DOI: 10.1038/ejhg.2014.83) обнаружили, что белок CLIC5 широко экспрессируется во многих тканях как плода, так и взрослого человека, причем уровень экспрессии в тканях внутреннего уха плода был в 26 раз выше, чем в печени, где был зафиксирован самый низкий уровень экспрессии данного гена. У мышей мутантной линии jitterbug (jbg), гомозиготных по делеции в гене-ортологе CLIC5, приводящей к отсутствию синтеза белка CLIC5, наблюдались нарушения слуха и вестибулярная дисфункция, обусловленные прогрессирующей дегенерацией сенсорных волосковых клеток. Совокупность этих данных позволила Seco и др. (2015) постулировать ассоциацию гена CLIC5 с нарушениями слуха у человека.

Детальное клинико-генеалогическое изучение выборки GJB2-негативных пациентов из Якутии (Восточная Сибирь, Россия) (см. Анализ спектра и частоты GJB2-мутаций у пациентов с врожденными нарушениями слуха в Республике Саха (Якутия) / В.Г. Пшеникова, Н.А. Барашков, Ф.М. Терютин и др. // Мед. генетика. - 2015. - Т. 14. - № 6 (156). - С. 10-2327; 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) / N.A. Barashkov, V.G. Pshennikova, O.L. Posukh et al. // PLoS One. - 2016. - Vol. 11(5):e0156300. - DOI: 10.1371/journal.pone.0156300; Поиск мутаций в генах GJB6 (Cx30) и GJB3 (Cx31) у глухих пациентов с моноаллельными мутациями гена GJB2 (Cx26) в Якутии / В.Г. Пшеникова, Н.А. Барашков, А.В. Соловьев

и др. // Генетика. - 2017. - Т. 53. - № 3. - С. 705-715. - DOI: 10.7868/S0016675817030109) позволило выявить расширенную семью эвенов с 5 пораженными индивидами с ювенильной потерей слуха неизвестной этиологии (дебют заболевания варьировал от 4 до 8 лет). Анализ родословных показал, что данные пациенты происходят из трех ядерных семей, относящихся к одной родословной. С целью поиска причин потери слуха в этой семье, у пробанда был проведен полноэкзомный анализ (Illumina NextSeq 500). В результате была выявлена ранее не описанная (отсутствует в литературе и в базах данных: OMIM, HGMD, ClinVar) гомозиготная замена с.1121G>A (chr6:45880291C>T\_GRCh37.p13) в 6-м экзоне гена CLIC5 (OMIM\*607293, 6p21.1), приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона p.Trp374\*, терминирующего трансляцию полноразмерного белка CLIC5 (chloride intracellular channel 5, NP\_001107558.1).

Задача, на решение которой направлено заявленное изобретение, является создание способа ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103, обусловленной нонсенс-мутацией с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5.

Технический результат, получаемый при решении поставленной задачи, выражается в ДНК-диагностике наследственной формы глухоты DFNB103 с высокой точностью.

Для решения поставленной задачи способ ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103 (аутосомно-рецессивной глухоты-103), включающий детекцию нонсенс-мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, отличается тем, что для проведения амплификации значимого района 6-го экзона гена CLIC5 используются следующие оригинальные праймеры: (F) - SEQ ID NO: 1, (R) - SEQ ID NO: 2 - с последующим проведением анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы Bsc4I. При наличии фрагмента длиной 293 пн диагностируется носительство патогенного аллеля в гомозиготном состоянии (DFNB103 подтверждается), при наличии фрагментов 293 и 258 пн диагностируется гетерозиготное носительство патогенного аллеля (DFNB103 не подтверждается) и при фрагменте 258 пн диагностируется отсутствие патогенного аллеля (DFNB103 не подтверждается).

Сопоставительный анализ признаков заявленного решения с признаками аналога свидетельствует о соответствии заявленного решения критерию "новизна".

Совокупность признаков изобретения обеспечивает решение заявленной технической задачи, а именно получение молекулярно-генетического способа ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103.

