

7. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes / M.G. Larson, L.D. Atwood, E.J. Benjamin [et al.] // BMC Med Genet. – 2007. – Vol. 19 (8). – P. S5.

8. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction / D. Shiffman, S.G. Ellis, C.M. Rowland [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2005. – Vol. 77. – P. 596–605.

Genet. – 2005. – Vol. 77. – P. 596–605.

9. Koch W. Variations of specific non-candidate genes and risk of myocardial infarction: A replication study / W. Koch, P. Hoppmann, A. Schömig, A. Kastrati // Int J Cardiol 2009; 147 (1):38–41.

10. Ozaki K. Genome-wide association study to identify single-nucleotide polymorphisms

conferring risk of myocardial infarction / K. Ozaki, T. Tanaka // Methods Mol. Med. – 2006. – Vol. 128. – P. 173–180.

11. ROS1 Asp2213Asn polymorphism is not associated with coronary artery disease in a Greek case-control study / E.V. Theodoraki, T. Nikopen-sius, J. Suhorutsenko [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2009. – Vol. 47 (12). – P. 1471–1473.

Г.П. Романов, Н.А. Барашков, Ф.М. Терютин, В.Г. Пшенникова, А.В. Соловьев, А.М. Рафаилов, Н.Н. Сазонов, Л.У. Джемилева, О.Л. Посух, Э.К. Хуснутдинова, С.А. Федорова

ЧАСТОТА МУТАЦИИ m.1555A>G ГЕНА MT-RNR1 МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ИНДИВИДУУМОВ С НАРУШЕНИЯМИ СЛУХА В ЯКУТИИ

УДК 575.224.22:616.28-008.14

Проведено молекулярно-генетическое тестирование на наличие мутации m.1555A>G в гене *MT-RNR1* митохондриальной ДНК в состоянии пациентов с нарушениями слуха, проживающих в Якутии, в результате которого мутация m.1555A>G не была выявлена. В целом при объединении данных этой работы с предыдущим исследованием (n=65 и n=108), частота мутации m.1555A>G в Якутии составила 0,57% (1/173), а среди пациентов якутов частота данной мутации оказалась равной 0,92% (1/108). В сравнении с общемировыми данными уточненная нами частота мутации m.1555A>G в Якутии (0,57%) оказалась относительно низкой.

Ключевые слова: глухота, митохондриальный геном, m.1555A>G, *MT-RNR1*, Якутия.

It has been established that the mutation m.1555A>G in the *MT-RNR1* gene in the homoplasmic state is associated with non-syndromic sensorineural hearing loss caused by the use of aminoglycoside antibiotics in many families of different ethnic origin. Earlier, the m.1555A>G mutation was detected on a small sample of patients (n = 65) in Yakutia with a frequency of 1.54%. In this study, we performed a search of the m.1555A>G mutation among additional sample of 108 hearing impaired individuals from Yakutia (Eastern Siberia, Russia). As a result, we found no mutation in this sample. When combining both samples (n=65 and n=108), the m.1555A>G mutation frequency in Yakutia is – 0.57% (1/173), and among the Yakut patients frequency of this mutation is 0.92% (1/108). The frequency of the m.1555A>G mutation among deaf patients in Yakutia is 0.57%, and is relatively low when compared with the global data.

Keywords: hearing loss, mitochondrial genome, m.1555A>G, *MT-RNR1*, Yakutia.

Введение. Мутация m.1555A>G в гене *MT-RNR1* митохондриальной ДНК в состоянии гомоплазмы у пациентов из семей различного этнического происхождения ассоциирована с несиндромальной сенсоневральной тугоухостью, вызванной применением антибиотиков аминогликозидного ряда [3-5, 7, 8, 16]. Действие аминогликозидов основано на связывании с бактериальной 16S рРНК малой субъединицы рибосомы, что приводит к блокированию синтеза белка. При замене аденина на гуанин в позиции 1555 в А-сайте 12S рРНК чело-

века происходит С-Г спаривание, что приводит к сходству с А-сайтом бактериальной 16S рРНК, который является мишенью для аминогликозидных препаратов [6] (рис.1). В настоящее время большинство аминогликозидных препаратов применяются только для лечения тяжелых инфекций, в том числе эндокардита, сепсиса и туберкулеза [3]. Тем не менее во многих развивающихся странах они часто

применяются как препараты широкого спектра действия [9].

