На правах рукописи

Данильченко Валерия Юрьевна

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПОТЕРИ СЛУХА В ПОПУЛЯЦИЯХ РЯДА РЕГИОНОВ СИБИРИ

1.5.7. – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный руководитель:	**Посух Ольга Леонидовна** к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека, ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
Официальные оппоненты:	**Максимова Юлия Владимировна** д.м.н., профессор, заведующая кафедрой медицинской генетики и биологии, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск
	Щербаков Дмитрий Юрьевич д.б.н., доцент, заведующий лабораторией геносистематики, ФГБНУ «Лимнологический институт СО РАН», г. Иркутск
Ведущее учреждение:	ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (ФГБНУ Томский НИМЦ), г. Томск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 10

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); факс: +7(383) 333-12-78 e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: https://www.icgbio.ru/

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Актуальной медико-социальной проблемой является потеря слуха, вызываемая как средовыми, так и генетическими факторами, которыми обусловлено около половины всех случаев врожденной (или раннего проявления) глухоты. Несиндромальная (изолированная) наследственная глухота, являясь моногенным заболеванием, характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: уже картировано около 160 локусов и идентифицировано не менее 120 генов, ассоциированных с потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage: https://hereditaryhearingloss.org/).

Известна широкая этногеографическая вариабельность в распространенности различных форм наследуемой глухоты. Мутации в гене *GJB2* (13q12.11, MIM 121011) вносят наиболее значимый патогенетический вклад в этиологию потери слуха во многих популяциях мира (до 50% случаев в Европе). Вторым по значимости, по крайней мере, для ряда азиатских популяций, является ген *SLC26A4* (7q22.3, MIM 605646). Этот ген кодирует трансмембранный транспортный белок пендрин (pendrin), который экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек и участвует в транспорте различных ионов. Мутации в гене *SLC26A4* приводят к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха (DFNB4) и некоторым формам синдрома Пендреда (Pendred Syndrome) – заболевания, определяемого потерей слуха и развитием зоба. У пациентов с *SLC26A4*-мутациями часто наблюдается аномалия костного лабиринта внутреннего уха – расширенный водопровод преддверия (EVA, Enlarged vestibular aqueduct). Существенно меньше данных о распространенности генетических форм потери слуха, определяемых мутациями других генов, и для многих регионов мира такие сведения полностью отсутствуют.

Важной и актуальной задачей для медицинской генетики является молекулярно-генетический анализ случаев наследуемой глухоты, этиология которой после тестирования наиболее значимых «генов глухоты» остается неясной. В последнее время для решения этой проблемы применяются новейшие методы геномных исследований (NGS, Next Generation Sequencing), в частности, полноэкзомное секвенирование (WES, Whole Exome Sequencing).

Экстремальная генетическая гетерогенность наследуемой нейросенсорной тугоухости значительно затрудняет разработку универсальной молекулярной диагностики для этой патологии. Диагностические панели генов должны быть адаптированы к специфике наследуемых форм потери слуха в различных регионах. Кроме того, пока относительно мало известно о распространенности патогенетических вариантов многих «генов глухоты» в той или иной популяции. Выявление наиболее частых (мажорных) мутаций в генах, вовлеченных в потерю слуха, является актуальной задачей как для оценки генетического риска и медико-генетического консультирования отягощенных семей, так и для разработки наиболее эффективных методов молекулярной диагностики этой патологии.

Цель работы: Выявление молекулярно-генетических причин наследственных форм потери слуха и анализ их распространенности у коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Задачи:

1. Оценка патогенетического вклада мутаций гена *SLC26A4* в выборке больных с потерей слуха невыясненной этиологии в Республиках Тыва и Алтай.

2. Выявление особенностей распространенности мутаций гена *SLC26A4* на территории Тувы и Алтая.

3. Поиск генов, ассоциированных с потерей слуха, с применением метода полноэкзомного секвенирования, в семьях с глухотой невыясненной этиологии.

4. Сравнительный анализ мутационного спектра генов *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1*, *MT-RNR1*, ассоциированных с потерей слуха, и их патогенетического вклада в этиологию нарушений слуха в популяциях коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Научная новизна исследования. На основе проведенного молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у пациентов с потерей слуха неустановленной этиологии из Республик Тыва и Алтай впервые охарактеризовано аллельное разнообразие этого гена у тувинцев и алтайцев. Выявлены уже известные патогенетические варианты c.170C>A (p.Ser57*), c.919-2A>G, c.2027T>A (p.Leu676Gln), c.2034+1G>A, c.2168A>G (p.His723Arg), новый вариант c.1545T>G (p.Phe515Leu), а также ряд уже известных и новых полиморфных (нейтральных) вариантов. Обнаружены существенные различия патогенетического вклада мутаций гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха: 28.2% – для тувинцев и 4.3% – для алтайцев. Наиболее распространенной у тувинцев является мутация c.919-2A>G (ее частота у больных с потерей слуха – 69.3%, частота гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%). Впервые показано, что генетическое окружение (гаплотипы) участка хромосомы 7, включающего эту мутацию, характеризуется высокой специфичностью и сходством, что подтверждает гипотезу о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности c.919-2A>G в изучаемом регионе. У алтайских пациентов с потерей слуха неясной этиологии, методом полноэкзомного секвенирования, впервые в России примененного для поиска генетических причин глухоты, был идентифицирован новый вариант c.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF*, ранее уже известного в ассоциации с потерей слуха, и новый вариант c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*, ассоциация которого с потерей слуха установлена впервые. Впервые, на основе молекулярно-генетического анализа генов *GJB2, SLC26A4, OTOF, RAI1, MT-RNR1,* получены суммарные сравнительные оценки генетической компоненты в этиологии потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (50.5% – у тувинцев и 34.5% – у алтайцев) и выявлены мутации, наиболее значимые для создания регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха в изучаемых регионах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Детальные данные о спектре патогенетических и полиморфных вариантов гена *SLC26A4* и их частотах в популяциях коренного населения Тувы и Алтая, полученные в результате настоящего исследования, дополняют мировые данные об аллельном разнообразии этого гена. Данные о специфике распространенности патогенетических вариантов в исследованных генах *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1* в популяциях коренного населения Тувы и Алтая вносят существенный вклад в характеристику их генетической структуры. На основе полученных данных, молекулярно-генетический диагноз можно установить для существенной доли обследуемых пациентов с потерей слуха (50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев). Полученные данные могут быть использованы для медико-генетического консультирования семей, отягощенных патологией слуха. Информация о спектре и патогенетическом вкладе мутаций генов *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1*, *MT-RNR1* у тувинцев и алтайцев актуальна для разработки специфичной ДНК-диагностики наследуемой глухоты для коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Патогенетический вклад гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха и спектр мутаций существенно различаются для коренных жителей Республик Тыва (28.2%) и Алтай (4.3%).
2. Патогенетический вклад мутаций c.1111G>C (ген *OTOF*) и c.5254G>A (ген *RAI1*), обнаруженных при помощи экзомного секвенирования у алтайских пациентов, составляет 4.3% и 10.8%, соответственно.
3. Молекулярно-генетический диагноз установлен для существенной доли обследуемых пациентов с потерей слуха: 50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты являются достоверными, поскольку получены на большом объеме исследованных выборок (пациенты с потерей слуха и этнически стратифицированные контрольные выборки) с применением адекватных молекулярно-генетических методов исследования и статистической обработки полученных данных. Результаты, полученные в ходе выполнения научно-исследовательской работы, были представлены на: 9-ой международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии / Международный симпозиум «Генетика человека» (BGRS-2014, Новосибирск, 2014г.); международной студенческой конференции (МНСК-2015, Новосибирск, 2015г.); 7-ом Съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015г.); 20-ой международной Пущинской школе молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2016г.); 10-ой международной школе молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (SBB-2018, Новосибирск, 2018г.); международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург,