Преимуществом предлагаемого способа перед существующим аналогом является то, что он позволяет быстро и с высокой точностью подтвердить аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293), обусловленной нонсенс-мутацией с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, который разработан на основе полученных результатов многолетних молекулярно-генетических исследований нейросенсорных нарушений слуха на территории Российского Севера и возможно может использоваться и в других регионах мира.

Заявляемое техническое решение иллюстрируется чертежами, где на фиг. 1, представлена область перекрытия оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции нонсенс-мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) в 6-м экзоне гена CLIC5 (размер области составляет 293 пн). Горизонтальными стрелками отмечены прямой и обратный олигодезоксинуклеотидные праймеры. Внизу показана модификация прямого праймера, где пунктирной рамкой выделен нуклеотид - аденин в 1113 положении, заменяемый на цитозин для создания искусственного палиндромного участка сайта рестрикции эндонуклеазой Bsc4I. На фиг. 2 представлена идентификация мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) в 6-м экзоне гена CLIC5: А - фрагменты результатов прямого секвенирования по Сэнгеру: первый фрагмент - норма (с.[wt];[wt]), второй - моноаллельный (гетерозиготный) (с.[1121G>A];[wt]), третий - биаллельный (гомозиготный) (с.[1121G>A];[1121G>A]); Б - электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа для детекции мутации с.1121G>A в трех ядерных семьях (4% агарозный гель). При наличии биаллельной мутации сайт рестрикции отсутствует - 293 пн; при наличии моноаллельной мутации присутствует наличие двух бэндов - 293 и 258 пн; при отсутствии мутации визуализируется один бэнд - 258 пн. Дорожки: 1 - маркер молекулярного веса pUC19 DNA/MspI; 2, 3 и 8 - контроль биаллельной, моноаллельной и без мутации соответственно; 4 (III;2) - отец пробанда 1; 5 (IV;1) - сибс пробанда 1; 6 (IV;2) - пробанд 1; 7 (III;7) - пробанд 2; 9 (III;8), 10 (III;9) и 11 (III;17) - сибсы пробанда 2; 12 (III;18) - пробанд 3; 13 (II;7) - отец пробанда 3; 14 (II;8) - мать пробанда 3; В - родословная трех ядерных семей (состоящих в родстве) с выявленными генотипами по мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5. Условные обозначения: черным цветом обозначены глухие члены семьи, гомозиготные по мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5 (III:7, III:18, III:19, IV:7, IV:8); серым - члены семьи с аутосомно-рецессивной глухотой 1А типа, обусловленной гомозиготным с.[-23+1G>A];[-23+1G>A] (III:17) и компаунд-гетерозиготным с.[-23+1G>A];[35delG] (IV:22) состоянием мутаций гена GJB2 (DFNB1A; OMIM#220290); плюсом внутри символа - члены семьи, имеющие признаки ювенильной формы потери слуха, со слов близких родственников; восклицательным знаком - обследованные лично; пунктиром выделены ядерные семьи, стрелкой и нумерацией сверху обозначены пробанды; красной стрелкой обозначен пробанд, у которого был проведен полноэкзомный анализ; косая линия - брак расторгнут; Mut - мутация с.1121G>A (p.Trp374\*), Wt - норма.

Заявленный способ ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103 осуществляется следующим образом.

1) С информированного согласия на обследование (у детей после информированного согласия родителей или опекунов) осуществляется забор венозной крови из локтевой вены для выделения образцов геномной ДНК.

2) Геномная ДНК выделяется с помощью фенол-хлороформной экстракции, описанный в работе С. Метью (см. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / C.C. Mathew // Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M.Y.L.: Human Press. - 1984. - Vol. 2. - P. 31-34).

3) В дальнейшем полученную ДНК без посторонних примесей (со значениями  $\Delta A_{260}/\Delta A_{280}=1,8-2,0$ ) используют в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции для амплификации значимого района гена CLIC5. Для амплификации участка экзона 6, возможно содержащий вариант с.1121G>A (p.Trp374\*), используются оригинальные последовательности олигонуклеотидов, дизайн которых представлен на фиг. 1: (F) - SEQ ID NO: 1, (R) - SEQ ID NO: 2.

