

УДК 616.36-008.51-056.7-07:575.21:57.088.7
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-65-73>

Результаты секвенирования гена *UGT1A1* у лиц с фенотипом синдрома Жильбера

Иванова А.А.¹, Апарцева Н.Е.¹, Каширина А.П.¹, Немцова Е.Г.², Иванова Ю.В.¹, Кручинина М.В.¹, Курилович С.А.¹, Максимов В.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН)
Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

² Северо-Западный государственный медицинский университет (СЗГМУ) им. И.И. Мечникова
Россия, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка эффективности прямого автоматического секвенирования гена *UGT1A1* для поиска мутаций у пациентов с фенотипом синдрома Жильбера.

Материалы и методы. Проведено прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру экзонов и части промотора гена *UGT1A1* для 24 человек с непрямой гипербилирубинемией, у которых были исключены все другие ее причины, кроме генетических, и сделан ДНК-анализ на определение количества ТА-повторов в промоторе гена *UGT1A1* (rs3064744). Распределение генотипов rs3064744 в группе: пять человек – генотип 7ТА/7ТА, пять человек – генотип 6ТА/6ТА, 12 человек – генотип 6ТА/7ТА, один человек – генотип 5ТА/7ТА, один человек – генотип 6ТА/8ТА. ДНК выделена методом фенолхлороформной экстракции или экспресс-методами. Секвенирование выполнено методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты. Идентифицированы однонуклеотидные варианты неопределенной клинической значимости rs3755319 (у 21 человека) и rs28899472 (у трех человек с генотипом 7ТА/7ТА rs3064744) в промоторе гена *UGT1A1*, rs2125984650 в 1-м экзоне гена *UGT1A1* (у одного человека с генотипом 5ТА/7ТА rs3064744). У двух лиц с генотипами 6ТА/7ТА rs3064744 выявлены варианты гена, которые являются патогенными и вероятно патогенными для синдрома Жильбера по данным некоторых источников (rs4148323, rs1273237448).

Заключение. Прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру гена *UGT1A1* может быть следующим этапом ДНК-анализа после определения генотипа rs3064744 для лиц с генотипами 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА rs3064744 и подозрением на синдром Жильбера.

Ключевые слова: синдром Жильбера, ген *UGT1A1*, неконъюгированная гипербилирубинемия, секвенирование по Сэнгеру

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00062.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на молекулярно-генетический анализ. Исследование одобрено локально-этическим комитетом НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН (протокол № 4 от 14.02.2023).

✉ Иванова Анастасия Андреевна, ivanova_a_a@mail.ru

Для цитирования: Иванова А.А., Апарцева Н.Е., Каширина А.П., Немцова Е.Г., Иванова Ю.В., Кручинина М.В., Курилович С.А., Максимов В.Н. Результаты секвенирования гена *UGT1A1* у лиц с фенотипом синдрома Жильбера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(2):65–73. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-65-73>.

Results of *UGT1A1* gene sequencing in individuals with the Gilbert syndrome phenotype

Ivanova A.A.¹, Apartseva N.E.¹, Kashirina A.P.¹, Nemcova E.G.², Ivanova Ju.V.¹, Kurilovich S.A.¹, Kruchinina M.V.¹, Maksimov V.N.¹

¹ *Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*
175/1, B. Bogatkova Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation

² *North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*
41, Kirochnaya Str., Saint Petersburg, 191015, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the effectiveness of automated Sanger sequencing of the *UGT1A1* gene to search for pathogenic mutations in individuals with the Gilbert syndrome phenotype.