Ранее в Якутии в небольшой выборке пациентов с нарушениями слуха (n=65) мутация m.1555A>G была обнаружена с частотой 1,54%, среди пациентов якутов (n=48) – 2,08%, и в контрольной выборке якутов с нормальным слухом (n=120) частота данной мутации составила 0,83% [1]. Полученные данные свидетельствуют об

СВФУ им М.К. Аммосова: **РОМАНОВ Георгий Прокопьевич** – аспирант, gpromanov@gmail.com, **СОЛОВЬЕВ Айсен Васильевич** – аспирант, **РАФАИЛОВ Адюм Михайлович** – к.б.н., доцент, **САЗОНОВ Николай Никитич** – д.б.н., проф., **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП: **БАРАШКОВ Николай Алексеевич** – к.б.н., руковод. лаб., **ТЕРЮТИН Федор Михайлович** – к.м.н., с.н.с., **ПШЕННИКОВА Вера Геннадиевна** – н.с. ИБГ УНЦ РАН (Уфа): **ДЖЕМИЛЕВА Лиля Усеиновна** – д.м.н., с.н.с., **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., директор. **ПОСУХ Ольга Леонидовна** – к.б.н., с.н.с. ФИЦ ИЦиГ СО РАН (Новосибирск).

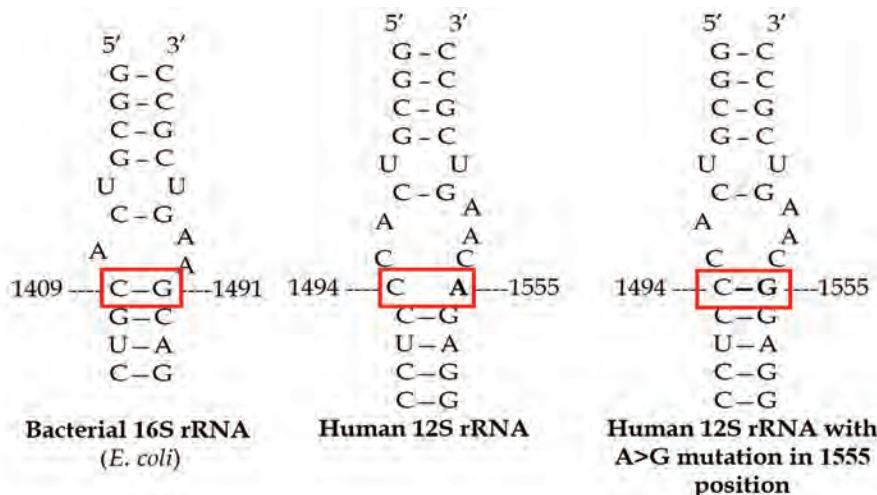


Рис.1. Молекулярно-генетический принцип воздействия аминогликозидных препаратов при мутации m.1555A>G

актуальности проведения профилактической диагностики на наличие мутации *m.1555A>G* перед назначением аминогликозидных антибиотиков индивидуумам, относящимся к коренному населению Якутии. В связи с этим, для уточнения частоты *m.1555A>G* в Якутии необходимо провести скрининг этой мутации на расширенной выборке пациентов с нарушениями слуха.

Цель исследования – уточнение частоты встречаемости мутации *m.1555A>G* гена *MT-RNR1* у глухих пациентов в Якутии.

Материалы и методы исследования. Была сформирована выборка из 108 индивидов с клинически значимыми, преимущественно врожденными, нарушениями слуха (имели инвалидность по слуху) (66 лиц женского пола и 42 – мужского пола) в возрасте от 25 до 63 лет (средний возраст $44,7 \pm 7,1$ года). По этнической принадлежности 60 пациентов были якуты, 20 – русские и 28 чел. других национальностей, либо потомки от смешанных браков.

Нарушение слуха у участников исследования подтверждалось с помощью пороговой тональной аудиометрии с использованием аудиометра «MAICO ST 20» (Германия) по воздушному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 кГц и по костному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0; 4,0 кГц шагом 5,0 дБ. Степень потери слуха оценивали по порогам слышимости лучше слышащего уха в речевом диапазоне частот 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 кГц по международной классификации.

Выделение ДНК из венозной крови производилось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции с ферментативным расщеплением протеиназой К. В данном исследовании использовались материалы банка ДНК Якутского научного центра комплексных проблем. Участок гена *MT-RNR1* митохондриального генома, включающий позицию 1555 п.н., был амплифицирован методом ПЦР при помощи прямого (GCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAA; позиция 1247-

1276 п.н.), и обратного (TTTCCAGTACACTTACCATGTTACGACTGG; позиция 1556-1585 п.н.) олигонуклеотидных праймеров. Обратный праймер является мисматч-праймером, заменяющим А на С в положении 1557, таким образом, при мутации *m.1555A>G* образуется искусственный сайт рестрикции 5'...GG↓CC...3' для эндонуклеазы рестрикции *HaeIII* (рис. 2,В). Визуализация результатов ПЦР-ПДРФ анализа производилась при помощи электрофоретического разделения продуктов рестрикции в 3%-ном агарозном геле с бромистым этидием в УФ-свете.

