

Фармакогенетика аминогликозидной тугоухости

Ю. Б. Белоусов¹, М. Г. Абакаров¹, М. М. Магомедов²

¹ — Кафедра клинической фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакокинетики ФУВ ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Москва

² — Кафедра отоларингологии ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Москва

Поводом для генетических исследований при аминогликозидной тугоухости явилось появление в литературе описания семейных случаев тугоухости, развившихся в результате применения аминогликозидных антибиотиков (АГ), вначале в Японии в 1957 году [1], а затем и в других странах [2,3,4]. В. Konigsmark и А. Gorlin в 1976 году [4] предположили, что при аминогликозидной тугоухости имеет место аутосомно-доминантное наследование с неполной пенетрантностью, а по другим данным, сцепленный с полом, передающийся по материнской линии дефект ДНК, кодирующей митохондриальные ферменты [1]. Д. Ни с соавт. [5] описали в Китае 36 семей с наследственной предрасположенностью к аминогликозидной тугоухости, где носителем дефектного гена были матери. Они также пришли к заключению, что причиной предрасположенности является дефект митохондриальных ферментов.

Поводом для генетических исследований при аминогликозидной тугоухости явилось появление в литературе описания семейных случаев тугоухости, развившихся в результате применения аминогликозидных антибиотиков (АГ), вначале в Японии в 1957 году [1], а затем и в других странах [2, 4]. В. Konigsmark и R. Gorlin в 1976 году [4] предположили, что при аминогликозидной тугоухости имеет место аутосомно-доминантное наследование с неполной пенетрантностью, а по другим данным, сцепленный с полом, передающийся по материнской линии дефект ДНК, кодирующей митохондриальные ферменты [1]. Д. Ни с соавт. [5] описали в Китае 36 семей с наследственной предрасположенностью к аминогликозидной тугоухости, где носителем дефектного гена были матери. Они также пришли к заключению, что причиной предрасположенности является дефект митохондриальных ферментов.

В 1993 году у 15 членов 3-х китайских семей с материнским типом наследования тугоухости Т. Prezant с соавт. [6] идентифицировали мутацию A1555G в 12S РНК, которая не была обнаружена у 278 человек контрольной группы. Впоследствии та же самая мутация была найдена в семьях с тугоухостью, вызванной АГ, в Японии, Заире, Испании, Израиле, причем и у лиц с тугоухостью, развившейся без предшествующего лекарственного анамнеза [7-9]. Это позволило авторам сделать предположение, что применение АГ в большинстве случаев является одним из пусковых механизмов для фенотипического выражения этой

мутации, т. е. вместо факторов внешней среды, таких как аминогликозиды, могут выступать аллельные варианты ядерных генов, которые, взаимодействуя с мутацией A1555G способны ускорить развитие слуховых расстройств.

В 1995 году С. Vacino с соавт. [10] у 5 итальянцев, находящихся в родстве по материнской линии и ставших глухими после лечения АГ, идентифицировали еще одну мутацию в 12S РНК, которая была обозначена как DT9HCN.

Отмечена клиническая вариабельность в фенотипическом выражении ототоксичности у лиц с A1555G мутацией. С одной стороны, относительно быстрое развитие серьезных нарушений слуха у членов китайских семей после введения небольших доз АГ и незначительные нарушения слуха и шум в ушах, с другой у 3 из 7 пациентов из США. В одном случае наблюдалось прогрессивное снижение слуха с исходом в глухоту через 17 лет после введения АГ [8].

Молекулярный анализ у 41 американских пациентов с тугоухостью, развившейся после применения АГ показал, что только 7 пациентов (17%) имели мутацию A1555G. У 4 из них в семейном анамнезе имелось указание на развитие тугоухости с тем же диагнозом у лиц, находящихся в родстве с ними по материнской линии [8].

Имеются данные, хотя и немногочисленные, что описанные мутации предполагают токсическое повреждение волосковых клеток (ВК) нейроэпителия улитки без вовлечения в процесс вестибулярной системы [11-13].

Интересно и важно, что мутация A1555G находится точно в области гена, для которого были описаны мутации резистентности в дрожжах и *Tetrahymena*, а также зарегистрировано связывание аминогликозидного антибиотика с бактерией [14-16]. Это означает, что в результате мутации у человека митохондриальный ген 12Sг РНК в этой области становится подобным рибосомному гену РНК бактериальной клетки. Другими словами, действие АГ на волосковые клетки у лиц с описанной мутацией подобно действию антибиотика на бактериальную клетку.