2019г.); международной конференции The European Human Genetics Virtual Conference ESHG 2020.2 - Live in Your Living Room (2020г.); 12-ой международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS -2020, Новосибирск, 2020г.).

Объём и структура диссертации. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы (284 источника). Общий объем составляет 145 страниц, в том числе 15 таблиц, 21 рисунок и 4 приложения.

Публикации. По материалам работы были опубликованы 7 статей в журналах из перечня ВАК, 1 глава в монографии, а также 11 тезисов конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно.

Благодарности автора. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю Ольге Леонидовне Посух. Автор также выражает искреннюю признательность Марите Сергеевне Бады-Хоо за предоставленные родословные пациентов с потерей слуха, своим коллегам, Марине Зыцарь и Екатерине Масловой, за всестороннюю помощь на различных этапах выполнения диссертационной работы, Александру Анатольевичу Бондарю и Игорю Владимировичу Морозову – за ценные рекомендации по проведению молекулярно-генетических работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованные выборки. Выборка больных с потерей слуха невыясненной этиологии («*GJB2*-негативные пациенты»), состоящая из 250 больных (171 – тувинцы, 79 – алтайцы), была сформирована из общих выборок пациентов (220 – тувинцы, 93 – алтайцы) из Республик Тыва и Алтай после проведенного у них скрининга мутаций в гене *GJB2*. В выборку больных включены преимущественно индивидуумы с врожденной (или возникшей в раннем детском возрасте) нейросенсорной тугоухостью III-IV степени и/или глухотой. У всех участников исследования было получено письменное информированное согласие на обследование. На каждого больного составлена специальная информационная карта (пол, возраст, этническая принадлежность, место рождения и проживания) и родословная. Компьютерная томография (КТ) височных костей для выявления аномалий строения структур внутреннего уха проведена у 27 больных с мутациями гена *SLC26A4*. Контрольные выборки (157 тувинцев и 141 алтаец) включали в себя несвязанных родством индивидуумов, не состоящих на учёте у сурдолога и без признаков снижения слуха. Реконструкция гаплотипов участка хромосомы 7, включающего ген *SLC26A4*, проведена на выборке из 23 несвязанных родством тувинских больных с потерей слуха, гомозиготных по мутации c.919-2A>G, и в контрольной выборке здоровых тувинцев, не имеющих эту мутацию (n=63).

Молекулярно-генетические методы

Выявление мутаций в гене *SLC26A4*. Поиск мутаций в гене *SLC26A4* у пациентов осуществляли секвенированием по Сэнгеру всех экзонов (21 экзон). Для скрининга мутаций c.170C>A, c.919-2A>G, c.1545T>G и c.2168A>G в контрольных выборках применялся ПЦР-ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции *Tru9 I*, *Hpa II*, *Pce I* и *Rsr2 I*, соответственно.

Выявление мутаций в генах *OTOF* и *RAI1*. Для поиска генетических факторов, приводящих к потере слуха, в нескольких алтайских семьях с рецессивно-наследуемой глухотой неясной этиологии был применен метод полноэкзомного секвенирования (WES). Для WES было отобрано по два глухих сибса из каждой семьи. Образцы геномной ДНК секвенировали на Illumina HiSeq 2000 (Agilent SureSelect Human All Exon V4 51Mb enrichment kit). Последующий биоинформатический анализ проводился в предположении, что патология слуха у обоих глухих потомков из каждой анализируемой семьи определяется гомозиготностью каких-либо вариантов в генах, уже известных в ассоциации с рецессивной глухотой (http://hereditaryhearingloss.org), либо в генах, ассоциация которых с потерей слуха пока еще необоснована (новые гены-кандидаты). Скрининг мутации c.5254G>A (ген *RAI1*), выявленной с помощью WES, проводили секвенированием по Сэнгеру. Кодирующая область (6 экзонов) гена *RAI1* у носителей мутации c.5254G>A анализировалась секвенированием по Сэнгеру. Для скрининга мутации c.1111G>C (ген *OTOF*), выявленной с помощью WES, у пациентов и в контрольных выборках использовался ПЦР-ПДРФ-анализ (*BstHH I*) с подтверждающим секвенированием по Сэнгеру.

Скрининг m.1555A>G (*MT-RNR1*) митохондриальной ДНК. Для детекции m.1555A>G у тувинских больных применялся ПЦР-ПДРФ-анализ (*Hae III*).

Генотипирование STR- и SNP-маркёров. Генотипирование STR-маркёров (D7S496, D7S2459, D7S2456, D7S799, D7S525) проводили с помощью фрагментного анализа. Генотипирование SNP-маркёров (rs2248464, rs2248465, rs2395911, rs2072063, rs2072064, rs2072065, rs2301634) осуществлялось секвенированием по Сэнгеру.

Реконструкция STR- и SNP-гаплотипов выполнена с использованием пакета программ «Arlequin» v.3.5.1.2. (EM, Expectation-Maximization алгоритм). Неравновесие по сцеплению между аллелями SNP- и STR-маркёров хромосомы 7 и мутацией c.919-2A>G рассчитывали как: $\delta = (Pd - Pn) / (1 - Pn)$, где δ – мера неравновесия по сцеплению, Pd – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией c.919-2A>G в выборке больных, гомозиготных по этой мутации, Pn – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации c.919-2A>G в контрольной выборке [Bengtsson, Thomson, 1981].

Статистические методы. Для статистического анализа различий в числе мутантных аллелей между группами применяли односторонний точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нашей группой было установлено, что мутации гена *GJB2* являются причиной глухоты у 15.1% больных на Алтае (алтайцы) и у 22.3% больных в Туве (тувинцы), но для большей части пациентов причины потери слуха остались неизвестными. Таким образом, для выяснения причин потери слуха у таких больных необходимо осуществить поиск мутаций в других «генах глухоты», прежде всего, в гене *SLC26A4*, мутации в котором являются второй по значимости причиной наследственной потери слуха.

