

УДК 616.36-008:662.357.181]-056.7-076

Е.В. Хомутов, М.С. Кишеня, А.И. Кисс, Д.А. Иващенко, И.М. Гандак

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА

Синдром Жильбера (СЖ) известен более 100 лет, впервые был описан как «простая семейная холемиа» или доброкачественная гипербилирубинемия [1]. В МКБ-10 рассматривается как хроническая негемолитическая гипербилирубинемия, код Е 80.4 – синдром Жильбера. В европейской популяции встречается у 2-10% населения, в странах Ближнего Востока и Африки распространенность СЖ составляет 12-36%, достигая в некоторых этнических группах 50% [2]. Диагностируется чаще у мужчин, чем у женщин, соотношение составляет – 3:1 [3]. СЖ – наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефектом промоторной области гена UGT1A1, кодирующего фермент уридиндифосфат-глюкуронилтрансферазу (УДФ-ГТ1). УДФ-ГТ1 являясь ключевым ферментом метаболизма билирубина, регулирует реакцию глюкуронизации билирубина, в результате которой непрямая фракция данного соединения переводится в водорастворимую прямую фракцию – билирубинмоно- и диглюкуронидов [4].

Генетическим дефектом при СЖ является динуклеотидная инсерция в области ТА-повтора в промоторе гена UGT1A1 в гомо- или гетерозиготном состояниях. Шесть ТА-повторов А(ТА)₆ТАА в промоторе соответствуют нормальной функциональной активности фермента УДФ-ГТ1; увеличение числа ТА-повторов до 7 в гомозиготном состоянии приводит к снижению функциональной активности УДФ-ГТ1 примерно на 30%, обуславливая гипербилирубинемия [5]. В связи с тем, что УДФ-ГТ1 принимает участие в метаболизме некоторых лекарственных препаратов, у лиц с наличием инсерции ТА-повторов в гомо- или гетерозиготном состояниях в промоторе гена UGT1A1 возможна манифестация СЖ с развитием токсических реакций при приеме лекарств, таких как рифампицин, ампициллин, сульфаниламиды, диакарб, статиты, ибупрофен, глюкокортикостероиды, иринотекан [6]. Диагностика СЖ методом генотипирования полиморфизма гена UGT1A1 в настоящее время является актуальной в связи с клинически значимыми проявлениями гипербилирубинемии но-

ворожденных, а также с необходимостью диспансерного наблюдения пациентов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование генотипа UGT1A1 у больных с СЖ и его влияние на клинические проявления заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явились образцы ДНК, полученные от 253 пациентов, наблюдавшихся у гастроэнтеролога и прошедших обследование в ЦНИЛ ФГБОУ ВО ДонГМУ им. М. Горького в период с 2013 по 2024 гг. Среди пациентов было 85 женщин и 168 мужчин в возрасте от 15 до 46 лет. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004). Все участницы исследования подписывали добровольное информированное согласие. Выделение ДНК из периферической крови было произведено с использованием реактива «ДНК-экспресс» (НПО «Литех», Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) исследуемого фрагмента ДНК проводили на программируемом термоциклере Терцик-МС2 («ДНК-технология» Россия) с использованием наборов «SNP UGT1A1» (НПО «Литех», Россия). С каждым образцом выделенной ДНК проводили амплификацию с двумя аллель-специфическими праймерами, соответственно контекста SNP UGT1A1. Готовили две ПЦР-смеси для аллелей «норма» и «мутация», содержащие по 17,5 мкл разбавителя, по 2,5 мкл реакционной смеси, содержащей праймеры для аллелей «норма» и «мутация», 0,2 мкл Taq-полимеразы, вносили 5 мкл образца ДНК под слой минерального масла. В качестве отрицательного контрольного образца использовали разбавитель. Амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C – 1 мин, затем 35 циклов смены температур: 94°C – 10 сек, темпера-

© Е.В. Хомутов, М.С. Кишеня, А.И. Кисс, Д.А. Иващенко, И.М. Гандак, 2024

© Университетская Клиника, 2024

тура отжига праймеров 64°C – 10 сек, элонгация цепи 72°C – 20 сек; финальная элонгация 72°C – 10 мин. Результаты амплификации оценивали в 3%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия и сканированием в УФ-трансиллюминаторе при длине волны 312 нм «TFX-20.M» («Vilber Lourmat», Франция) (см. рис.).