Все исследования, предусмотренные рамками настоящей работы, проводились с письменного информированного согласия участников. Данная научно-исследовательская работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ «ЯНЦ КМП» (г. Якутск, протокол № 41 от 12 ноября 2015 г.).

Результаты и обсуждение. В результате проведенного молекулярно-

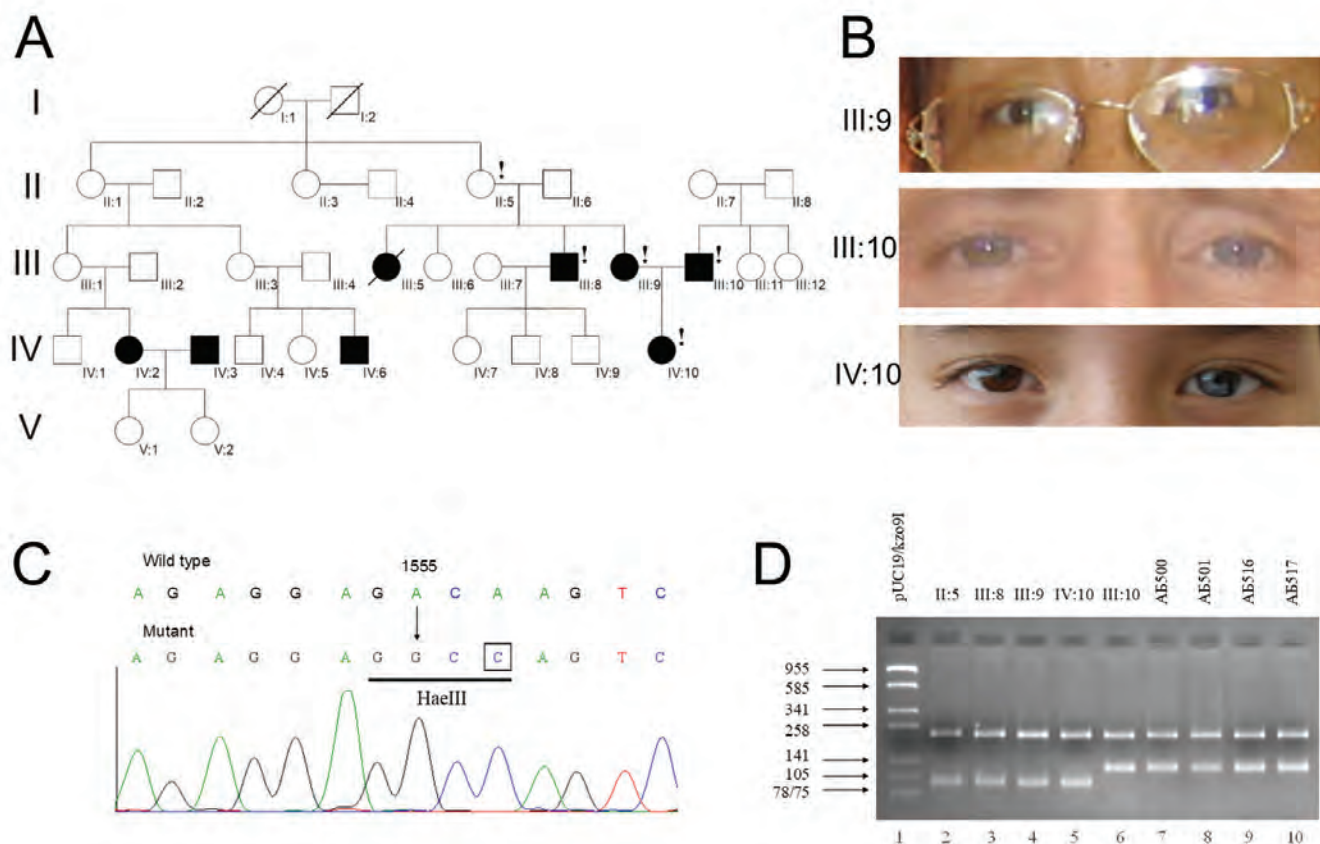


Рис.2. А. Фрагмент родословной семьи пробанда (IV:10), черным выделены пациенты с нарушением слуха, знаком «!» указаны члены родословной, протестированные на мутацию *m.1555A>G*. Б. Гетерохромия радужной оболочки глаз у пробанда (IV:10) и у отца пробанда (III:10), у матери (III:9) гетерохромия радужной оболочки не наблюдается. В. Результаты секвенирования гена *MT-RNR1* у пробанда (IV:10): Wild type – нормальная последовательность, mutant – последовательность, содержащая мутацию *m.1555A>G*. Стрелкой показана нуклеотидная позиция мутации, квадратом выделен нуклеотид, замененный в структуре обратного мисматч-праймера, линией отмечен сайт рестрикции *HaeIII*. Г. Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ анализа мутации *m.1555A>G* в 3% агарозном геле. В норме визуализируются бэнды размером 218 и 121 п.н., при мутации *m.1555A>G* образуются бэнды в 218, 91 и 30 п.н. (фрагмент 30 п.н. не визуализируется); дорожка 1 – маркер молекулярного веса pUC19/kzo9I; дорожки 2-5 – образцы, содержащие *m.1555A>G* в состоянии гомоплазии; дорожки 6-10 – образцы с нормальной последовательностью

генетического исследования среди 108 индивидов с нарушениями слуха мутация m.1555A>G гена *MT-RNR1* у них не была обнаружена (0/108). В целом, при объединении результатов предыдущего [1] и настоящего исследования, частота мутации m.1555A>G среди глухих индивидов в Якутии составила 0,57% (1/173), а среди пациентов якутов частота данной мутации оказалась равной 0,92% (1/108).

Для сопоставления полученных нами данных с литературными был проведен анализ мировой распространенности мутации m.1555A>G. Для этого были использованы литературные данные, опубликованные в период с 1999 по 2016 г. [список источников (42) доступен по запросу]. Проанализированные нами работы включали различные по масштабу выборки (от 33 до 2417 чел.). Проведенный анализ показал, что частота мутации m.1555A>G среди пациентов с нарушениями слуха в различных частях