Ген *SLC26A4* в этиологии потери слуха у коренного населения Республики Тыва и Республики Алтай

Биоинформатический анализ вариаций нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4*. Ген *SLC26A4* кодирует трансмембранный белок pendrin, который является многофункциональным анионным транспортером. Вследствие большого размера этого гена (21 экзон) существуют трудности в его полномасштабном мутационном анализе. Предварительный выбор участков гена *SLC26A4*, имеющих потенциально высокую диагностическую значимость, является актуальным для оптимизации поиска патогенетических вариантов в этом гене. Для решения этой задачи мы провели биоинформатический анализ вариаций последовательности *SLC26A4* на основе данных из the Deafness Variation Database (DVD: https://deafnessvariationdatabase.org/gene/SLC26A4) [Azaiez et al., 2018]. Чтобы идентифицировать экзоны с наибольшей «нагрузкой» патогенетическими (pathogenic) и вероятно патогенетическими (likely pathogenic) вариантами (PLP-варианты), мы оценили так называемую «плотность» («variation rate») – число PLP-вариантов в каждом экзоне, нормализованное на физическую длину экзона (п.н.). В десяти экзонах (4, 6, 10, 11, 13-17, 19) этот показатель превышал пороговое значение (медиана = 21.39). Затем эти данные были объединены с информацией о PLP-вариантах, расположенных в прилегающих интронных районах гена *SLC26A4*. Таким образом, было выявлено десять областей этого гена с потенциально высокой диагностической значимостью, первоочередное секвенирование которых может обеспечить одноэтапное выявление 61.9% (373/603) всех известных в настоящее время PLP-вариантов в последовательности гена *SLC26A4*. Этот подход может быть использован в качестве начального эффективного диагностического тестирования в выборках пациентов неизвестной этнической принадлежности или в качестве последующего шага после таргетного тестирования уже известных этно- или регион-специфичных патогенетических вариантов гена *SLC26A4*.

Молекулярный анализ последовательности гена *SLC26A4*

Последовательный анализ фрагментов гена *SLC26A4* в выборке «*GJB2*-негативных» больных проводился на основе разработанного нами диагностического алгоритма и у конкретного больного выполнялся до выявления у него двух рецессивных патогенетических вариантов этого гена. Были выявлены уже известные

патогенетические варианты: c.170C>A (p.Ser57*), c.919-2A>G, c.2027T>A (p.Leu676Gln), c.2034+1G>A, c.2168A>G (p.His723Arg), новый, еще неописанный, вариант c.1545T>G (p.Phe515Leu), а также ряд полиморфных вариантов (как уже известных, так и новых).

SLC26A4-генотипы пациентов

В **таблице 1** приведены данные о *SLC26A4*-генотипах больных. Для пациентов, у которых были выявлены патогенетические *SLC26A4*-варианты в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии (n=66, из них: тувинцы – 62, алтайцы – 4), может быть установлен молекулярно-генетический диагноз «Потеря слуха, обусловленная присутствием двух рецессивных мутаций в гене *SLC26A4».* Наблюдаются существенные различия в размере патогенетического вклада мутаций гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха у тувинцев (28.2%) и алтайцев (4.3%).

Таблица 1. Генотипы больных с потерей слуха, установленные на основе анализа гена *SLC26A4*.

***SLC26A4* генотипы больных**		**Тувинские пациенты (n=220)**	**Алтайские пациенты (n=93)**
ГОМОЗИГОТЫ:			
c.[919-2A>G];[919-2A>G]	интрон 7	30	-
c.[2027T>A];[2027T>A]	экзон 17	4	-
c.[2168A>G];[2168A>G]	экзон 19	-	2
c.[170C>A];[170C>A]	экзон 3	1	-
Всего		**35**	**2**
КОМПАУНД-ГЕТЕРОЗИГОТЫ:			
c.[919-2A>G];[2027T>A]	интрон 7, экзон 17	14	2
c.[919-2A>G];[1545T>G]*	интрон 7, экзон 14	8	-
c.[170C>A];[919-2A>G]	экзоны 3, интрон 7	3	-
c.[919-2A>G];[2034+1G>A]	интрон 7, экзон 17	1	-
c.[1545T>G]*;[2027T>A]	экзон 14, экзон 17	1	-
Всего		**27**	**2**
Установленный диагноз по гену *SLC26A4*		**62 (28.2%)**	**4 (4.3%)**
ГЕТЕРОЗИГОТЫ:			
c.[919-2A>G];[?]	интрон 7	9	-
c.[170C>A];[?]	экзон 3	1	-
c.[1545T>G]*;[?]	экзон 14	2	-
c.[2027T>A];[?]	экзон 17	1	1
Всего		**13 (5.9%)**	**1 (1.1%)**

* - генотипы с новым вариантом c.1545T>G.

У 27 тувинских пациентов, гомозиготных или компаунд-гетерозиготных по мутациям гена *SLC26A4,* для выявления возможных аномалий развития структур внутреннего уха проведена КТ височных костей. У 24 из 27 обследованных

пациентов выявлено двухстороннее расширение (≥ 1.5 мм) водопровода преддверия (EVA) с вариацией от 1.5 мм до 5.1 мм; у одного пациента – КТ-картина была без патологии (< 1.5 мм); у двух пациентов наблюдалось одностороннее EVA. Таким образом, было показано, что степень EVA может различаться на разных ушах у одного и того же пациента с *SLC26A4*-мутациями и характеризуется как внутрисемейной, так и межсемейной вариабельностью.

У 14 пациентов (13 тувинцев и 1 алтаец) выявлена только одна какая-либо рецессивная *SLC26A4*-мутация. Нельзя исключить, что у таких пациентов могут быть нарушения в регуляторных участках / промоторе гена *SLC26A4*, которые не были включены в молекулярно-генетический анализ. Кроме того, такие пациенты могут быть только случайными носителями мутации в гене *SLC26A4*, а причинами потери слуха у них является наличие патогенетических вариантов в других генах или влияние средовых факторов.

Мутационный спектр гена *SLC26A4*

Широко распространенная в азиатских популяциях мутация **c.919-2A>G** обнаружена в обеих выборках пациентов. Доля c.919-2A>G среди всех мутантных *SLC26A*4-аллелей, выявленных у тувинских больных, составляет 69.3%, в то время как эта мутация была обнаружена только у двух алтайских пациентов в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией c. 2027T>A. Другая, также характерная для азиатских популяций, мутация **c.2168A>G (p.His723Arg)** выявлена только у алтайских пациентов. Вторая по встречаемости в обеих выборках пациентов мутация **c.2027T>A (p.Leu676Gln)** является редкой в других популяциях. Мутация **c.170C>A (p.Ser57*)** выявлена только у тувинских пациентов. Редкая мутация **c.2034+1G>A** обнаружена у одного тувинского пациента в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией c.919-2A>G.

