

мунной и неиммунной мышинной сыворотки крови в разведении 1:400. Инкубировали 45 мин при температуре 37°C, отмывали планшет раствором ФСР-Т 5 раз и далее проводили анализ, как описано выше. Как показано на рис. 2, ИМС блокирует сайты связывания сорбированного пептида и снижает значения ОП для положительных образцов из панелей № 1 и № 2, что доказывает специфичность пептида F10.

Заключение. В ходе проведённого исследования оптимизированы основные параметры постановки ИФА для обнаружения антител к синтетическому пептиду F10, соответствующему антигенной детерминанте белка F/core+1/ARFP изолятов ВГС субтипа 1b. Доказана иммуногенность и иммунохимическая активность синтетического пептида F10.

Финансирование. Исследование частично поддержано грантом молодых учёных ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6-8 см. REFERENCES)

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 10 выпуск. Покровский В.И., Тотолян А.А., ред. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016.
2. Калинина О.В., Дмитриев А.В. Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита С. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 2: 9-12.
5. Калинина О.В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции вируса гепатита С. Дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2013.

REFERENCES

1. *Viral hepatitis in Russian Federation. Analytical review. 10th edition.* [Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii. Analiticheskiy obzor. 10 vypusk]. Pokrovskiy V.I., Totolyan A.A., eds. St.Peterburg: Nauchno-issledovatel'skiy institute epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera, 2016. (in Russian)
2. Kalinina O.V., Dmitriev A.V. Structural and functional genome organization and life cycle of hepatitis C virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 2: 9-12. (in Russian)
3. Budkowska A., Kakkanas A., Nerrienet E., Kalinina O., Maillard P. et al. Synonymous Mutations in the Core Gene Are Linked to Unusual Serological Profile in Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*. 2011; 6(1): e15871.
4. Vassilaki N., Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 40503-13.
5. Kalinina O.V. Molecular genetic mechanisms of the evolution of the hepatitis C virus. Diss. St.Peterburg; 2013. (in Russian)
6. Li H.C., Ma H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J. Gastroenterol*. 2014; 20(23): 7104-22.
7. Mavromara P., Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Vir*. 2011; 92: 1343-51.
8. Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A., Kochliou E. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Virol*. 2011; 92 (6): 1343-51.

Поступила 01.11.17

Принята к печати 08.11.17

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.153.937-008.61-092:612.6.05]-07

Волков А.Н.^{1,2}, Хабиева С.М.², Смирнова Е.Ю.², Ларионов А.В.²

ГЕНОДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ *UGT1A1* В ПРАКТИКЕ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ

¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, 650029, г. Кемерово, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, г. Кемерово, Россия

Выявление мутаций гена УДФ-глюкуронилтрансферазы *A1* (*UGT1A1*) имеет важное практическое значение. Носители мутантных генотипов, главным образом *28/*28, характеризуются сниженной функцией глюкуронирования и экскреции ряда эндогенных и экзогенных токсинов. Установлена чёткая ассоциация некоторых форм доброкачественной гипербилирубинемии (особенно синдрома Жильбера) с мутациями в промоторной и экзонной областях *UGT1A1*. С другой стороны, носители различных генотипов *UGT1A1* существенно различаются особенностями метаболизма ряда распространённых лекарственных препаратов (иринотекана, белиноста и др.), что требует дозирования этих лекарств с учётом индивидуального генетического статуса пациента.

Проведён анализ современных технических решений для генодиагностики мутаций *UGT1A1*. Особое внимание уделено обсуждению отечественных разработок для генотипирования *UGT1A1*. Сделано заключение о небольшом ассортименте соответствующих тест-систем российского производства. В ряде случаев нет данных об их основных аналитических и диагностических характеристиках. При разработке дизайна диагностикумов используются различные методические подходы, что позволяет потенциальным потребителям сделать выбор в зависимости от финансово-технических возможностей лаборатории, объёма проводимых исследований, квалификации персонала. Для инструментального обеспечения исследования *UGT1A1* достаточным может быть лабораторное оборудование отечественных производителей, что позволило бы построить весь аналитический цикл на основе принципа импортозамещения.

Ключевые слова: генодиагностика, *UGT1A1*, синдром Жильбера, рак, иринотекан.