Способ осуществляется с применением стандартного состава реакционной смеси: 2,0 мкл геномной ДНК, соответствующее количество каждого олигонуклеотида, 125 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфата (Promega, USA) помещают в буфер для ПЦР следующего компонента: Буфер ( $\times 10$ ) - 0,8 мкл (67 mM Tris-HCl, pH 8,6-8,8 при 20°C, 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO, 0,041% Tween 20); Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTP) - 0,5 мкл; Праймеры: F - 0,24 мкл и R - 0,142 мкл; термостабильная Taq-полимераза - 0,2 мкл; Деионизированная вода - 5,56 мкл; Бетаин - 5,56 мкл, ДНК (100 нг/мл) - 2,0 мкл. Суммарный объем - 15 мкл. При этом применяют следующий режим амплификации: 1) предварительная денатурация в течение 5 мин при t 95°C, далее 28 циклов со следующими параметрами: 95°C - 45 с, 60°C - 45 с, 72°C - 45 с. После 28-го цикла проводят инкубацию при 72°C в течение 10 мин.

4) После проведения амплификации необходимых фрагментов, для детекции мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5 проводится ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеазы Bsc4I (см. фиг. 1). Реакция проводится согласно протоколу фирмы производителя указанной эндонуклеазы. Результаты ПДРФ-анализа оцениваются методом электрофореза на горизонтальном (15×15) в 4% агарозном геле. Перед нанесением на электрофорез пробы в соотношении 1:5 с краской, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленианола и 15% фикола.

5) Детекцию результатов проводят путем окрашивания гелей бромистым этидием с последующей визуализацией в УФ-свете на трансиллюминаторе. На фиг. 2Б показана электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа для детекции мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, где при наличии фрагмента длиной 293 пн диагностируется носительство патогенного аллеля в гомозиготном состоянии (DFNB103 подтверждается) при наличии фрагментов 293 и 258 пн диагностируется гетерозиготное носительство патогенного аллеля (DFNB103 не подтверждается) и при фрагменте 258 пн диагностируется отсутствие патогенного аллеля (DFNB103 не подтверждается).

Время исследования (от выделения ДНК исследуемого до детекции мутации) составляет 4 дня.

Результативность предлагаемого способа ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103 была проверена на образцах ДНК 238 GJB2-негативного пациента из Якутии (Восточная Сибирь, Россия), обнаруженных в результате прямого секвенирования по Сэнгеру значимого района 6-го экзона гена CLIC5, содержащую мутацию с.1121G>A (p.Trp374\*). В результате проведенной проверки предлагаемого способа на образцах ДНК GJB2-негативных пациентов все генотипы полностью соответствовали результатам ранее полученных с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру гена CLIC5. Мутация с.1121G>A (p.Trp374\*) была обнаружена у 33 (13,8%) индивидов: в гомозиготном состоянии - у 26 пациентов (10,9%), в гетерозиготном - у 7 человек (2,9%). Вклад патогенного варианта с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5 в этиологию нарушения слуха среди GJB2-негативных пациентов составил 10,9%. Таким образом, предлагаемый способ в применении оказался точным и информативным и может быть применим в рутинной ДНК-диагностике при наследственной форме глухоты DFNB103 в различных популяциях мира.

Ниже приведены примеры проведенного способа ДНК-диагностики DFNB103.

Пример 1. Пациентка С.М. (проба ДНК - АБ1037) - пробанд 1 (см. фиг. 2В; IV;2), эвенка, 1998 года рождения, с. Батагай-Алыта Эвено-Бытантайского национального улуса, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя глухота, с детства; инвалид по слуху. Наследственность по глухотеотягощенна (старший брат (IV; 1) с двусторонней тугоухостью, с дебютом потери слуха в 4 года). Обучалась в ГКОУ Республиканской специальной (коррекционной) общеобразовательной школе-интернате II вида для слабослышащих детей (г. Якутск). Нарушение слуха было замечено в 7 лет. Состояла на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины с 2008 по 2014 гг. Клинический диагноз от 02.10.2014 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): двусторонняя глухота (МКБ: Н90.3)/системное недоразвитие речи. В настоящее время пациентка носит слуховой аппарат. Результаты исследований слуха пациентки СМ (№ 1) представлены в табл. 1.