мира варьирует в широких пределах (Австралия – 0,27%, Америка – 0,72, Африка – 0,97, Европа – 1,62, Азия – 4,42%) [данные доступны по запросу]. Мировой максимум встречаемости m.1555A>G среди пациентов был зарегистрирован в Испании – 20% [10], а также высокая частота встречаемости m.1555A>G отмечена в Марокко – 3,6 [14], в Китае – 5,1 [2], Индонезии – 5,3 [15] и Японии – 5,4% [12]. Среди российских пациентов, помимо Якутии, мутация m.1555A>G ранее была зарегистрирована только в выборке из Санкт-Петербурга с частотой 0,8% и не обнаружена в Республике Алтай и популяции Волго-Уральского региона [1].

Также нами был проведен дополнительный клинико-генеалогический и молекулярно-генетический анализ семьи [1], у членов которой была идентифицирована мутация m.1555A>G. Была выявлена различная пенетрантность потери слуха в данной семье. Бабушка пробанда (II:5) имеет мутацию m.1555A>G, но слух у нее нормальный (рис. 2,А), возможно, потому, что она не принимала аминогликозидные препараты. Две двоюродные сестры матери пробанда (III:1 и III:3) также имеют нормальный слух, но у обеих есть глухие дети (не тестированы) (рис. 2,А). Возможно, варьирующая пенетрантность патологии слуха в этой семье обусловлена приемом антибиотиков аминогликозидного ряда.

Кроме того, наряду с потерей слуха, у пробанда (IV:10) наблюдается гетерохромия радужной оболочки глаз,

которая также имеется и у отца пробанда (III:10), а мать пробанда (III:9) имеет нормальную окраску радужной оболочки глаз (рис. 2,Б). Ранее сообщалось о возможной ассоциации m.1555A>G с синдромом Ваарденбурга [11, 13], признаками которого являются глухота, телекант, сросшиеся брови и частичный альбинизм [17]. В исследовании [13] сообщалось о пациенте с более светлой пигментацией кожи и волос, чем у других родственников. В настоящей работе нами были дополнительно протестированы три других члена этой семьи: отец (III:10), дядя (III:8) и бабушка (II:5) пробанда (рис. 2,Г). Среди них m.1555A>G не была выявлена только у отца пробанда (III:10), у которого причина потери слуха остается неизвестной и, возможно, связана с синдромом Ваарденбурга. Таким образом, в исследованной нами семье гетерохромия радужных оболочек глаз у пробанда (IV:10) не связана с мутацией m.1555A>G, поскольку пробанд унаследовал гетерохромии глаз от отца (III:10), не имеющего данной мутации.