Для корреспонденции: Волков Алексей Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КемГМУ, доц. каф. генетики ФГБОУ ВО КемГУ; e-mail: volkov_alex@rambler.ru

Для цитирования: Волков А.Н., Хабиева С.М., Смирнова Е.Ю., Ларионов А.В. Генодиагностика мутаций UGT1A1 в практике современной медицины. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 186-192. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>

Volkov A.N.^{1,2}, Khabieva S.M.², Smirnova E.Yu.², Larionov A.V.²

THE GENETIC DIAGNOSTICS OF MUTATIONS UGT1A1 IN PRACTICE OF MODERN MEDICINE

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State Medical University" of Minzdrav of Russia, 650029, Kemerovo, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State University", 650043, Kemerovo, Russia

*The detection of mutations of the gene of UDF-glucuronyltransferase A1 (UGT1A1) has an important practical value. The carriers of mutant genotypes, mainly *28/*28, are characterized by a reduced function of glucuronidation and excretion of a number of endogenous and exogenous toxins. A precise association of particular forms of benign hyperbilirubinemia (especially Gilbert's syndrome) with mutations in promoter and exonic areas of UGT1A1 is established. On the other hand, carriers of various genotypes of UGT1A1 differ significantly in metabolism characteristics of a number of common medications (irinotecan, belinostat, etc.), that requires a dosage of these medications considering individual genetic status of patient.*

The analysis of modern technical solutions for genetic diagnostics of UGT1A1 mutations is carried out. The particular attention is paid to discussion of national developments for genetic typing of UGT1A1. The conclusion is made concerning small assortment of corresponding test-systems of Russian production. In some cases, there is no data about their main analytical and diagnostic characteristics. When developing design of diagnosticums, various methodological approaches are applied that allow to potential consumers to choose depending on financial technical capabilities of laboratory, amount of implemented analyses, qualification of personnel. To support UGT1A1 research instrumentally, laboratory equipment of national manufacturers can be sufficient that would permit to organize entire analytical cycle on the basis of import substitution principle.

Key words: genetic diagnostics, UGT1A1, Gilbert's syndrome, cancer, irinotecan.

For citation: Volkov A.N., Khabieva S.M., Smirnova E.Yu., Larionov A.V. The genetic diagnostics of mutations UGT1A1 in practice of modern medicine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(3): 186-192. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>

For correspondence: Volkov A.N., .candidate of biological sciences, senior researcher of the Central Research Laboratory of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State Medical University", associate professor of the chair of genetics of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State University", e-mail: volkov_alex@rambler.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.11.2017
Accepted 22.11.2017

Введение. УДФ-глюкуронилтрансферазы (UGTs) – обширное суперсемейство ферментов, участвующих в биотрансформации малорастворимых в биологических жидкостях молекул как эндогенного, так и экзогенного происхождения. UGTs осуществляют конъюгацию субстратов с глюкуроновой кислотой, что повышает их растворимость и скорость выведения из организма. Таким образом происходит экскреция ряда потенциально токсичных метаболитов (билирубина, желчных кислот, ретиноидов), гормонов (тиреоидных и стероидных) и пр. [1]. Отдельные представители семейства обладают достаточно выраженной субстратной специфичностью. Так, УДФ-глюкуронилтрансфераза типа А1 (UGT1A1) обладает высоким сродством главным образом к билирубину, определяя его метаболизм и дальнейшую кинетику в организме [2, 3].

Ген *UGT1A1* привлекает внимание клиницистов по двум причинам. С одной стороны, установлена чёткая ассоциация некоторых форм доброкачественной гипербилирубинемии (особенно синдрома Жильбера – СЖ) с мутациями в промоторной и экзонной областях гена [4–8]. С другой – различные генетические варианты *UGT1A1*, обладая различными функциональными особенностями, производят белковые продукты с неодинаковой трансферазной активностью в отношении таких клинически значимых препаратов, как иринотекан, что требует дозирования этих лекарств с учётом индивидуального генетического статуса пациента [9, 10].

Целью настоящего обзора является определение области использования генодиагностики мутаций *UGT1A1* в практической медицине и анализ современных технических решений для выполнения данного исследования.

Клиническое значение выявления мутаций UGT1A1. Генетический полиморфизм UGT1A1 при синдроме Жильбера.

СЖ – самая частая форма наследственного пигментного гепатоза. Характерным внешним признаком патологии является иктеричность кожных покровов, склер и слизистых оболочек. Отмечаются разнообразные диспептические явления и астеновегетативный синдром. Симптомы патологии обычно возникают на фоне физического перенапряжения, инфекционных заболеваний, после голодания или низкокалорийной диеты, при приёме некоторых лекарственных препаратов. Лабораторным показателем считается повышение уровня билирубина в крови в основном за счёт непрямой фракции [4, 11]. При этом как физикальные, так и биохимические критерии заболевания ненадежны и явно недостаточны для установления диагноза, особенно у детей до пубертатного возраста [12].