Предлагаемый способ ДНК-диагностики DFNB103 был проведен у 10 членов семьи пробанда 1

(см. фиг. 2). В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видеодокументации), мутация с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5 в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн) была обнаружена у 5 пораженных членов семьи: у пробанда 1 (IV;2), сибса пробанда 1 (IV;1), пробанда 2 (III;7), сибса пробанда 2 (III;17) и пробанда 3 (III;18), что подтверждает диагноз - аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Гетерозиготное носительство мутантной аллели (аллели 293 и 258 пн) было обнаружено у отца пробанда 1 (III;2) и родителей пробанда 3 (II;7 и II;8). У здоровых сибсов пробанда 2 (III;8 и III;9) мутация не была обнаружена (аллель 258 пн). Идентификация мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) в 6-м экзоне гена CLIC5 в случае данного примера приведена в описании фиг. 2.

Продолжительность ДНК-исследования 10 членов семьи пациентки С.М. составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 2. Пациент И.А. (проба ДНК - АБ1050), эвенк, 1995 года рождения, с. Оленек Оленекского эвенкийского национального улуса, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя глухота с детства; инвалид по слуху. Нарушение слуха было замечено в 4 года. Наследственность по глухоте не отягощена. Обучался в ГКОУ Республиканской специальной (коррекционной) общеобразовательной школе-интернате II вида для слабослышащих детей (г. Якутск). Состоял на диспансерном учете (2 раза в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины с 2000 по 2014 гг. Клинический диагноз от 07.10.2014 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): двусторонняя глухота (МКБ: Н90.3)/резидуальная энцефалопатия, компенсированная форма. Системное недоразвитие речи. Ношение слухового аппарата/слухопротезирование с 2006 г. Результаты исследований слуха пациента И.А. (№ 2) представлены в табл. 2.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видеодокументации) искомая мутация с.1121G>A (p.Trp374\*), у пациента И.А. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 3. Пациент С.Е. (проба ДНК: АА6283), эвенк, 1993 года рождения, пгт. Тикси, Булунский улус, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя глухота, с детства; инвалид по слуху. Нарушение слуха было замечено в 7-8 лет. Наследственность по глухоте не отягощена. Обучался в массовой общеобразовательной школе (пгт. Тикси). Состоял на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия), Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины с 2003 по 2009 гг. Клинический диагноз от 29.06.2009 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): двусторонняя сенсоневральная тугоухость III ст. справа, IV ст. слева/резидуальная энцефалопатия, церебрastenический синдром. Ношение слухового аппарата/слухопротезирование с 2006 г. Результаты исследований слуха пациента С.Е. (№ 3) представлены в табл. 3.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видеодокументации) искомая мутация с.1121G>A (p.Trp374\*), у пациента С.Е. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 4. Пациентка О.А. (проба ДНК: АА7602), якутка, 2000 года рождения, с. Тулагино, городской округ г. Якутск, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя глухота, с детства; инвалид по слуху. Наследственность по глухоте неотягощена. Нарушение слуха было замечено в 4 года. Обучалась в специализированной коррекционной общеобразовательной школе-интернате для слабослышащих детей (г. Москва, г. Якутск). С 13 лет обучалась в массовой общеобразовательной школе (с. Тулагино). Состояла на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины с 2005 по 2013 гг. Клинический диагноз от 09.09.2013 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): двусторонняя глухота (МКБ: Н90.3)/резидуальная энцефалопатия с общим недоразвитием речи. 09.12.2011 г. проведена кохлеарная имплантации на оба уха (Клиническая больница № 122 им. Л.Г. Соколова, г. Санкт-Петербург). Результаты исследований слуха пациентки О.А. (№ 4) представлены в табл. 4.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видеодокументации), искомая мутация с.1121G>A у пациентки О.А. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 5. Пациент С.Е.Н. (проба ДНК - АБ3182), якут, 2005 года рождения, г. Нюрба, Нюрбинский улус, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: с детства тугоухость справа, глухота слева; инвалид по слуху. Наследственность по глухоте отягощена по отцу. Нарушение слуха было замечено в 3 года. В настоящее время обучается в ГКОУ Республиканской специальной (коррекционной) общеобразовательной школе-интернате II вида для слабослышащих детей (г. Якутск). С 2011 г. состоит на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины. Клинический диагноз от 22.06.2015 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): сенсоневральная тугоухость IV ст. справа. Глухота слева (МКБ: Н90.3)/задержка речевого развития. Резидуальная энцефалопатия с синдромом дефицита внимания и гиперактивности. 06.07.2015 г. проведена кохлеарная имплантации на левое ухо (Клиническая больница № 122 им. Л.Г. Соколова, г. Санкт-Петербург). Результаты исследований слуха пациента С.Е.Н. (№ 5) представлены в табл. 5.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103 - OMIM\*616042) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видеодокументации) искомая мутация с.1121G>A (p.Trp374\*), у пациента С.Е.Н. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 6. Пациент А.Н. (проба ДНК - АБ2181), якут, 2004 года рождения, г. Якутск, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя тугоухость с детства; инвалид по слуху. Наследственность по глухоте неотягощена. Обучается в массовой общеобразовательной школе (г. Якутск). С 2011 г. состоит на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины. Клинический диагноз от 21.02.2014 г. (основное заболевание/сопутствующие заболевания): двусторонняя сенсоневральная тугоухость IV ст. - Грань глухоты (МКБ: Н90.3)/резидуальная энцефалопатия. 02.10.2014 г. проведена кохлеарная имплантации на левое ухо (Клиническая больница № 122 им. Л.Г. Соколова, г. Санкт-Петербург). Результаты исследований слуха пациента А.Н. (№ 6) представлены в табл. 6.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с по-