Materials and methods. Automated Sanger sequencing of exons and part of the promoter in the *UGT1A1* gene was carried out for 24 people with unconjugated hyperbilirubinemia, in whom all other causes except for genetic ones were excluded and DNA analysis was performed to determine the number of TA repeats in the promoter of the *UGT1A1* gene (rs3064744). Distribution of rs3064744 genotypes in the group was the following: 5 people – 7TA/7TA genotype, 5 people – 6TA/6TA genotype, 12 people – 6TA/7TA genotype, 1 person – 5TA/7TA genotype, 1 person – 6TA/8TA genotype. DNA was isolated using phenol – chloroform extraction or express methods. The sequencing was performed by capillary electrophoresis on the Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Results. Single nucleotide variants of uncertain significance were identified: rs3755319 (in 21 people) and rs28899472 (in three people with the 7TA/7TA genotype of rs3064744) in the promoter of the *UGT1A1* gene, rs2125984650 in the first exon of the *UGT1A1* gene (in one person with the 5TA/7TA genotype of rs3064744). In two individuals with the 6TA/7TA genotype of rs3064744, gene variants were identified that were pathogenic or likely pathogenic for the Gilbert syndrome according to some sources (rs4148323, rs1273237448).

Conclusion. According to the results of the study, automated Sanger sequencing of the *UGT1A1* gene may be the next stage of DNA analysis after determining the rs3064744 genotype for individuals with 6TA/6TA, 6TA/7TA rs3064744 genotypes and suspected Gilbert syndrome.

Keywords: Gilbert syndrome, *UGT1A1* gene, unconjugated hyperbilirubinemia, Sanger sequencing

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 23-25-00062.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to molecular genetic testing. The study was approved by the local Ethics Committee at Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 4 of 14.02.2023).

For citation: Ivanova A.A., Apartseva N.E., Kashirina A.P., Nemcova E.G., Ivanova Ju.V., Kurilovich S.A., Kruchinina M.V., Maksimov V.N. Results of *UGT1A1* gene sequencing in individuals with the Gilbert syndrome phenotype. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(2):65–73. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-65-73>.

ВВЕДЕНИЕ

По данным проведенного нами исследования, у почти 35% лиц с фенотипом синдрома Жильбера (СЖ) и исключением других причин неконъюгированной гипербилирубинемии, кроме генетических, не удастся найти частый вариант rs3064744 гена *UGT1A1* (количество ТА-повторов в промоторе гена) в гомозиготном состоянии 7ТА/7ТА, который бы объяснил причину гипербилирубинемии у этих пациентов [1]. Для лиц с генотипами 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА варианта rs3064744 с неконъюгированной гипербилирубинемией и подозрением на СЖ следующим этапом молекулярно-генетической диагностики может стать проведение прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру гена *UGT1A1* для поиска вариантов гена, которые могут быть причиной развития СЖ.

Целью данного исследования является оценка эффективности прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру гена *UGT1A1* в отношении поиска патогенных мутаций у лиц с разными генотипами rs3064744 и фенотипом синдрома Жильбера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прямое автоматическое секвенирование экзонов и промотора гена *UGT1A1* по Сэнгеру выполнено для 24 человек с непрямой гипербилирубинемией, у которых были исключены все другие ее причины, кроме генетических. Пациенты были обследованы и направлены на ДНК-анализ опытными врачами-га-

строэнтерологами в период с 2012 по 2023 г. Среди 24 человек у пяти обнаружен генотип 7ТА/7ТА rs3064744 (количество ТА повторов в промоторе) гена *UGT1A1*, у 12 – генотип 6ТА/7ТА rs3064744, у пяти – генотип 6ТА/6ТА rs3064744, у одного человека – редкий генотип 5ТА/7ТА rs3064744 и еще у одного – редкий генотип 6ТА/8ТА rs3064744. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. Приведенные в таблице показатели концентрации общего и непрямого билирубина являются случайными, теми, с которыми пациент обратился к врачу, т. е. в течение жизни пациента могли быть зафиксированы большие цифры.

ДНК была выделена методом фенолхлороформной экстракции или экспресс-методом (ПРОБА-РА-ПИД-ГЕНЕТИКА, ООО «ДНК-Технология», г. Москва). Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) описаны в табл. 2. Температурный режим ПЦР включал в себя один цикл предварительного прогрева при температуре 95 °С в течение 5 мин и один завершающий цикл при температуре 72 °С в течение 7 мин. Для амплификации необходимого участка ДНК были использованы разработанные нами праймеры, а также праймеры, описанные в работах N. Abdellaoui и соавт., E. Costa и соавт. [2, 3]. Для амплификации 1-го экзона у носителей гетерозиготного генотипа по варианту rs3064744 (6ТА/7ТА, 5ТА/7ТА, 6ТА/8ТА) были использованы праймеры, исключаяющие зону варианта rs3064744 для улучшения качества прочтения при автоматическом секвенировании.