Вариант **c.1545T>G (p.Phe515Leu)** – новый, неописанный ранее, миссенс-вариант в экзоне 14, приводящий к замене фенилаланина на лейцин в 515-ой аминокислотной позиции белка пендрин (p.Phe515Leu) (**рисунок 1**). Этот вариант был обнаружен у 11 тувинских пациентов, происходящих из 8 несвязанных родством семей. Анализ родословной одной из таких семей показал сегрегацию варианта c.1545T>G с потерей слуха (**рисунок 1Б**). Частота c.1545T>G была оценена в группе тувинских больных и в контрольной выборке тувинцев. Для сравнительного анализа использовали выборку неродственных пациентов, сформированную на основе анализа родословных (121 чел., 242 аллелей). Частота c.1545T>G в выборке больных (0.037, 9/242 аллелей) статистически значимо превышала его частоту в контрольной выборке (0.010, 3/296 аллелей) (p=0.03391). Пять из десяти используемых биоинформатических предсказательных программ (FATHM, Mutation Taster, PROVEAN, SNPs&GO, PolyPhen-2, MutPred, Align-GVGD, MutationAssessor.org, SIFT, Condel) оценивали вариант c.1545T>G как «повреждающий», две – как «возможно повреждающий» и три – как «вероятно нейтральный». Таким образом, получены свидетельства (сегрегация варианта с потерей слуха, значимое

превышение частоты варианта в выборке больных по сравнению с контрольной выборкой, данные биоинформатических предсказательных программ) в пользу патогенетической значимости нового варианта c.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4*.

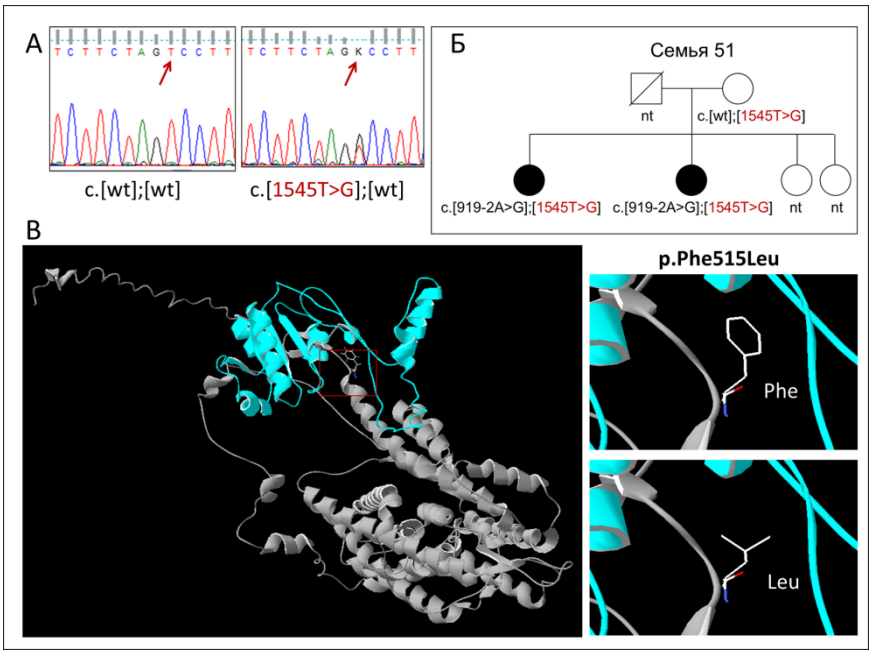


Рисунок. 1. Новый вариант c.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4*.
(**А**) Фрагменты секвенограмм экзона 14 гена *SLC26A4*.
(**Б**) Родословная тувинской семьи с *SLC26A4*-генотипами. Черным цветом помечены индивидуумы с выраженной и полной потерей слуха. wt – норма («дикий» тип).
(**В**) 3D-структура белка pendrin с локализацией варианта c.1545T>G (p.Phe515Leu) (*построено с использованием программ I-Tasser и Swiss-PdbViewer*).

Частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций гена *SLC26A4* у коренного населения Тувы и Алтая

Базируясь на данных молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у пациентов (**таблица 1**), в контрольных выборках несвязанных родством коренных жителей Тувы и Алтая был проведен скрининг наиболее частых рецессивных *SLC26A4*-мутаций для определения частоты их гетерозиготного носительства (**таблица 2**).

Таблица 2. Частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций гена *SLC26A4* в контрольных выборках тувинцев и алтайцев.

Мутации гена *SLC26A4*	Тувинцы	Алтайцы
c.919-2A>G	5.1% (8/157)	0% (0/130)
c.1545T>G	2.0% (3/148)	nt
c.170C>A	0% (0/100)	nt
c.2027T>A	0% (0/157)	0% (0/123)
c.2034+1G>A	0% (0/157)	0% (0/123)
c.2168A>G	nt	0% (0/141)

В алтайской контрольной выборке носители рецессивных мутаций гена *SLC26A4* не обнаружены, в то время как в тувинской контрольной выборке частота гетерозиготного носительства мутации c.919-2A>G составила 5.1% (8/157), а мутации c.1545T>G – 2.0% (3/148).

Территориальное распределение мутантных аллелей с c.919-2A>G, c.2027T>A и c.1545T>G гена *SLC26A4* в Республике Тыва

Территориальное распределение мутантных аллелей с наиболее частыми вариантами c.919-2A>G, c.2027T>A и c.1545T>G гена *SLC26A4* в Республике Тыва проанализировано на основе данных о месте рождения всех индивидуумов, имеющих эти варианты (тувинские пациенты, их родственники и гетерозиготные носители из контрольной выборки) (**рисунок 2**). Территория Республики Тыва подразделена на 17 административных районов (кожуунов), отдельно выделяется столица республики - город Кызыл. В целом, в обеих выборках из Тувы представлены индивидуумы из всех районов Республики Тыва, за исключением отдаленного Тери-Хольского района (только пациенты с потерей слуха). Можно заметить, что аллели с мутациями c.919-2A>G, c.2027T>A и c.1545T>G достаточно широко распространены в центральных районах Республики Тыва, с видимым накоплением в Чаа-Хольском и Улуг-Хемском районах (**рисунок 2**).