мощью системы гель-видео документации), искомая мутация с.1121G>A (p.Trp374\*) у пациента А.Н. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Пример 7. Пациентка Я.С. (проба ДНК - АБ3477), якутка, 2003 года рождения, г. Якутск, Республика Саха (Якутия). Статус по слуху: двусторонняя тугоухость с детства; инвалид по слуху. Наследственность по глухоте не отягощена. Обучается в массовой общеобразовательной школе (г. Якутск). С 2012 г. состоит на диспансерном учете (1 раз в год) в Сурдологопедическом центре ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканская больница № 1 - Национального центра медицины. Клинический диагноз от 27.03.2014 г. (основное заболевание / сопутствующие заболевания): двусторонняя сенсоневральная тугоухость II-IV ст. (МКБ: Н90.3) / ВСД с церебрастенией. Дизартрия. Результаты исследований слуха пациентки Я.С. (№ 7) представлены в табл. 7.

В результате молекулярно-генетического исследования на наличие мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, обуславливающей аутосомно-рецессивную глухоту-103 (DFNB103; OMIM\*607293) предложенным способом ДНК-диагностики DFNB103 (ПЦР-ПДРФ анализ с использованием оригинальной последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы рестрикции Bsc4I с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза в 4%-ном агарозном геле и визуализацией с помощью системы гель-видео документации), искомая мутация с.1121G>A (p.Trp374\*) у пациента Я.С. была обнаружена в гомозиготном состоянии (аллель 293 пн), что подтверждает диагноз аутосомно-рецессивная глухота-103 (DFNB103; OMIM\*607293). Продолжительность ДНК-исследования предлагаемым способом составила 4 дня. Полученный результат верифицирован с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру фрагмента 6-го экзона гена CLIC5. Рекомендуются ДНК-тестирование близких родственников (супруг/супруга, родители/дети, братья/сестры и др.) и консультация врача-генетика при планировании семьи.

Таким образом, использование молекулярно-генетического способа ДНК-диагностики нейросенсорных нарушений слуха позволяет быстро и с высокой точностью подтвердить DFNB103 (аутосомно-рецессивная глухота-103; OMIM\*607293), обусловленной нонсенс-мутацией с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5. Техническое решение разработано на основе результатов многолетних молекулярно-генетических исследований нейросенсорных нарушений слуха на территории северных регионов Российской Федерации.