Таблица 1

Пациенты, включенные в исследование										
№	Пол	Возраст, лет	Генотип rs3064744	Общий билирубин, мкмоль/л	Непрямой билирубин, мкмоль/л	Результаты секвенирования				
						Генотип rs28899472	Генотип rs3755319	Генотип rs2125984650	Генотип rs1273237448	Генотип rs4148323
394	мужской	32	7ТА/7ТА	56,4	47,0	СТ	СС	АА	СС	GG
386	женский	50	7ТА/7ТА	48,0	42,0	СТ	СС	АА	СС	GG
301	мужской	57	7ТА/7ТА	34,9	32,6	СТ	СС	АА	СС	GG
405	мужской	18	7ТА/7ТА	54,8	46,4	СС	СС	АА	СС	GG
533	женский	38	7ТА/7ТА	68,2	58,2	СС	СС	АА	СС	GG
240	женский	61	6ТА/8ТА	51,0	46,2	СС	СС	АА	СС	GG
56	женский	22	5ТА/7ТА	170,0	155,8	СС	СС	АТ	СС	GG
404	мужской	18	6ТА/7ТА	55,4	47,8	СС	АС	АА	СС	GG
447	мужской	76	6ТА/7ТА	36,7	29,5	СС	АС	АА	CG	GA
12	мужской	18	6ТА/7ТА	58,0	53,4	СС	АС	АА	СС	GG
442	мужской	21	6ТА/7ТА	46,4	37,8	СС	АС	АА	СС	GG
475	мужской	38	6ТА/7ТА	41,7	27,2	СС	АС	АА	СС	GG
498	мужской	38	6ТА/7ТА	35,0	20,3	СС	АС	АА	СС	GG
495	мужской	17	6ТА/7ТА	32,0	26,0	СС	АС	АА	СС	GG
523	мужской	9	6ТА/7ТА	23,0	17,0	СС	АС	АА	СС	GG
535	женский	17	6ТА/7ТА	25,2	21,2	СС	СС	АА	СС	GG
558	мужской	18	6ТА/7ТА	33,5	22,8	СС	СС	АА	СС	GA

Окончение табл. 1

№	Пол	Возраст, лет	Генотип rs3064744	Общий билирубин, мкмоль/л	Непрямой билирубин, мкмоль/л	Результаты секвенирования				
						Генотип rs28899472	Генотип rs3755319	Генотип rs2125984650	Генотип rs1273237448	Генотип rs4148323
587	мужской	15	6ТА/7ТА	36,3	33,1	СС	АС	АА	СС	GG
43	мужской	52	6ТА/7ТА	60,7	49,5	СС	АС	АА	СС	GG
11	мужской	56	6ТА/6ТА	54,2	45,5	СС	АС	АА	СС	GG
9	женский	54	6ТА/6ТА	50,0	30,0	СС	АА	АА	СС	GG
206	мужской	40	6ТА/6ТА	40,2	28,6	СС	АА	АА	СС	GG
224	женский	46	6ТА/6ТА	29,0	24,0	СС	АС	АА	СС	GG
104	мужской	28	6ТА/6ТА	33,7	29,6	СС	АА	АА	СС	GG