В сыворотке крови пациентов определяли уровень билирубина, аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы с использованием наборов «LaChema» (Чехия), измерением оптической плотности на спектрофотометре «Sperecord» (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении генетического анализа в группе больных были получены следующие результаты: частота аллеля A(TA)6TAA составила 40,6% (n=103), частота аллеля A(TA)7TAA – 59,4% (n=150). Анализ генотипов (см. табл.) показал, что 62 пациента из 253 (24,5%) были гомозиготами по увеличенному числу TA-повторов (7 повторов), 177 человек (69,8%) – гетерозиготами, 14 человек (5,7%) – гомозиготами по нормальному числу повторов (6 повторов). Увеличение числа TA-повторов до семи как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состояниях обуславливает снижение функциональной активности фермента и, следовательно, снижение скорости конъюгации билирубина с глюкуроновой кислотой в гепатоцитах, что приводит к повышению непрямой фракции билирубина в плазме [5].

В сравнении с другими популяциями частота генотипа A(TA)7TAA/A(TA)7TAA: в африканской популяции – 23%, для азиатской популяции характерна самая низкая частота генотипа A(TA)7TAA/A(TA)7TAA – менее 3% [6].

При обследовании билирубина и трансаминаз у пациентов (n=13) с генотипом A(TA)7TAA/A(TA)7TAA отмечали увеличение общего билирубина до 70-90 ммоль/л за счет непрямого – 50-60 ммоль/л, слабость, повышенную утомляемость. При опросе данные пациенты обнаруживали появление желтушности склер и кожных покровов, диспепсические расстройства и яв-

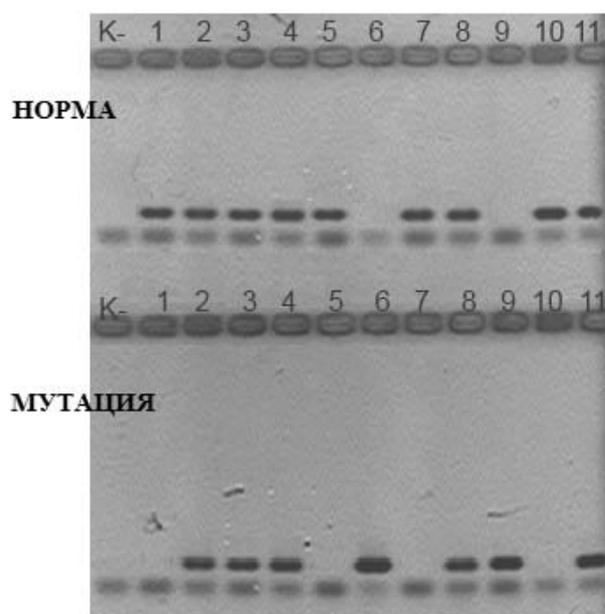


Рис. Электрофореграмма результатов исследования полиморфизма гена UGT1A1: К- – отрицательный контрольный образец; пробы 1,5,7,10 – нормальные гомозиготы; пробы 2,3,4,8,11 – гетерозиготы; пробы 6,9 – мутантные гомозиготы.

ления интоксикации 1-3 раза в год. Среди предшествующих факторов указаны: переохлаждение, психо-эмоциональные расстройства, прием нестероидных противовоспалительных препаратов, антибиотиков. Между атаками гипербилирубинемии уровень общего билирубина отличался от нормальных показателей и составлял 28-30 ммоль/л за счет непрямого билирубина 10-12 ммоль/л. Остальные показатели функции печени имели нормальные значения.

Среди обследованных лиц (n=177) с генотипом A(TA)6TAA/A(TA)7TAA были выделены 2 группы, отличающиеся различными клиническими проявлениями: бессимптомный (n=17) и желтушный с диспепсическими и астеновегетативными расстройствами (n=160). Степень проявления гипербилирубинемии у некоторых лиц была сходна с таковой у пациентов с генотипом A(TA)7TAA/A(TA)7TAA, т.е. увеличение уровня непрямого билирубина, диспепсические расстройства, интоксикация.