Таблица 1

Результаты исследований слуха пациентки С.М. (№ 1)

Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей (25.11.2011)	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
29.07.2008	86 дБ	86 дБ	-	-	Без особенностей	с.[Wt];[Wt]
06.10.2009	95 дБ	98 дБ	-	-		
18.10.2011	101 дБ	101 дБ	A	A		
25.07.2012	98 дБ	105 дБ	-	-		
01.10.2014	98 дБ	103 дБ	A	A		

Таблица 2

## Результаты исследований слуха пациента И.А. (№ 2)

Дата проведения	Аудиометрия (по воздушной проводимости)		Импедансометрия		КТ-височных костей (25.11.2011)	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
27.07.2000	95 дБ - (Реагтометрия)	98 дБ - (Реагтометрия)	-	-	Правосторонний хронический средний отит. Единая полость преддверия и наружного полукружного канала справа. Гипоплазия наружного полукружного канала слева. Умеренное расширение канала лицевого нерва с обеих сторон. Расширение внутреннего слухового прохода с обеих сторон.	с.[79G>A]; [79G>A] – доброкачественный вариант не имеющий клинического значения в биаллельном состоянии
	100 дБ + (Реагтометрия)	100 дБ + (Реагтометрия)	-	-		
27.07.2000	хлопки +; погрем-ушка +; барабан + (Игровая)	хлопки +; погрем-ушка +; барабан + (Игровая)	-	-		
07.12.2001	90 дБ +	90 дБ +	В	В		
08.02.2005	41 дБ	68дБ	А	А		
26.09.2006	73 дБ	80 дБ	А	А		
31.10.2008	91 дБ	88 дБ	А	А		
2009-2013	IV ст.	IV ст.	А	А		
05.02.2014	106 дБ	107 дБ	А	А		

Таблица 3

## Результаты исследований слуха пациента С.Е. (№ 3)

Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
20.06.2003	60 дБ	73 дБ	-	-	Нет данных	с.[Wt];[Wt]
25.06.2004	67 дБ	72 дБ	-	-		
05.08.2005	76 дБ	70 дБ	А	А		
07.06.2006	91 дБ	80 дБ	-	-		
10.12.2007	101 дБ	95 дБ	-	-		

Таблица 4

## Результаты исследований слуха пациентки О.А. (№ 4)

Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей (18.02.2008)	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
30.08.2006	51 дБ	50 дБ	А	А	Пневматизация ВК сохранена. Ячейки дифференцируются отчетливо, стенки тонкие. Барабанные полости не изменены, пневматизированы. Слуховые косточки правильной формы, прослеживаются отчетливо. Элементы внутреннего уха дифференцируются с обеих сторон, симметричные.	с.[Wt];[Wt]
05.10.2007	71 дБ	66 дБ	А	А		
23.01.2008	70 дБ	68 дБ	А	А		
14.07.2009	98 дБ	97 дБ	А	А		
16.07.2010	105 дБ	Abs	А	А		
26.06.2012	Abs	Abs	А	А		
06.11.2013	Abs	Abs	А	А		

Таблица 5

## Результаты исследований слуха пациента С.Е.Н. (№ 5)

Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей (13.12.2014)	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
03.11.2011	52 дБ	56 дБ	A	A	Высокое расположение яремных вен с обеих сторон	с.[Wt];[Wt]
19.11.2014	97 дБ	103 дБ	A	A		
13.07.2015	82 дБ	93 дБ	A	A		

Таблица 6

## Результаты исследований слуха пациента А.Н. (№ 6)

Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
25.11.2011	57 дБ	58 дБ	A	A	Нет данных	с.[-23+1G>A];[Wt] - мутация сайта сплайсинга в некодирующей области гена GJB2 (экзон 1 и фланкирующие последовательности гена GJB2) в моноаллельном состоянии
11.04.2012	80 дБ	72 дБ	A	A		
22.01.2013	80 дБ	82 дБ	A	A		
21.02.2014	72 дБ	92 дБ	A	A		