На генетические исследования возлагают большие надежды, поскольку разгадка молекулярных механизмов АГ тугоухости помогла бы выделить те части лекарственного средства, которые являются необходимыми для бактерицидной активности, и те, которые являются ответственными за ототоксичность.

Данные генетических исследований объясняют еще одну особенность действия аминогликозидов на кортиева орган: различия в механизмах, темпах развития и прогнозе острых и хронических слуховых расстройств.

Первые не связаны с генетической мутацией и связаны со способностью аминогликозидов вызывать блокаду кальциевых каналов N — и P/Q типа и антагонизмом с кальцием за места связывания на клеточной мембране [17]. Способность АГ вытеснять кальций из мест его связывания свидетельствует о некотором кальций-зависимом физиологическом механизме, потенциально восприимчивом к этим лекарствам. Электростатические мембранные взаимодействия и антагонизм кальция могут также объяснять экспериментальные эффекты на микрофонный потенциал улитки. В латеральной стенке органа острое подавление микрофонного потенциала стрептомицином могло быть полностью устранено промыванием раствором с высоким содержанием хлорида кальция [18]. Аналогично, угнетение кохлеарного микрофонного потенциала при введении гентамицина в перилимфатическое пространство также может быть восстановлено насыщенным раствором хлорида кальция [19]. Преходящее ослабление кохлеарных вызванных потенциалов после внутривенного вливания гентамицина у пациентов может быть также основано на антагонизме с кальцием в плазматической мембране [20]. Эти острые эффекты, связанные с блокадой входа кальция в волосковые клетки, наблюдаются также *in vitro* [21], и по механизмам развития не связаны с хроническими расстройствами слуха, вызванными действием лекарств.

Аминогликозиды в относительно низких концентрациях (приблизительно 50 мкг/л) также блокируют канал трансдукции в наконечниках stereocilia [22, 23]. Это действие непосредственно не ведет к смерти волосковых клеток [24], которая происходит только при более высоких концентрациях (например, 0,5-1 мг/л) в культурах эксплантата [25]. Кроме того, смерти клетки предшествует поглощение лекарственного средства в клетки [26, 27]. По мнению авторов,

эффект на канал трансдукции не может объяснять различную чувствительность между популяциями волосковых клеток в том же самом эпителии (внутренний против внешних волосковых клеток: вестибулярный тип I против клеток II типа).

В случае хронических слуховых расстройств клетки погибают по механизму апоптоза [28] — запрограммированной смерти клеток [29]. В настоящее время не существует доказательств, что АГ стимулируют (инициируют) апоптоз непосредственно, в результате участия АГ в биохимических механизмах функционирования ВК [30]. Однако в качестве биохимического механизма, вызывающего морфологические изменения, характерные для апоптоза, в литературе активно обсуждается роль свободно-радикального окисления липидов биомембран, белков и ДНК. Предполагается, что эти и другие компоненты клетки в результате окисления будут структурно изменены и функционально инактивированы: митохондрии при этом являются одним из наиболее важных мишеней. Развитие процессов по такому сценарию может вызвать повышение входа кальция в клетку и активировать протеолитические ферменты лизосом, что способно вызвать активацию факторов транскрипции, регулирующих экспрессию гена в механизмах апоптоза [31]. Возможность гибели ВК по описанному сценарию обосновывается результатами исследований, которые показали, что АГ способны образовывать хелатные комплексы с железом, который активизирует свободно-радикальное окисление в ВК, а антиоксиданты, такие как глутатион и фермент супероксид-дисмутаза, оказывали заметное защитное действие на ВК в экспериментах на животных [32-35]. Первичное событие, происходящее непосредственно после образования хелатного комплекса аминогликозида с железом, остается загадкой [30].

Действительно, при моделировании нейросенсорной тугоухости, морфологические изменения во внутреннем ухе воспроизводятся далеко не у всех животных. Например, *in vivo* у морских свинок АГ надежно воспроизводят ототоксические эффекты, которые имеют дозозависимый характер [36], но те же дозы антибиотиков не вызывали каких-либо нарушений у мышей, белой и песчаной крыс [37, 38]. В тоже время, в органотипической культуре, эксплантаты зрелых вестибулярных органов морских свинок, мышей и песчаной крысы были практически одинаково чувствительны к токсическому повреждению гентамицином [39]. Еще в ранних исследованиях, посвященных изучению ототоксичности АГ, указывалось [40-42], что у животных для достижения воспроизводимых вестибулярных и слуховых расстройств требуются дозы значительно более высокие, чем те, которые применяются в клинических условиях. Например, кошкам для изучения ототоксических эффектов стрептомицина вводили дозы до 0,8 г/кг в сутки [41, 42], тогда как в клинике суточная доза стрептомицина обычно не превышает 1 г. Это, с одной стороны, важный аргумент против экстраполяции на человека данных, получен-

ных в экспериментальных условиях, с другой, оставляет открытым вопрос о выборе адекватной животной модели как для исследования механизмов ототоксичности, так и, что особенно важно, для разработки методов профилактики и лечения обсуждаемых осложнений лекарственной терапии.

