

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.

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. Nikopenius, 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, gromanov@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).

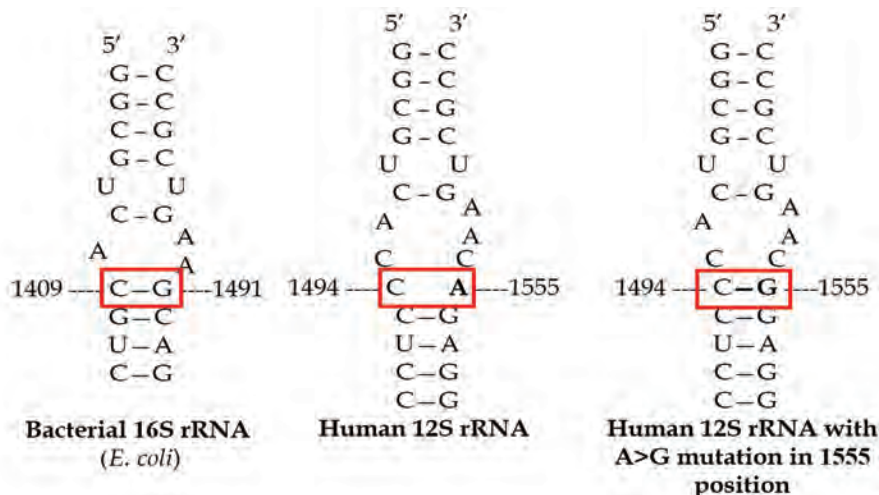


Рис.1. Молекулярно-генетический принцип воздействия аминогликозидных препаратов при мутации m.1555A>G

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 (GCTCAGCCTATATA CCGCCATCTTCAGCAA; позиция 1247-

1276 п.н.), и обратного (TTTCCAGTAC ACTTACCATGTTACGACTGG; 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-

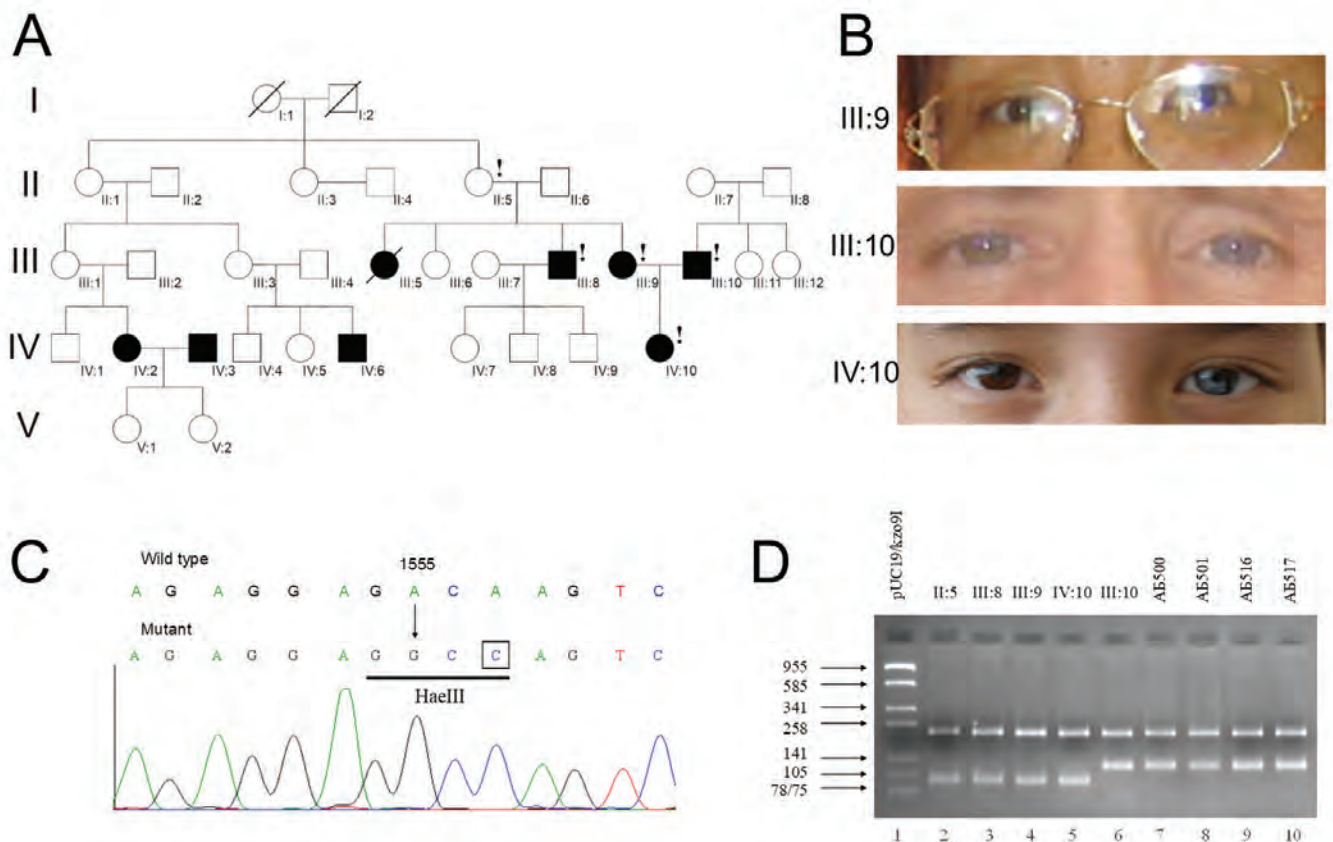


Рис.2. А. Фрагмент родословной семьи пробанда (IV:10), черным выделены пациенты с нарушением слуха, знаком «!» указаны члены родословной, протестированные на мутацию *m.1555A>G*. Б. Гетерохромия радужной оболочки глаз у пробанда (IV:10) и у отца пробанда (III:10), у матери (III:9) гетерохромия радужной 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 индивидуумов 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 популяциях 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 гетерохромия 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. Скрабиной.

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 tRNAs_{er}(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 tRNAs_{er}(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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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. Lopey-Bigas, R. Rabionet, E. Martinez [et al.] // Am J Hum Genet. – 2000. – № 4. – P. 1465-1467.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

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

16. 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.

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

18. 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/>