Таблица 2

Условия проведения полимеразной цепной реакции, n = 33				
Участок гена	Последовательность праймеров	Температура Продолжительность	Состав смеси	Длина продукта (п.н.)
Промотор	D: 5'-ctctaagcacatccccaagta-3' R: 5'-taagcaagtgttccatcctca-3' [3]	95 °C 30 с, 54 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,4 мМ каждого праймера	525
Экзон 1 (гетерозиготы по rs3064744)	1_1_D: 5'-gaacctctggcaggagca-3' 1_1_R: 5'-aaagctgctttctgccag-3'	95 °C 30 с, 62 °C 30 с, 72 °C 30 с	Трис-НСI (рН 9,0) 75 мМ, (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 мМ, Tween-20 0,01%, 2,5 мМ MgCl ₂ , по 0,4 мМ каждого праймера, 0,3 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единица активности Таq-ДНК-полимеразы (компания «СибЭнзим», Новосибирск)	461
	1_2_D: 5'-acttactgcacaacaagga-3' 1_2_R: 5'-ggctagttaatcgatcca-3'	95 °C 30 с, 56 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,6 мМ каждого праймера	551
Экзон 1 (гомозиготы по rs3064744)	1_1_D: 5'-aacttggtgtatcgattgg-3' 1_1_R: 5'-aaagctgctttctgccag-3'	95 °C 30 с, 50 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,24 мМ каждого праймера	516
	1_2_D: 5'-acttactgcacaacaagga-3' 1_2_R: 5'-ggctagttaatcgatcca-3'	95 °C 30 с, 56 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,6 мМ каждого праймера	551
Экзон 2	D: 5'-tgtaagcaggaacctctctcc-3' R: 5'-gaagctggaagtctgggattag-3' [2]	95 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,4 мМ каждого праймера	409
Экзон 3	D: 5'-cctcccactctgttaagactgttc-3' R: 5'-agtgttactcatcgcccttgc-3' [2]	95 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,4 мМ каждого праймера	402
Экзон 4	D: 5'-tgcaaggcatgtgagtaaac-3' R: 5'-tgaaacaacgctattaaatgctacg-3' [2]	95 °C 30 с, 44 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,4 мМ каждого праймера	434
Экзон 5	D: 5'-gagaggattgttcataccacagg-3' R: 5'-cactgattctgtttcaagttgg-3' [2]	95 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с	10 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,8 мМ каждого праймера	429

Примечание. n – количество циклов, п.н. – пара нуклеотидов.

Полученные продукты амплификации подвергали очистке от солей, не включившихся праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов с помощью суспензии магнитных частиц КлинМаг ДНК (ЗАО «Евроген», г. Москва). Секвенирование образцов осуществляли при помощи наборов BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США), BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing Kit (NimaGen, Нидерланды) методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,

США) с применением полимера POP-7. Анализ результатов секвенирования осуществляли с помощью программ SeqScape v.2.7, Sequence Scanner.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру указаны в табл. 1.

У 21 человека обнаружен частый однонуклеотидный вариант rs3755319 в гетеро- или гомозиготном состоянии (рис. 1, 2). Однонуклеотидный вариант

rs3755319 (g.234667582A>C) локализован в промоторе гена *UGT1A1*, является часто встречающимся в популяции вариантом [4]. Частота редкого аллеля С варианта по данным GnomAD для европейцев – около 0,43. По данным ClinVar, вариант является патогенным для транзиторной семейной неонатальной гипербилирубинемии. Однако в исследовании, выполненном в Корее, не обнаружено его влияния на уровень экспрессии гена (при оценке в составе гаплотипов): гаплотипы rs3755319C-rs2003569A-rs887829C-rs3064744(TA)6 и rs3755319A-rs2003569G-rs887829C-rs3064744(TA)7 ассоциированы с более низкой экспрессией гена по сравнению с гаплотипом rs3755319C-rs2003569G-rs887829T-rs3064744(TA)6 [5]. Проводились исследования rs3755319 в отношении влияния на фармакокинетику моксифлоксацина, иринотекана [6, 7]. Вариант ас-

социирован с уровнем общего билирубина и холелитазиом у пациентов с серповидноклеточной анемией [8]. Для того чтобы сделать однозначный вывод об ассоциации варианта с СЖ, необходимо провести дополнительные исследования.