В настоящее время становится очевидным, что в основе побочного действия аминогликозидов на нейроэпителий волосковых клеток с исходом в хроническую тугоухость лежит механизм идиосинкразии. В ранних работах по изучению механизмов побочного действия аминогликозидов на внутреннее ухо, эти эффекты объяснялись токсичностью в связи кумуляцией антибиотиков в тканях и жидкостях кортиевого органа [40]. В последующем было показано, что концентрация АГ в перилимфе и эндолимфе не превышает 1/10 пиковых значений концентрации в сыворотке крови, а период полувыведения из тканей и жидкостей внутреннего уха может превышать 30 дней (против 3-5 часов в сыворотке крови) [43]. С другой стороны, концентрация в тканях внутреннего уха имеет тот же самый порядок величины, как и концентрация в тканях других органов, на которые АГ не оказывают токсического действия [44], а концентрации, достигнутые во внутреннем ухе различными антибиотиками, не коррелируют с величиной их ототоксического потенциала [45]. Можно было бы ожидать, что антибиотики с преимущественной вестибулотоксичностью должны достигать более высоких концентраций в вестибулярной системе, чем в улитке и наоборот. Однако этого подтвердить не удалось [46].

Волосковые клетки слуховой и вестибулярной систем реагируют на аминогликозидные антибиотики как после системного, так и местного применения [6]. Однако при радиоиммунном и цитохимическом исследовании АГ обнаруживали в поддерживающих клетках базальной мембраны и до некоторой степени в тканях латеральной стенки без признаков их токсического

поражения [47-50]. Гентамицин может быть обнаружен в ВК улитки намного раньше, чем могут быть выявлены расстройства слуха [9], а по другим данным, ВК выживали даже при том, что он обнаруживался внутри клеток нейроэпителия через 11 месяцев после прекращения лечения [51]. Эти исследования показали, что в случае с повреждением нейроэпителия аминогликозидами простой корреляции между присутствием лекарственного средства и его тропностью к отдельным структурам внутреннего уха не существует и речь, следовательно, идет об идиосинкразии к аминогликозидам. В соответствии с современными представлениями, идиосинкразия — это наследственная, качественно необычная реакция на лекарственное вещество, как правило, обусловленная генетическими аномалиями и характеризующаяся резко повышенной чувствительностью к соответствующему препарату с необычайно сильным и (или) продолжительным эффектом [52], а в основе идиосинкразии лежат реакции, обусловленные наследственными дефектами ферментных систем [53, 54]. Хотя ферменты, ответственные за развитие идиосинкразии к аминогликозидным антибиотикам, в настоящее время неизвестны, идентификация некоторых генетических мутаций, сопряженных с высокой чувствительностью слухового и вестибулярного аппаратов к аминогликозидам (они обсуждались выше), является важным аргументом в пользу данного утверждения.

Уточнение фармако-генетических механизмов нейросенсорной тугоухости имеет важное практическое значение, поскольку позволит, во-первых, отказаться от необоснованной и, как правило, неэффективной фармакотерапии с целью устранения побочных эффектов аминогликозидов, во вторых, ставит задачу разработки экспресс методов раннего выявления идиосинкразии к аминогликозидам, следовательно, и своевременной профилактики, что, на наш взгляд, вполне достижимо.