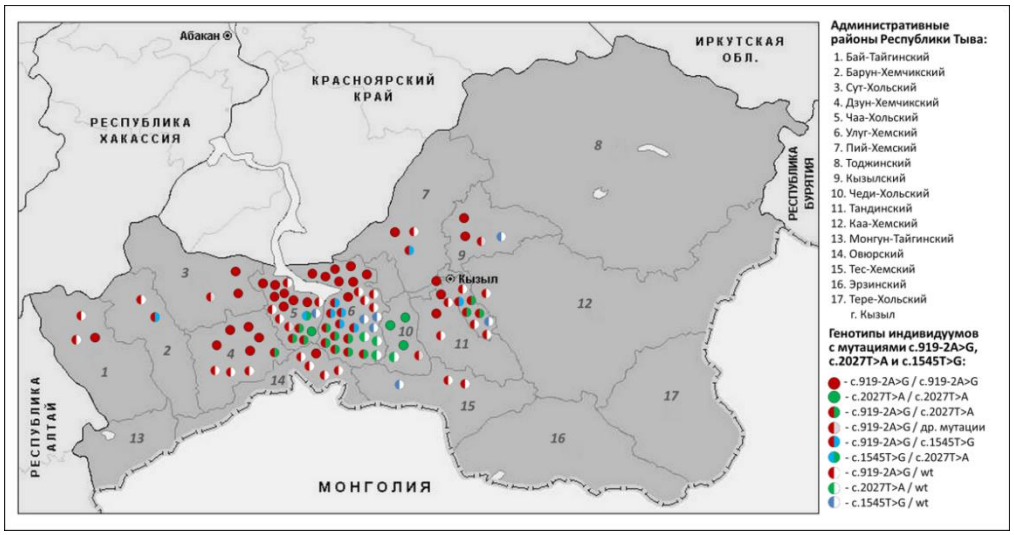


Рисунок 2. Территориальное распределение мутантных аллелей с c.919-2A>G, c.2027T>A и c.1545T>G в Республике Тыва.

Выявление и анализ гаплотипов, несущих мутацию c.919-2A>G

Мы предположили, что в основе широкой распространенности мутации c.919-2A>G гена *SLC26A4* у тувинцев лежит эффект основателя. Для проверки этой гипотезы необходимо проанализировать генетическое окружение (гаплотипы) этой мутации. В этих целях проведен анализ гаплотипов участка хромосомы 7, включающего ген *SLC26A4*, на основе генотипирования STR- и SNP-маркеров, фланкирующих на разном расстоянии мутацию c.919-2A>G.

Реконструкция STR-гаплотипов. Для гомозигот по мутации c.919-2A>G были получены высокие значения показателя неравновесия по сцеплению для специфических аллелей пяти STR-маркёров (D7S496, D7S2459, D7S2456, D7S799, D7S525). Границы предполагаемых гаплотипов, несущих c.919-2A>G, могут определяться дистальными маркерами D7S496 и D7S525 (~ 2.5 Mb). В контрольной выборке было выявлено 50 из 200 теоретически возможных гаплотипов (EM-алгоритм, пакет программ «Arlequin»). Наиболее частыми оказались гаплотипы 134-

145-244-131-221 (14.5%), 134-145-244-131-227 (7.4%) и 134-145-246-131-227 (5.9%), а остальные имели частоту менее 5%. У c.919-2A>G-гомозигот обнаружено четыре гаплотипа: 120-147-244-131-227 – с частотой 91.3%, 120-147-244-131-229 – 4.3%, а также 120-147-244-131-221 и 120-147-244-131-225 – с частотой 2.2% каждый, которые отсутствовали в контрольной выборке. Таким образом, можно заключить, что гаплотип 120-147-244-131-227 (91.3%), определяемый STR-маркёрами (D7S496---c.919-2A>G---D7S2459-D7S2456-D7S799-D7S525), размером ~ 2.5 Mb, является высокоспецифичным для мутации c.919-2A>G.

Реконструкция SNP-гаплотипов. SNP-гаплотипы реконструированы у индивидуумов, гомозиготных по c.919-2A>G, и в контрольной выборке без этой мутации на основе данных генотипирования внутригенных SNP-маркёров rs2248464, rs2248465, rs2395911, rs2072063, rs2072064, rs2072065. Анализ неравновесия по сцеплению показал полное сцепление всех исследованных SNP-маркёров с мутацией c.919-2A>G. У гомозигот по c.919-2A>G был обнаружен единственный SNP-гаплотип A-C-G-C-A-C (100%). В контрольной выборке найдено 12 из 32 теоретически возможных гаплотипов, среди которых наиболее частыми были два гаплотипа: T-T-T-C-T-T (36.2%) и T-T-G-C-A-C (25.5%), а остальные встречались с частотами менее 8%. Частота единственного SNP-гаплотипа A-C-G-C-A-C, обнаруженного у c.919-2A>G-гомозигот (100%), статистически значимо ($p < 10^{-32}$) превышала его частоту в контрольной выборке (6.6%). Таким образом, можно заключить, что внутригенный SNP-гаплотип A-C-G-C-A-C (rs2248464-rs2248465 ---c.919-2A>G--- rs2395911-rs2072063-rs2072064-rs2072065) является высокоспецифичным для мутации c.919-2A>G.

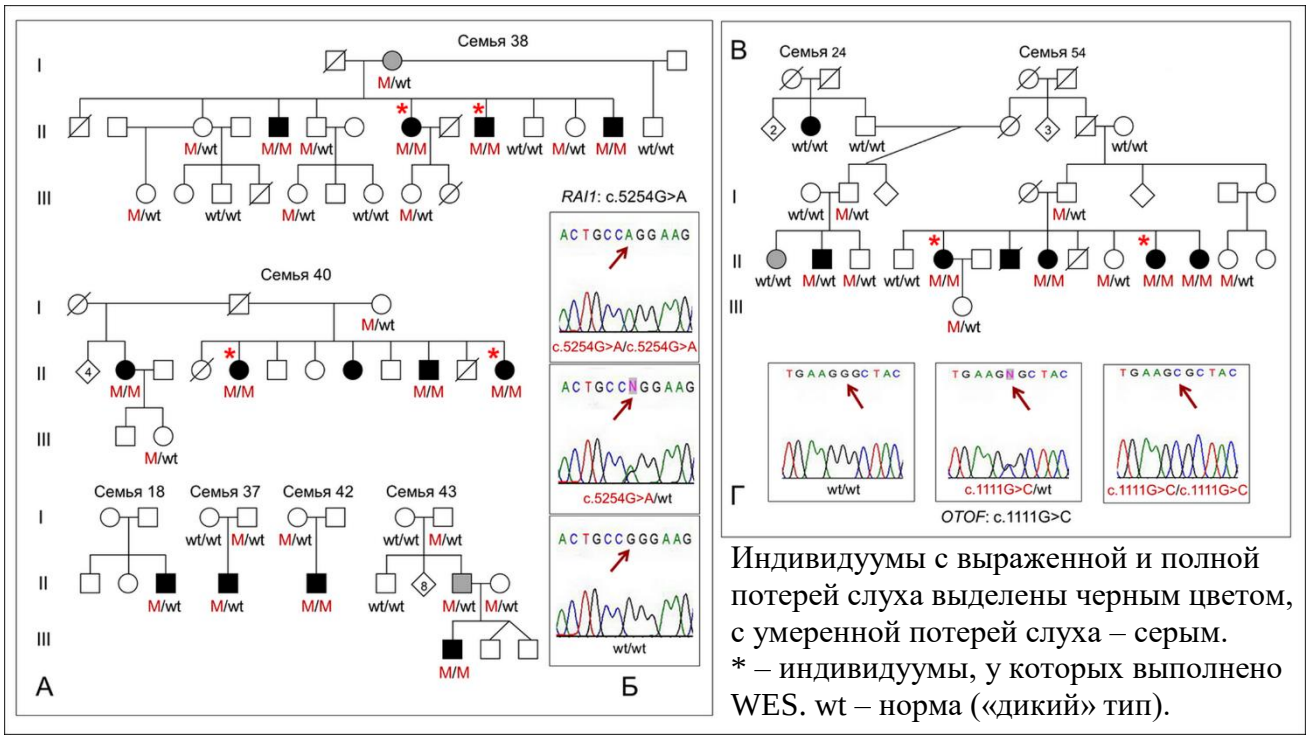
Совокупность полученных результатов свидетельствует о высокой специфичности и сходстве генетического окружения участка хромосомы 7, включающего мутацию c.919-2A>G (*SLC26A4*), у носителей этой мутации на территории Тувы, что предполагает общность ее происхождения и соответствует гипотезе о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности c.919-2A>G в изучаемом регионе.