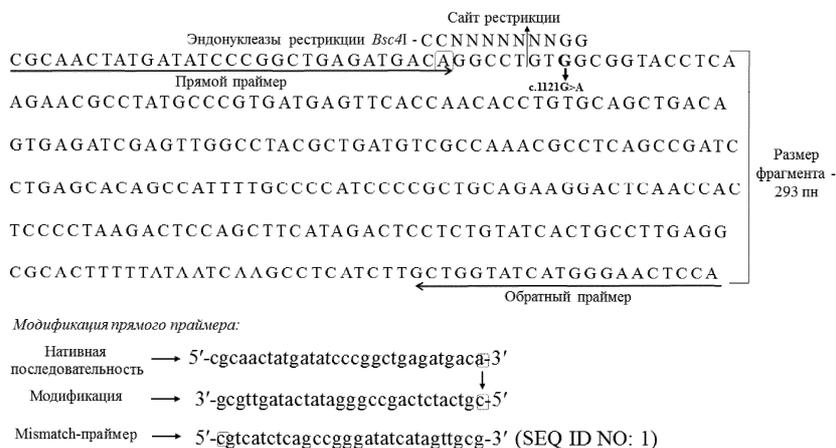
Таблица 7

## Результаты исследований слуха пациентки Я.С. (№ 7)

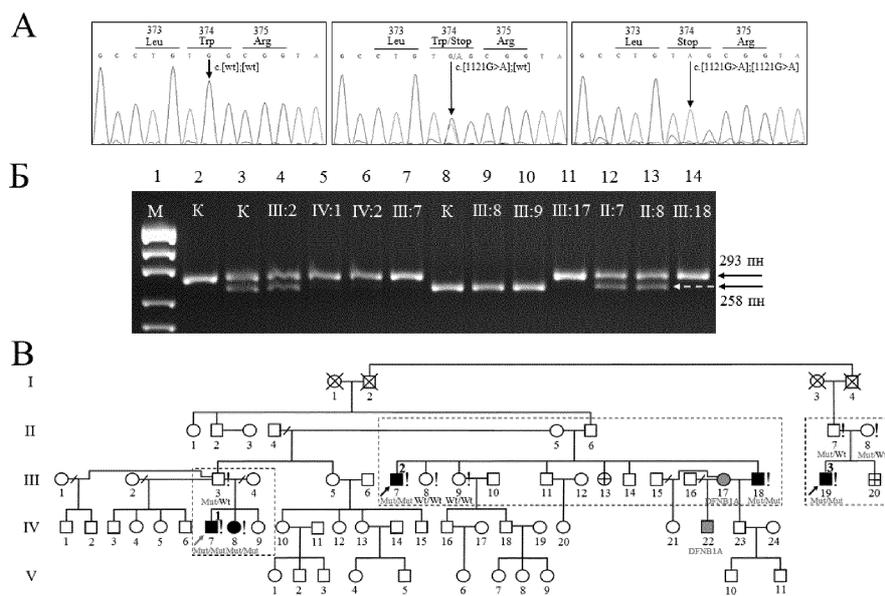
Дата проведения	Аудиометрия		Импедансометрия		КТ-височных костей	ДНК-диагностика АРГ 1А (GJB2-генотип)
	AD	AS	AD	AS		
01.02.2012	60 дБ	57 дБ	A	A	Нет данных	с.[Wt];[Wt]
25.06.2013	82 дБ	83 дБ	A	A		
21.02.2014	55 дБ	57 дБ	A	A		

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ ДНК-диагностики наследственной формы глухоты DFNB103, включающий детекцию нон-сенс-мутации с.1121G>A (p.Trp374\*) гена CLIC5, отличающийся тем, что для проведения амплификации значимого района 6-го экзона гена CLIC5 используют следующие оригинальные праймеры: (F) SEQ ID NO: 1, (R) SEQ ID NO: 2 - с последующим проведением анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы Bsc4I и при наличии фрагмента длиной 293 пн диагностируют носительство патогенного аллеля в гомозиготном состоянии, при котором DFNB103 подтверждается, при наличии фрагментов 293 и 258 пн диагностируют гетерозиготное носительство патогенного аллеля, при котором DFNB103 не подтверждается, при наличии фрагмента 258 пн диагностируют отсутствие патогенного аллеля, при котором DFNB103 не подтверждается.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2