Таблица.

Частота генотипов в выборке пациентов

Генотип	Выборка больных
A(TA)6TAA /A(TA)6TAA	14 (5,7%)
A(TA)6TAA /A(TA)7TAA	177 (69,8%)
A(TA)7TAA /A(TA)7TAA	62 (24,5%)

В результате проведенного исследования можно сделать вывод, что наличие такого генетического дефекта, как динуклеотидная инсерция в промоторной области гена УДФ-ГТ1, является фактором риска развития гипербилирубинемии вследствие снижения активности фермента УДФ-ГТ1. В свою очередь, нарушение конъюгации билирубина участвует в нарушении процессов детоксикации в печени [7].

ВЫВОДЫ

Клинические проявления СЖ наблюдаются не только у пациентов с мутантной гомозиготой UGT1A1 7/7, но и в случаях с гетерозиготным вариантом гена UGT1A1 6/7. Генетическое тестирование полиморфизма UGT1A1 является необходимым компонентом диагностики и лечения СЖ для ограничения избыточных физических нагрузок, стресса, голодания, обезвоживания и переохлаждения. А также позволит проводить подбор лекарственных препаратов, не снижающих функциональную активность фермента УДФ-ГТ1.

Е.В. Хомутов, М.С. Кишеня, А.И. Кисс, Д.А. Иващенко, И.М. Гандак

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА

В статье рассмотрены особенности полиморфизма гена UGT1A1, что представляет собой актуальную проблему диагностики синдрома Жильбера с помощью метода генотипирования полиморфизма генов и имеет клинический интерес при обнаружении проявления гипербилирубинемии у новорожденных, а также при отборе пациентов, нуждающихся в диспансерном наблюдении. Целью работы явилось исследование генотипа UGT1A1 у больных с синдромом Жильбера и его влияние на клинические проявления заболевания. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные от 253 пациентов, наблюдавшихся у гастроэнтеролога и прошедших обследование в период с 2013 по 2024 гг. Среди пациентов было 85 женщин и 168 мужчин в возрасте от 15 до 46 лет. Выделение ДНК из периферической крови было произведено с использованием реактива «ДНК-экспресс» (НПО «Литех», Россия). Полимеразную цепную реакцию исследуемого фрагмента ДНК проводили на программируемом термоциклере Терцик-МС2 («ДНК-технология» Россия) с использованием набо-

ров «SNP UGT1A1» (НПО «Литех», Россия). В сыворотке крови пациентов определяли уровень билирубина, аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы с использованием наборов «LaChema» (Чехия), измерением оптической плотности на спектрофотометре «Spesord» (Германия). Установили наличие такого генетического дефекта, как динуклеотидная инсерция в промоторной области гена УДФ-ГТ1, является фактором риска развития гипербилирубинемии вследствие снижения активности фермента УДФ-ГТ1. Клинические проявления синдрома Жильбера наблюдаются не только у пациентов с мутантной гомозиготой UGT1A1 7/7, но и в случаях с гетерозиготным вариантом гена UGT1A1 6/7. Генетическое тестирование полиморфизма UGT1A1 является необходимым компонентом диагностики синдрома Жильбера и лечения пациентов для ограничения избыточных физических нагрузок, стресса, голодания, обезвоживания и переохлаждения.

Ключевые слова: синдром Жильбера, полиморфизм гена UGT1A1.

E.V. Khomutov, M.S. Kishenya, A.I. Kiss, D.A. Ivashchenko, I.M. Gandak

FSBEI HE «M. Gorky Donetsk State Medical University» MOH Russia, Donetsk

MOLECULAR-GENETIC TESTING FOR GILBERT'S SYNDROME

The article discusses the features of the UGT1A1 gene polymorphism, which represents an urgent problem in diagnosing Gilbert's syndrome using the gene polymorphism genotyping method and is of clinical interest in detecting the manifestation of hyperbilirubinemia in newborns, as well as in selecting patients who need clinical observation. The purpose of the work was to study the UGT1A1 genotype in patients with Gilbert's syndrome and its effect on the clinical manifestations of the disease. The material for the study was DNA samples obtained from 253 patients observed by a gastroenterolo-