Выявление генов, ответственных за развитие патологии слуха, методом полноэкзомного секвенирования у пациентов из Республики Алтай

В трех больших алтайских семьях с рецессивным наследованием глухоты неясной этиологии из Республики Алтай, у членов которых не было обнаружено мутаций в гене *GJB2* («*GJB2*-негативные семьи»), методом полноэкзомного секвенирования (WES) был проведен поиск генов, ответственных за потерю слуха.

Мутация c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*. У четырех индивидуумов из двух «*GJB2*-негативных» семей была обнаружена новая мутация c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1* (17p11.2, MIM 607642), ассоциация которого с изолированной потерей слуха показана впервые. Известно, что делеции и дупликации протяженного района 17-ой хромосомы (от 1.5 до 9 Мб), включающего ген *RAI1*, который кодирует транскрипционный фактор RAI1, приводят к двум

различным синдромам: Смита-Магениса и Потоцки-Лупски. Скрининг c.5254G>A у «*GJB2*-негативных» пациентов разного этнического происхождения в Республике Алтай выявил эту мутацию и в других (только алтайских) семьях (**рисунок 3А,Б**).



Индивидуумы с выраженной и полной потерей слуха выделены черным цветом, с умеренной потерей слуха – серым. * – индивидуумы, у которых выполнено WES. wt – норма («дикий» тип).

Рисунок 3. Родословные алтайских семей с мутациями, выявленными полноэкзомным секвенированием (WES). (**А**) Родословные с мутацией c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*. M – мутация c.5254G>A. (**Б**) Фрагменты секвенограмм с вариантом c.5254G>A (*RAI1*). (**В**) Расширенная родословная с мутацией c.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF*. M – мутация c.1111G>C. (**Г**) Фрагменты секвенограмм с вариантом c.1111G>C в гене *OTOF*.

Патогенетический вклад гена *RAI1* в этиологию потери слуха у алтайцев, оцениваемый как доля больных, гомозиготных по мутации c.5254G>A, составил 10.8% (10/93). В популяционной выборке алтайцев частота гетерозиготного носительства c.5254G>A составила 3.3% (4/120). Статистически значимые ($p < 10^{-5}$) различия в частоте c.5254G>A были обнаружены между группой алтайских пациентов (93 чел., 186 аллелей) и контрольной группой алтайцев (120 чел., 240 аллелей). У всех индивидуумов, имеющих c.5254G>A, проведено секвенирование кодирующей области (6 экзонов) гена *RAI1*. У пациентов, гетерозиготных по c.5254G>A, не было выявлено дополнительных патогенетических вариантов в анализированных фрагментах гена *RAI1*. Снижение слуха у этих пациентов, вероятно, не связано с носительством c.5254G>A и обусловлено непосредственным или модулирующим воздействием внешних средовых факторов (асфиксия новорожденного, перенесенные заболевания, преклонный возраст). У исследуемых индивидуумов были обнаружены уже известные полиморфные варианты: rs3803763, rs11649804, rs8067439, rs110783980, а также вариации в числе глутаминовых повторов (CAG) в экзоне 3 гена *RAI1*. На основании полученных данных были реконструированы гаплотипы с мутацией c.5254G>A. У всех гомозигот по c.5254G>A наблюдался один и тот же гаплотип – Аллель$_{мут}$: C-A-Q13[CAG CAA

(CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A, что свидетельствует в пользу гипотезы о роли эффекта основателя в распространенности мутации c.5254G>A на территории Алтая.

Мутация c.1111G>C в гене *OTOF*. У двух индивидуумов из «*GJB2*-негативной» алтайской семьи была выявлена новая гомозиготная мутация c.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF* (2p23.3, MIM 603681) (**рисунок 3В,Г**), кодирующем трансмембранный белок otoferlin, который участвует в связывании кальция, что необходимо для высвобождения нейромедиаторов в синапсах между внутренними волосковыми клетками и волокнами слухового нерва. Мутации гена *OTOF* приводят к нейросенсорной потере слуха и нейропатии слухового нерва (DFNB9, MIM 601071). Скрининг c.1111G>C у «*GJB2*-негативных» пациентов в Республике Алтай выявил эту мутацию только у представителей коренного населения – алтайцев. Патогенетический вклад гена *OTOF* в этиологию потери слуха у алтайцев, оцениваемый как доля больных, гомозиготных по c.1111G>C (*OTOF*), составил 4.3% (4/93). Мутация c.1111G>C не была выявлена в контрольной выборке алтайцев (n=120).

Анализ мест рождения всех индивидуумов с мутациями c.5254G>A (*RAI1*) и c.1111G>C (*OTOF*) (больные, их родственники и гетерозиготные носители c.5254G>A в контрольной выборке алтайцев) позволил графически представить распространенность этих мутаций по территории Республики Алтай (**рисунок 4**), которая подразделена на 10 административных районов, примерно соответствующих определенным родовым территориям алтайцев в прошлом [Потапов, 1969].