У трех человек с генотипом 7ТА/7ТА rs3064744 (пациенты № 301, 386, 394) идентифицирован частый однонуклеотидный вариант rs28899472 в гетерозиготном состоянии (рис. 3). Однонуклеотидный вариант rs28899472 (g.234667809C>T) локализован в промоторе гена *UGT1A1* [9]. Частота редкого аллеля варианта, по данным GnomAD, для европейцев – около 0,03. Вариант не описан в ClinVar, не найдено научных статей, в которых упоминается этот вариант. По данным предиктивного анализа *in silico*, вариант определен как доброкачественный/нейтральный (PolyPhen-2, PhD-SNP, SNPs&GO).

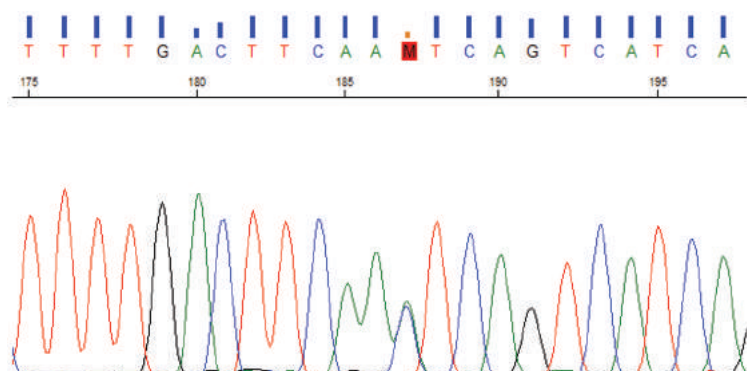


Рис. 1. Сиквэнс образца (rs3755319 в гетерозиготном состоянии)

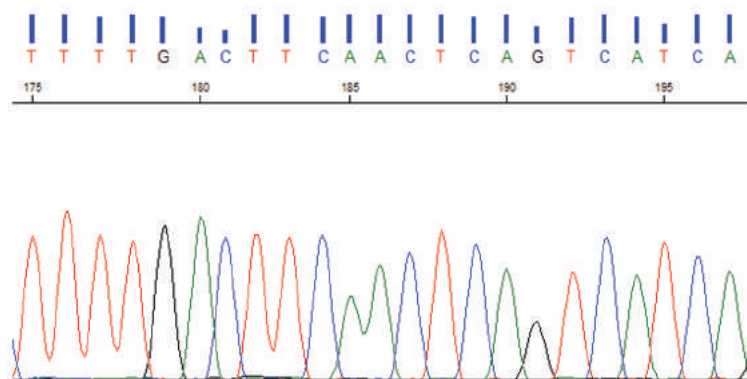


Рис. 2. Сиквэнс образца (rs3755319 в гомозиготном состоянии)

Проведен поиск варианта rs28899472 у ближайших родственников пациентов № 386, 394. Все родственники пациентов, включенные в исследование, не отмечали клинических симптомов гипербилирубинемии и у них никогда не фиксировалось повышение концентрации билирубина и его фракций по результатам биохимического исследования крови. Оба сына пациентки № 386 (женщина 50 лет, максимальная концентрация билирубина была зафиксирована во время беременности, в течение жизни наблюда-

ются колебания концентрации билирубина от нормальных до повышенных цифр) являются гетерозиготными носителями варианта rs3064744 (6ТА/7ТА). У одного из сыновей (28 лет) идентифицирован вариант rs28899472 в гетерозиготном состоянии, второй сын (24 года) не является носителем редкого аллеля rs28899472. Отец пациента № 394 (мужчины 32 лет, у которого впервые неконъюгированная гипербилирубинемия была диагностирована на фоне лечения диффузного токсического зоба тиреостатиками)

также является гетерозиготным носителем варианта rs3064744 (6ТА/7ТА) и не является носителем редкого аллеля варианта rs28899472.

Таким образом, вариант rs28899472 идентифицирован в гетерозиготном состоянии у лица без гипербилирубинемии, носителя генотипа 6ТА/7ТА варианта rs3064744. То есть расценить вариант как патогенный в отношении СЖ на данный момент нельзя, требуется проведение исследований дизайна «случай – контроль» с целью определения частоты варианта в группе лиц с гипербилирубинемией и в контрольной группе.