Литература

1. Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. Clin Genet 1989; 35: 433-436.
2. Prazic M., Salaj B., Subotic R. Familial sensitivity to streptomycin. J Laryngol Otol 1964; 78:1037-1043.
3. Tsuiji T., Murai S. Familial incidence of streptomycin hearing loss and hereditary weakness of the cochlea. Audiology 1971; 10: 315-322.
4. Konigsmark B.W., Gorlin R.J. Genetic and metabolic deafness. W.B. Saunders Co., 1976; 364-365.
5. Hu D.N., Qiu W.Q., Wu B.T., Fang L.Z., Zhou F., Gu Y.P., Zhang Q.H., Yan J.H., Ding Y.Q., Wong H. Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. J Med Genet 1991; 28: 79-83.
6. Prezant T.R., Agopian J.V., Bohlman M.C., Bu X., Ozlas S., Qiu W.-Q., Arnos K.S., Cortopassi G.A., Jaber L., Rotter J.I., Shohat M., and Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nature Gen 1993; 4: 289-294.
7. Fischel-Ghodsian N., Prezant T.R., Bu X., Ozlas S. Mitochondrial ribosomal RNA mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. Am J Otolaryngol 1993; 16: 403-408.
8. Fischel-Ghodsian N., Prezant T.R., Chalraw W., Wendt K.A., Nelson R.A., Arnos K.S., Falk R.E. Mitochondrial gene mutations: a common predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. Am J Otolaryngol 1997; 18:173-178.
9. Hutchin T., Haworth I., Higashi K., Fischel-Ghodsian N., Stoneking M., Saha N., Arnos C., Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. Nucleic Acids Res 1993; 21:4174-4179.
10. Bacino C.M., Prezant T.R., Bu X., Fournier P., Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. Pharmacogenetics 1995; 5:165-172.
11. Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial genetics and hearing loss - the missing link between genotype and phenotype. Proc Soc Exp Biol and Med 1998; 218, 1-6.
12. Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss - paradigm for mitochondrial genetics. Am J Hum Genet 1998; 62: 15-19.
13. Braverman I., Jaber L., Levi H., Adelman C., Arnos K.S., Fischel-Ghodsian N., Shohat M., and Elidan J. Audio-vestibular findings in patients with deafness caused by a mitochondrial susceptibility mutation and precipitated by an inherited nuclear mutation or aminoglycosides. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 122: 1001-1004.
14. Gravel M., Melancon P., Brakier-Gingras L. Cross-linking of streptomycin to the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. Biochemistry 1987; 26: 6227-6232.
15. Li M., Tzagaloff A., Underbrink-Lyon K., Martin N.C. Identification of the paromomycin-resistance mutation in the 15S rRNA gene of yeast mitochondria. J Biol Chem 1982; 257:5921-5928.
16. Spangler E.A., Blackburn E.H. The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin. J Biol Chem 1985; 260: 6334-6340.