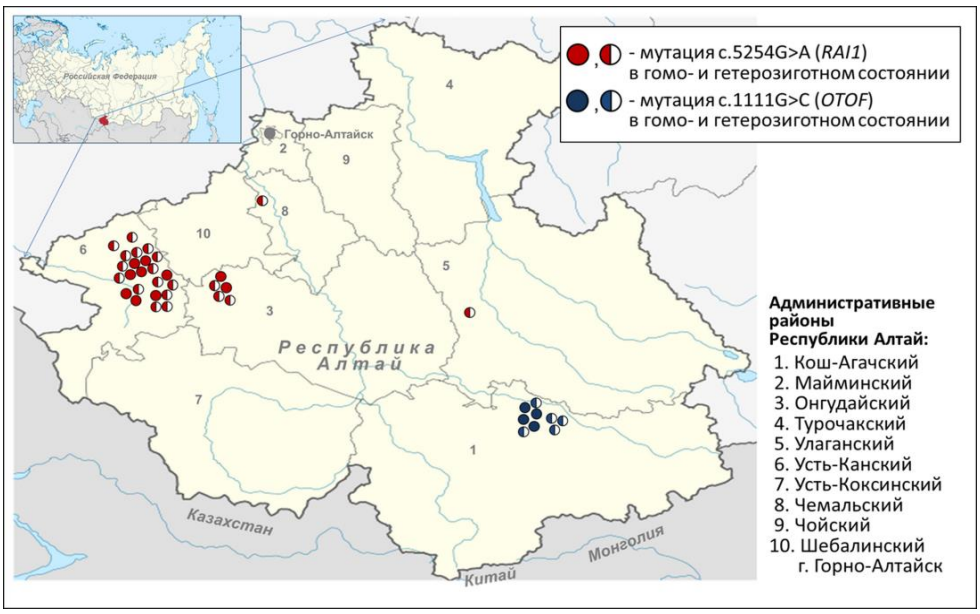


Рисунок 4. Распространенность аллелей с мутациями c.5254G>A (*RAI1*) и c.1111G>C (*OTOF*) по территории Республики Алтай.

Аллели с мутацией c.5254G>A (ген *RAI1*), в основном, аккумулируются на территории двух смежных районов – Усть-Канском и Онгудайском, что, вероятно, определяется эффектом основателя и сохраняющейся до настоящего времени ограниченностью миграций алтайцев за пределы своих родовых территорий [Лузина, 1987; Осипова и др., 1997; Посух и др., 1998]. Та же тенденция прослеживается и в

распространенности мутации c.1111G>C в гене *OTOF*, которая была найдена только в Кош-Агачском районе Республики Алтай.

Сравнительный анализ генетической компоненты в этиологии слуха у тувинцев и алтайцев

В **таблице 3** приведены суммарные результаты поиска молекулярно-генетических причин потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (тувинцев и алтайцев) на основе секвенирования кодирующих областей (с фланкирующими участками) последовательности генов *GJB2* и *SLC26A4* и скрининга отдельных точечных мутаций в генах *RAI1*, *OTOF* и *MT-RNR1* (мтДНК).

Таблица 3. Структура генетической компоненты в этиологии слуха у тувинских и алтайских пациентов.

Ген	**Патогенетический вклад в этиологию потери слуха * и мутационный спектр (доля мутации среди всех выявленных мутантных аллелей, %)**			
	Тувинские пациенты (n=220)		**Алтайские пациенты** (n=93)	
GJB2	22.3% (49/220)	c.516G>C (p.Trp172Cys) - 62.9% c.-23+1G>A - 27.6% c.235delC - 5.2% c.299_300delAT - 2.6% c.109G>A (p.Val37Ile) - 1.7%	15.1% (14/93)	c.235delC - 51.9% c.516G>C (p.Trp172Cys) - 29.6% c.-23+1G>A - 14.8% **c.224G>A (p.Arg75Gln)** - 3.7%
SLC26A4	28.2% (62/220)	c.919-2A>G - 69.3% c.2027T>A (p.Leu676Gln) - 17.5% c.1545T>G (p.Phe515Leu) - 8.0% c.170C>A (p.Ser57*) - 4.4% c.2034+1G>A - 0.7%	4.3% (4/93)	c.2168A>G (p.His723Arg) - 44.5% c.2027T>A (p.Leu676Gln) - 33.3% c.919-2A>G - 22.2%
RAI1 (c.5254G>A)	0%	-	10.8% (10/93)	c.5254G>A (p.Gly1752Arg)
OTOF (c.1111G>C)	0%	-	4.3% (4/93)	c.1111G>C (p.Gly371Arg)
MT-RNR1 (m.1555A>G)	0%	-	0%	-
Суммарно	**50.5%** (111/220)		**34.5%** (32/93)	

* – Патогенетический вклад гена в этиологию потери слуха определяется долей больных, имеющих биаллельные рецессивные мутации генов *GJB2* (включая одного алтайского пациента с доминантной мутацией c.224G>A), *SLC26A4, RAI1,* или *OTOF*. Доминантная мутация c.224G>A (p.Arg75Gln) гена *GJB2* выделена жирным шрифтом. Результаты анализа гена *GJB2* и скрининга мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*, мтДНК) у алтайских пациентов получены ранее [Posukh et al., 2005; Джемилева и др. 2009].

В выборке тувинских пациентов, молекулярно-генетический диагноз, обусловленный наличием мутаций в генах *GJB2* и *SLC26A4*, может быть установлен для 111 человек, что составляет более половины (50.5%) анализируемой выборки (n=220). В выборке алтайских пациентов (n=93) мутации в генах *GJB2*, *SLC26A4*, *RAI1*, *OTOF* являются причиной потери слуха у 32 больных (34.5%). Скрининг мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*) митохондриальной ДНК не выявил ее как у тувинских, так и алтайских пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несиндромальная наследственная глухота характеризуется уникальной генетической гетерогенностью. Наиболее частой причиной потери слуха являются мутации в гене *GJB2*, вторым по значимости для ряда популяций является ген *SLC26A4*. Ранее нашей группой было установлено, что у 15.1% больных из Республики Алтай (алтайцы) и у 22.3% больных из Республики Тыва (тувинцы) причиной глухоты являются мутации гена *GJB2*, однако у большинства пациентов причины потери слуха остались неясными. В данной работе проведен молекулярно-генетический анализ последовательности гена *SLC26A4* у тувинских и алтайских пациентов с потерей слуха неустановленной этиологии. Несмотря на общность происхождения коренных народов и территориальную близость Алтая и Тувы, были выявлены значительные различия в размере патогенетического вклада гена *SLC26A4*, определяемого мутациями c.919-2A>G, c.2027T>A, c.1545T>G, c.2168A>G, c.170C>A, c.2034+1G>A: 28.2% – для тувинцев и 4.3% – для алтайцев. Наиболее распространенной у тувинцев является мутация c.919-2A>G (частота у больных – 69.3%, частота гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%), таким образом, скрининг c.919-2A>G является приоритетным для регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха у коренного населения Тувы. Установлена высокая специфичность и сходство STR- и SNP-гаплотипов, включающих мутацию c.919-2A>G, что предполагает общность ее происхождения и соответствует гипотезе о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности этой мутации на территории Республики Тыва.