У пациента № 56 (редкий генотип 5ТА/7ТА rs3064744, женщина, 22 года, без заболеваний печени и желчного пузыря в анамнезе) идентифицирован

редкий однонуклеотидный вариант rs2125984650 в гетерозиготном состоянии (рис. 4). Однонуклеотидный вариант rs2125984650 в 1-м экзоне гена *UGT1A1* (с.188А>Т) является миссенс-вариантом, приводящим к замене аспарагиновой аминокислоты на валин р.Asp63Val в 63 позиции аминокислотной последовательности белка [10]. Вариант не описан в ClinVar. Данных по частоте варианта в GnomAD нет. Не найдено научных статей, в которых упоминается вариант rs2125984650. По данным предиктивного анализа *in silico*, вариант определен как доброкачественный/нейтральный (PolyPhen-2, PhD-SNP, SNPs&GO). Таким образом, на данный момент вариант rs2125984650 гена *UGT1A1* может быть расценен как вариант неопределенного значения.

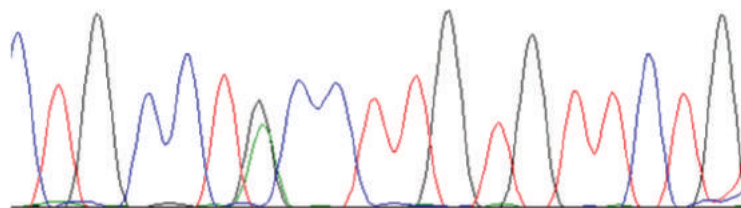


Рис. 3. Сиквенс образцов № 301, 386, 394 (rs28899472 в гетерозиготном состоянии)

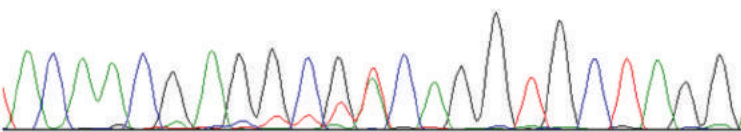


Рис. 4. Сиквенс образца № 56 (rs2125984650 в гетерозиготном состоянии)

У пациента № 447 (генотип 6ТА/7ТА rs3064744, мужчина, 76 лет, гипербилирубинемия выявлена случайно в возрасте 76 лет, татарин, в анамнезе желчнокаменная болезнь, по результатам ультразвукового исследования обнаружены кисты левой доли печени) идентифицирован редкий однонуклеотидный вариант rs1273237448 в гетерозиготном состоянии (рис. 5). Однонуклеотидный вариант rs1273237448 локализован в 1-м экзоне гена *UGT1A1* (с.182С>G), является миссенс-вариантом, приводящим к замене аминокислоты аланина на

глицин р.Ala61Gly в 61-й позиции аминокислотной последовательности белка [11].

По данным ClinVar, вариант является вероятно патогенным для СЖ [12]. Частота редкого аллеля варианта, по данным GnomAD, очень низкая – около 0,000009, гомозигот не зафиксировано. Не найдено научных статей, в которых упоминается вариант rs1273237448. По данным предиктивного анализа *in silico*, вариант расценен как доброкачественный/нейтральный (PolyPhen-2, PhD-SNP, SNPs&GO). На данный момент вариант может быть расценен как ва-

риант неопределенного значения, однако он может иметь отношение к фенотипу пациента.

Пациент № 558 (генотип 6ТА/7ТА rs3064744, мужчина, 18 лет, без заболеваний печени и желчного пузыря в анамнезе), является носителем редкого варианта rs4148323 (*UGT1A1**6) в гетерозиготном состоянии (рис. 6). Вариант rs4148323 локализован в 1-м экзоне гена *UGT1A1* (с.211G>A, р.Gly71Arg) [13]. Частота редкого аллеля варианта, по данным GnomAD, низкая – около 0,002. Наиболее распространен вариант в странах Азии (частота редкого аллеля варианта – около 0,15). Вариант rs4148323 (*UGT1A1**6) в гомозиготном состоянии связан с развитием СЖ, неонатальной гипербилирубинемией и снижением активности фермента УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1А1 на 70% по сравнению с диким типом [14, 15].