17. Corrado A.P., de Moraes I.P., Prado W.A. Aminoglycoside antibiotics as a tool for the study of the biological role of calcium ions: Historical overview. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1989; 39: 419-430.
18. Wersall J., Flock A. Suppression and restoration of the microphonic output from the lateral line organ after local application of streptomycin. *Life Sci* 1964;3:1151-1155.
19. Takada A., Schacht J. Calcium antagonism and reversibility of gentamicin-induced loss of cochlear microphonics in the guinea pig. *Hear Res* 1982; 8:179-186.
20. Ramsden R.T., Wilson P., Gibson W. Immediate effects of intravenous tobramycin and gentamicin on human cochlear function. *J Laryngol Otol* 1980; 94:521-531.
21. Dulon D., Zajic G., Aran J.-M., Schacht J. Aminoglycoside antibiotics impair calcium-entry but not viability and motility of cochlear outer hair cells. *J Neurosci Res* 1989; 24:338-346.
22. Kroese A.B.A. van den Bercken J. Effects of ototoxic antibiotics on sensory hair cell functioning. *Hear Res* 1982;6:183-197.
23. Kroese A.B.A., Das A., Hudspeth A.J. Blockage of the transduction channels of hair cells in the bull frog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res* 1989; 37:203-218.
24. Kossi M., Richardson G.P., Russell U. Stereocilia bundle stiffness: Effects of neomycin, A23187 and concanavalin A. *Hear Res* 1990; 44: 217-230.
25. Richardson G.P., Russell U. Cochlear culture as a model system for studying aminoglycoside-induced Ototoxicity. *Hear Res* 1991; 53: 293-311.
26. Hiel H., Errc J., Auroousseau C., Bouali R., Dulon D., Aran J.M. Gentamycin uptake by cochlear hair cells precedes hearing impairment during chronic treatment. *Audiology* 1993;32:78-87.
27. Richardson G.P., Forge A., Kros C.J., Fleming J., Brown S.D.M., Steel K.P. Myosin VIIA is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells. *J Neurosci* 1997; 17: 9506-9519.
28. Nakagawa T., Yamane H., Takayama M., Sunami K., Nakai Y. Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following aminoglycoside treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998; 255:127-131.
29. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. Обзор литературы. Пат. физиол. и экск. терапия. 1998; 2 : 38-48.
30. Forge A., Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurotol* 2000; 5:3-22.
31. Satoh T., Enokido Y., Kubo T., Yamada M., Hatanaka H. Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1998;18:649-666.
32. Tan S., Sagara Y., Liu Y., Maher P., Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998;141:1423-1432.
33. Garret S.L., Rhee D.J., Schacht J. Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig *in vivo*. *Hear Res*. 1994b;77:75-80
34. Lautermann J., McLaren J., Schacht J. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear Res* 1995; 86:15-24.
35. Priuska E.M. Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1749-1752.
36. Li L., Forge A. Cultured explants of the vestibular sensory epithelia from adult guinea pigs and effects of gentamicin: A model for examination of hair cell loss and epithelial repair mechanisms. *Aud Neurosci* 1995; 1:111-125.
37. Brumett R.E., Fox K.E. Studies of aminoglycoside ototoxicity in animal models: В кн.: Welton A. Neu HC и др.: The Aminoglycosides. Microbiology, Clinical Use and Toxicology. New York, Marcel Dekker Inc., 1997; 419-451.
38. Henry K.R., Chole R.A., McGinn M.D., Frush D.P. Increased ototoxicity in both young and old mice. *Arch Otolaryngol* 1981; 107: 92-95.
39. Edwards J. Species Differences in susceptibility to aminoglycoside ototoxicity; MSc thesis University College London, 1997; 388-454.
40. Шантuroв А.Г., Сеников М.В. Ототоксическое действие антибиотиков Иркутск, Восточно-сибирское книжн.изд-во, 1980; 168.
41. Hawkins J., Lurie M. The ototoxicity of streptomycin. *Ann.Otol.,Rhinol.,Laryngol.*, 1952; 61: 3: 789-809.
42. Hawkins J., Hohwey N., Lurie M. The ototoxicity of dihydrostreptomycin and neomycin in the cat. *Ann. Otol., Rhinol. a. Laryngol.*, 1953; 62: 8.
43. Tran Ba Huy P. Bernard P., Schacht J. Kinetics of gentamicin uptake and release in the rat: Comparison of inner ear tissues and fluids with other organs. *J Clin Invest* 1986; 77:1492-1500.
44. Henley C.M., Schacht J. Pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in blood, inner-ear fluids and tissues and their relationship to ototoxicity. *Audiology* 1988; 27:137-146.
45. Ohtsuki K., Ohtani I., Aikawa T., Sato Y., Anzai T., Ouchi J., Saito J. The Ototoxicity and the accumulation in the inner ear fluids of the various aminoglycoside antibiotics. *Ear Res Jpn* 1982;13:85-87.
46. Dulon D., Aran J., Zajic G., Schacht J. Comparative uptake of gentamicin, netilmicin. and amikacin in the guinea pig cochlea and vestibule. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:96-100.
47. Balogh K., Hiraide F., Ishii D. Distribution of radioactive dihydrostreptomycin in the cochlea. *Ann Otol Rhinol* 1970;79:641-652.
48. De Groot J.C., Meeuwse F., Ruizendaal W.E., Veldman J.E. Ultrastructural localisation of gentamicin in cochlea. *Hear Res* 1990; 50: 35-42.
49. Hayashida T., Nomura Y., Iwamori M., Nagai Y., Kurata T. Distribution of gentamicin by immunofluorescence in the guinea pig inner ear. *Arch Otorhinolaryngol* 1985; 242: 257-264.
50. Hiel H., Errc J., Auroousseau C., Bouali R., Dulon D., Aran J.M. Gentamicin uptake by cochlear hair cells precedes hearing impairment during chronic treatment. *Audiology* 1993; 32: 78-87.
51. Aran J.M., Dulon D., Hiel H., Eire J.P. Auroousseau C.; Darrouzet J. L'ototoxicite d'aminosides: resultats recents sur la captation et la clairance de la gentamicine par les cellules sensorielles du iimacon osseu.x. *Rev Laryngot Otol Rhinol (Bord)* 1993; 114: 125-128.
52. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клиническая фармакология: Т. 2, М.: Медицина, 1991; 704.
53. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии. Под ред. Ю.Б.Белюсова, М.В.Леоновой. М.: Бионика, 2002; 368.
54. Скакун Н.П. Клиническая фармакогенетика. Киев, Здоров'я, 1981; 200.