Для поиска генетических факторов, приводящих к потере слуха, был применен метод полноэкзомного секвенирования в нескольких алтайских семьях с глухотой неустановленной этиологии и были выявлены новые мутации в уже известном «гене глухоты» *OTOF* (c.1111G>C) и в гене *RAI1* (c.5254G>A), ассоциация которого с потерей слуха показана впервые. Патогенетический вклад генов *RAI1* и *OTOF* в этиологию потери слуха у алтайцев составил 10.8% и 4.3%, соответственно, в то время как у тувинских пациентов мутаций этих генов не было выявлено. Установлено единство гаплотипа с мутацией c.5254G>A (*RAI1*), что свидетельствует в пользу общности ее происхождения. Выявлено локальное распределение мутаций c.5254G>A (*RAI1*) и c.1111G>C (*OTOF*) на территории Республики Алтай, что, вероятно, определяется эффектом основателя и сохраняющейся до настоящего времени ограниченностью миграций алтайцев за пределы своих родовых территорий.

На основе полученных результатов и с учетом предыдущих молекулярно-генетических исследований наследственной глухоты у коренного населения Тувы и Алтая, можно заключить, что генетическая компонента в этиологии потери слуха составляет 50.5% у тувинцев и 34.5% у алтайцев. В результате исследования были определены мутации, наиболее значимые для регион-специфической ДНК-диагностики потери слуха.

ВЫВОДЫ

1. В результате молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у тувинских и алтайских пациентов с потерей слуха невыясненной этиологии было установлено:

- Доля пациентов с потерей слуха, определяемой мутациями гена *SLC26A4*, существенно различается: 28.2% (62/220) – у тувинцев и 4.3% (4/93) - у алтайцев;
- Выявлен специфический спектр мутаций: широко распространённые в азиатских популяциях мутации c.919-2A>G и c.2168A>G, редкие в других популяциях патогенетические варианты c.170C>A, c.2027T>A, c.2034+1G>A, и новый вариант c.1545T>G, для которого получены свидетельства его патогенетической значимости.

2. Среди всех мутантных аллелей гена *SLC26A4*, выявленных у тувинцев, наибольшую частоту имеет мутация c.919-2A>G: у больных с потерей слуха – 69.3%, а частота ее гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%. Анализ STR- и SNP-гаплотипов, фланкирующих мутацию c.919-2A>G, выявил высокую специфичность и сходство ее генетического окружения, что соответствует гипотезе о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности c.919-2A>G в Республике Тыва.

3. Методом полноэкзомного секвенирования у алтайских пациентов с аутосомно-рецессивным типом наследования потери слуха идентифицированы новые патогенетические варианты: c.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF* и c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*, ассоциация которого с потерей слуха установлена впервые. Доля алтайских пациентов, гомозиготных по c.5254G>A (*RAI1*) или по c.1111G>C (*OTOF*), составила 10.8% (10/93) и 4.3% (4/93), соответственно, в то время как у тувинских пациентов эти мутации не были обнаружены. Частота гетерозиготного носительства c.5254G>A (*RAI1*) в популяции алтайцев составила 3.3%. У всех носителей мутации c.5254G>A выявлен единый гаплотип участка хромосомы 17, что свидетельствует об общем происхождении этой мутации.

4. Доля выявленных генетических форм потери слуха в выборках исследуемых пациентов составила 28.2% – у тувинцев (ген *SLC26A4*) и 19.4% – у алтайцев (гены *SLC26A4*, *RAI1*, *OTOF*). Суммарно, с учетом полученных ранее данных (вклад мутаций гена *GJB2* у тувинцев – 22.3% и у алтайцев – 15.1%), молекулярно-генетический диагноз может быть установлен для существенной доли обследуемых пациентов с глухотой (50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев). Были выявлены мутации, наиболее значимые для регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different Rates of the *SLC26A4*-Related Hearing Loss in Two Indigenous Peoples of Southern Siberia (Russia) // Diagnostics. – 2021. – Vol. 11. – P. 2378. (WOS IF = 3.706, Q2)

2. **Данильченко В.Ю.**, Зыцарь М.В., Маслова Е.А., Бады-Хоо М.С., Морозов И.В., Бондарь А.А., Посух О.Л. Анализ мутационного спектра гена *SLC26A4* и его вклада в этиологию наследуемой потери слуха у коренного населения Южной Сибири // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – №7(216). – С. 43-45. (РИНЦ IF = 0.366)
3. Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., **Danilchenko V.Yu.**, Maslova E.A., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. 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. – 2020. – Vol. 11. – P. 833-850. (WOS IF = 4.096, Q2)
4. Posukh O.L., Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., **Danilchenko V.Yu.**, Maslova E.A., Barashkov N.A., Bondar A.A., Morozov I.V., Maximov V.N., Voevoda M.I. Unique Mutational Spectrum of the *GJB2* Gene and its Pathogenic Contribution to Deafness in Tuvinians (Southern Siberia, Russia): A High Prevalence of Rare Variant c.516G>C (p.Trp172Cys) // Genes. – 2019. – Vol. 10. – P. 429. (WOS IF = 4.096, Q2)
5. Churbanov A.Y., Karafet T.M., Morozov I.V., **Mikhalskaia V.Yu. (Danilchenko V.Yu.)**, Zytsar M.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Whole Exome Sequencing Reveals Homozygous Mutations in *RAI1*, *OTOF*, and *SLC26A4* Genes Associated with Nonsyndromic Hearing Loss in Altaian Families (South Siberia) // PLoS One. – 2016. – Vol. 11(4). – P.: e0153841. (WOS IF = 3.372, Q1)
6. Бады-Хоо М.С., Бондарь А.А., Морозов И.В., Зыцарь М.В., **Михальская В.Ю. (Данильченко В.Ю.)**, Скиданова О.В., Барашков Н.А., Монгуш Р.Ш., Омзар О.С., Тукар В.М., Посух О.Л. Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва. Сообщение II. Оценка спектра мутаций гена *GJB2* (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха // Медицинская генетика. – 2014. – №11. – С. 23-33. (РИНЦ IF = 0.366)
7. Бады-Хоо М.С., Посух О.Л., Зоркольцева И.В., Скиданова О.В., Барашков Н.А., Омзар О.С., Монгуш Р.Ш., Бамба О.М., Тукар В.М., Зыцарь М.В., **Михальская В.Ю. (Данильченко В.Ю.)**. 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. (РИНЦ IF = 0.366)
8. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar, M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different rates of the *SLC26A4*-related hearing loss in two indigenous peoples of Southern Siberia (Russia) / в книге «Genetic testing for rare diseases» (под ред. Millán J.). Изд-ство: MDPI (Switzerland). – 2022. – С. 13-28. ISBN 978-3-0365-3728-3 (Hbk) / ISBN 978-3-0365-3727-6