Ранее нами был проведен поиск варианта в группе лиц с СЖ (125 человек). В состав группы не были включены пациенты № 447 и 558. У двоих лиц с

СЖ в этой группе был идентифицирован вариант rs4148323 также в гетерозиготном состоянии. Кроме варианта rs4148323, пациенты были гетерозиготами по rs3064744 (генотип 6ТА/7ТА) [1]. Основные исследования rs4148323 проведены в странах Азии (Индия, Китай). В них показано, что при СЖ встречаются как гомозиготные носители rs4148323, так и компаунд-гетерозиготы по rs4148323 и rs3064744, что и наблюдается у пациентов № 447 и 558 [16, 17].

Таким образом, пациент № 447 является гетерозиготным носителем четырех вариантов: rs3064744 (частый вариант при СЖ), rs1273237448 (редкий вариант, вероятно патогенный для СЖ по данным ClinVar), rs4148323 (известный вариант для СЖ у жителей азиатских стран), которые могут объяснить неконъюгированную гипербилирубинемию, и распространенного в популяции варианта rs3755319, клиническая значимость которого на данный момент неизвестна.

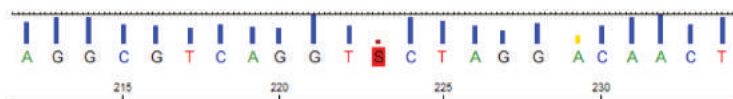


Рис. 5. Сиквенс образца № 447 (rs1273237448 в гетерозиготном состоянии)



Рис. 6. Сиквенс образца № 447 (rs4148323 в гетерозиготном состоянии)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенного исследования, прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру гена *UGT1A1* может быть следующим этапом ДНК-анализа после определения генотипа rs3064744 для лиц с генотипами 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА rs3064744 и подозрением на СЖ.

Идентифицирован распространенный однонуклеотидный вариант rs3755319 в промоторе гена,

значимость которого в отношении неконъюгированной гипербилирубинемии должна будет оценена в следующих научных исследованиях. У трех лиц с подтвержденным СЖ (7ТА/7ТА rs3064744) идентифицирован вариант rs28899472, роль которого в развитии фенотипа СЖ пока неясна, что также требует дальнейшего изучения. У пациента с редким генотипом 5ТА/7ТА rs3064744 идентифицирован однонуклеотидный вариант неопределенного значения

rs2125984650. У двух лиц с генотипами 6ТА/7ТА rs3064744 выявлены варианты гена, которые являются патогенными и вероятно патогенными для СЖ по данным некоторых источников (rs4148323, rs1273237448).