Выводы. Частота мутации m.1555A>G гена *MT-RNR1* среди глухих пациентов в Якутии составляет 0,57%, и при сопоставлении с общемировыми данными является относительно низкой.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность всем участникам исследования, а также сотрудникам Якутского отделения Всероссийского общества глухих за помощь в сборе материала и услуги сурдоперевода: Л.А. Николаевой, О.Н. Гарюхиной и Е.Д. Скрыбиной.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (15-04-04860_а, 16-34-00564_мол_а, 16-34-00234_мол_а), НОФМУ №201604010214, госзадания Минобрнауки РФ №6.1766.2017 ПЧ и проекта ПНИ ФАНО России №556.

Литература

1. Анализ генов 12SrRNA и tRNAser(ucn) мтДНК у больных несиндромальной сенсоневральной тугоухостью/глухотой из различных регионов России / Л.У. Джемилева, О.Л. Посух, А.М. Тазетдинов [и др.] // Генетика. – 2009. – № 7. – С. 982-991.
2. Analysis of mitochondrial 12S rRNA and tRNAser(UCN) genes in patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss from various regions of Russia / L. U. Dzhemilova, O. L. Posukh, A. M. Tazetdinov [et al.] // Russian Journal of Genetics. – 2009. – № 7. – P. 861-869.
3. Analysis of a large-scale screening of mitochondrial DNA m.1555A>G mutation in 2417 deaf-mute students in northwest of China / Y.F. Guo, X.W. Liu, B.C. Xu [et al.] // Genet Test Mol Biomarkers. – 2010. – № 4. – P. 527-531.

3. Avent M.L. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity / M.L. Avent, B.A. Rogers, A.C. Cheng, D.L. Paterson. // Intern Med J. – 2011. – № 6. – P. 441-449.

4. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss / R. Li, G. Xing, M. Yan [et al.] // Am J Med Genet A. – 2004. – № 2. – P. 113-117.

5. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides / X. Estivill, N. Govea, E. Barcelo [et al.] // Am J Hum Genet. – 1998. – № 1. – P. 27-35.

6. Hamasaki K. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness / K. Hamasaki, R.R. Rando // Biochemistry. – 1997. – №36. – P.12323-12328.

7. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss / F.J. del Castillo, M. Rodriguez-Ballesteros, Y. Martin [et al.] // J Med Genet. – 2003. – № 8. – P. 632-636.

8. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness / T.R. Prezant, J.V. Agopian, M.C. Bohlman [et al.] // Nat Genet. – 1993. – № 3. – P. 289-294.

9. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss / Z. Li, R. Li, J. Chen [et al.] // Hum. Genet. – 2005. – № 1. – P. 9-15.

10. Mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) and in the GJB2 (connexin 26) gene are not modifiers of the age at onset or severity of hearing loss in Spanish patients with the 12S rRNA A1555G mutation / N. Lyppez-Bigas, R. Rabionet, E. Martinez [et al.] // Am J Hum Genet. – 2000. – № 4. – P. 1465-1467.

11. Myelocystocele-cloacal exstrophy in a pedigree with a mitochondrial 12S rRNA mutation, aminoglycoside-induced deafness, pigmentary disturbances, and spinal anomalies / J.S. Nye, E.A. Hayes, M. Amendola [et al.] // Teratology. – 2000. – № 61. – P. 165-171.

12. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients / S. Usami, S. Abe, J. Akita [et al.] // J Med Genet. – 2000. – № 1. – P. 38-40.

13. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA Ser(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients / R.S. Abreu-Silva, K. Lezirovitz, M.C.C. Braga [et al.] // Braz J Med Biol Res. – 2006. – № 2. – P. 219-226.

14. Prevalence of the mitochondrial A1555G mutation in Moroccan patients with non-syndromic hearing loss / H. Nahili, R. Charif, R. Boulouiz [et al.] // Int J Pediatr Otorhinolaryngol. – 2010. – № 9. – P. 1071-1074.

15. Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia / S.G. Malik, N. Pieter, H. Sudoyo [et al.] // J Hum Genet. – 2003. – № 9. – P. 480-483.

16. Selimoglu, E. Aminoglycoside-induced ototoxicity / E. Selimoglu // Curr Pharm Des. – 2007. – № 1. – P. 119-126.

17. Waardenburg, P.J. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness / P.J. Waardenburg // Am J Hum Genet. – 1951. – № 3. – P. 195-253.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>