gist and examined between 2013 and 2024. Among the patients there were 85 women and 168 men aged from 15 to 46 years. DNA was isolated from peripheral blood using the DNA-express reagent (NPO Litech, Russia). The polymerase chain reaction of the DNA fragment under study was carried out on a programmable thermal cycler Tertsik-MS2 (DNA-technology, Russia) using SNP UGT1A1 kits (NPO Litech, Russia). The level of bilirubin, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the blood serum of patients was determined using LaChema kits (Czech Republic), measuring optical density on a Spe-

cord spectrophotometer (Germany). It was established that the presence of a genetic defect such as a dinucleotide insertion in the promoter region of the UDP-GT1 gene is a risk factor for the development of hyperbilirubinemia due to a decrease in the activity of the UDP-GT1 enzyme. Clinical manifestations of Gilbert's syndrome are observed not only in patients with a mutant homozygous UGT1A1 7/7, but also in cases with a heterozygous

variant of the UGT1A1 6/7 gene. Genetic testing of the UGT1A1 polymorphism is a necessary component of the diagnosis of Gilbert's syndrome and the treatment of patients to limit excessive exercise, stress, fasting, dehydration and hypothermia.

Key words: Gilbert's syndrome, UGT1A1 gene polymorphism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gilbert A., Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Se-maine Medicale*. 1901; 21: 241-248.
2. Horsfall L.J., Zeitlyn D., Tarekegn A. et al. Prevalence of clinically relevant UGT1A alleles and haplotypes in African populations. *Ann Hum Genet*. 2011; 75 (2): 236-246. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00638.x.
3. Kamal S., Abdelhakam S., Ghoraba D., Massoud Y., Aziz K.A., Hassan H., Hafez T., Sallam A.A. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: A longitudinal study. *BMC Gastroenterology*. 2019; 19: 22. doi: 10.1186/s12876-019-0931-2.
4. Yoshihiro M., Masaru I. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism*. 2005; 6: 91-99.
5. Sampietro M., Lupica L. TATA-box promoter mutant in the promoter of UDP glucuronosyltransferase gene in the Indian patients with Gilbert syndrome. *J. Hepatology*. 1998; 30: 194-198.
6. Асфандиярова Н.С., Якубовская А.Г. Доброкачественная гипербилирубинемия типа Жильбера. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2022; 10 (1): 75-80. doi: 10.23888/HMJ202210175-80.
7. Бородулькина Ю.В., Караванов А.В., Шулятьев И.С., Поляков А.В., Тверская С.М. Инсерция в промоторной области гена UGT1A1 и непереносимость лекарственных препаратов. *Медицинская генетика*. 2006; 9 (51): 27-30.

REFERENCES

1. Gilbert A., Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Se-maine Medicale*. 1901; 21: 241-248.
2. Horsfall L.J., Zeitlyn D., Tarekegn A. et al. Prevalence of clinically relevant UGT1A alleles and haplotypes in African populations. *Ann Hum Genet*. 2011; 75 (2): 236-246. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00638.x.
3. Kamal S., Abdelhakam S., Ghoraba D., Massoud Y., Aziz K.A., Hassan H., Hafez T., Sallam A.A. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: A longitudinal study. *BMC Gastroenterology*. 2019; 19: 22. doi: 10.1186/s12876-019-0931-2.
4. Yoshihiro M., Masaru I. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism*. 2005; 6: 91-99.
5. Sampietro M., Lupica L. TATA-box promoter mutant in the promoter of UDP glucuronosyltransferase gene in the Indian patients with Gilbert syndrome. *J. Hepatology*. 1998; 30: 194-198.
6. Asfandiyarova N.S., Yakubovskaya A.G. Dobrokachestvennaya giperbilirubinemiya tipa Zhil'bera. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2022; 10 (1): 75-80. doi: 10.23888/HMJ202210175-80.
7. Borodul'kina Yu.V., Karavanov A.V., Shulyat'ev I.S., Polyakov A.V., Tverskaya S.M. Insertsiya v promotornoj oblasti gena UGT1A1 i neperenosimost' lekarstvennykh preparatov. *Meditinskaya genetika*. 2006; 9 (51): 27-30.