Таким образом, ни у одного из шести человек с неконъюгированной гипербилирубинемией и генотипом 6ТА/6ТА rs3064744 не выявлено каких-либо патогенных для СЖ вариантов в гене *UGT1A1*. Среди 12 человек с неконъюгированной гипербилирубинемией и генотипом 6ТА/7ТА rs3064744 у двух найдены варианты, объясняющие их состояние. То есть только у 11% (два человека из 18 с генотипами 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА rs3064744) прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру гена *UGT1A1* позволило выявить причинные варианты гена. Полученные результаты могут говорить о наличии вариантов других генов, которые ассоциированы с СЖ, либо о недостаточной обследованности пациентов с генотипами 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА rs3064744 и клинически ложном диагнозе синдрома Жильбера.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Иванова А.А., Гуражева А.А., Мельникова Е.С., Максимов В.Н., Немцова Е.Г. Исследование молекулярно-генетических маркеров синдрома Жильбера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(2):39–45. DOI: 10.20538/1682-0363-2023-2-39-45.
- Abdellaoui N., Abdelmoula B., Abdelhedi R., Kharrat N., Tabeti M., Rebai A. et al. Novel combined UGT1A1 mutations in Crigler Najjar syndrome type I. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022;36(6):e24482. DOI: 10.1002/jcla.24482.
- Costa E., Vieira E., Martins M., Saraiva J., Cancela E., Costa M. et al. Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006;36(1):91–7. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.09.002.
- Db SNP rs3755319. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3755319>.
- Shin H.J., Kim J.Y., Cheong H.S., Na H.S., Shin H.D., Chung M.W. Functional study of haplotypes in UGT1A1 promoter to find a novel genetic variant leading to reduced gene expression. *Ther. Drug Monit.* 2015;37(3):369–374. DOI: 10.1097/FTD.000000000000154.
- Naidoo A., Ramsuran V., Chirehwa M., Denti P., McIlleron H., Naidoo K. et al. Effect of genetic variation in UGT1A and ABCB1 on moxifloxacin pharmacokinetics in South African patients with tuberculosis. *Pharmacogenomics*. 2018;19(1):17–29. DOI: 10.2217/pgs-2017-0144.
- Yu Q., Zhang T., Xie C., Qiu H., Liu B., Huang L. et al. UGT1A polymorphisms associated with worse outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2018;82(1):87–98. DOI: 10.1007/s00280-018-3595-7.
- Milton J.N., Sebastiani P., Solovieff N., Hartley S.W., Bhatnagar P., Arking D.E. et al. A genome-wide association study of total bilirubin and cholelithiasis risk in sickle cell anemia. *PLoS One*. 2012;7(4):e34741. DOI: 10.1371/journal.pone.0034741.
- Db SNP rs28899472. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs28899472>.
- Db SNP rs2125984650. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2125984650#variant_details.
- Db SNP rs1273237448. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1273237448#variant_details.
- ClinVar. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV002221165.1>.
- Db SNP rs4148323. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4148323>.
- Steventon G. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1. *Xenobiotica*. 2020;50(1):64–76. DOI: 10.1080/00498254.2019.1617910.
- Zhou J., Yang C., Zhu W., Chen S., Zeng Y., Wang J. et al. Identification of Genetic Risk Factors for Neonatal Hyperbilirubinemia in Fujian Province, Southeastern China: A Case-Control Study. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:7803175. DOI: 10.1155/2018/7803175.
- Bale G., Avanthi U.S., Padaki N.R., Sharma M., Duvvur N.R., Vishnubhotla V.R.K. Incidence and risk of Gallstone disease in Gilbert's syndrome patients in Indian population. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2018;8(4):362–366. DOI: 10.1016/j.jceh.2017.12.006.
- Zhang M., Wang H., Huang Y., Xu X., Liu W., Ning Q. et al. Compound heterozygous UGT1A1*28 and UGT1A1*6 or single homozygous UGT1A1*28 are major genotypes associated with Gilbert's syndrome in Chinese Han people. *Gene*. 2021;781:145526. DOI: 10.1016/j.gene.2021.145526.

Вклад авторов

Иванова А.А. – разработка концепции и дизайна, молекулярно-генетический анализ, интерпретация данных. Апарцева Н.Е., Немцова Е.Г., Курилович С.А., Кручинина М.В. – формирование группы СЖ. Каширина А.П., Иванова Ю.В. – молекулярно-генетический анализ. Максимов В.Н. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Иванова Анастасия Андреевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, ivanova_a_a@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9460-6294>

Апарцева Наталья Евгеньевна – аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, tusya_evdokimova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3772-1058>

Каширина Анастасия Петровна – аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, kashirina_a_p_91@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1968-9712>

Немцова Елена Геннадьевна – канд. мед. наук, доцент, кафедра пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М. Рысса, лечебный факультет, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, neg-85@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1501-6796>

Иванова Юлия Владимировна – ординатор, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, juliaivanovvaa@yandex.ru.

Кручинина Маргарита Витальевна – д-р мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, лаборатория гастроэнтерологии, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, kruchmargo@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

Курилович Светлана Арсентьевна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией гастроэнтерологии, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, kurilovich@yandex.ru

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, medik11@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7165-4496>

(✉) **Иванова Анастасия Андреевна**, ivanova_a_a@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023;
одобрена после рецензирования 21.12.2023;
принята к публикации 26.12.2023