Основные проявления СЖ носят транзиторный характер и, как считается, не ведут напрямую к тяжёлым поражениям печени. Вместе с тем СЖ часто сопровождают иные заболевания желудочно-кишечного тракта [11], а вероятным отдалённым следствием синдрома у некоторых пациентов может быть желчнокаменная болезнь [13, 14]. Данная тенденция усиливается при сочетании СЖ с сопутствующими заболеваниями. Так, наличие СЖ у больных серповидноклеточной анемией увеличивает вероятность развития желчнокаменной болезни более чем в 6 раз [4].

Биохимическая и генетическая основа СЖ в настоящее время однозначно установлена. Снижение активности фермента UGT1A1 при этом заболевании определяется либо изменением уровня экспрессии *UGT1A1*, либо структурными модификациями самого фермента. В первом случае обычно обнаруживается изменение числа динуклеотидных повторов *TA* в промоторной области гена (полиморфный сайт

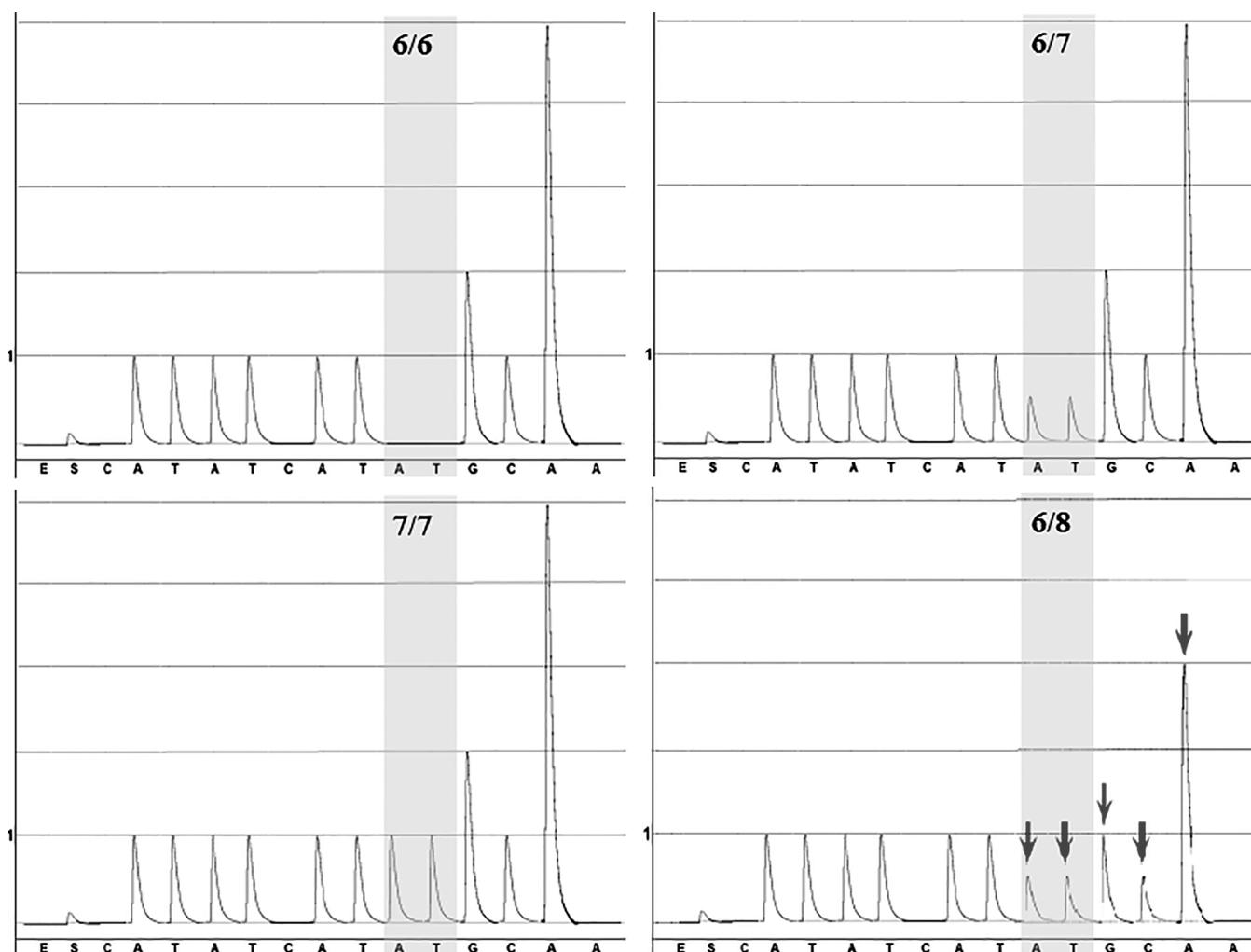


Рис. 1. Графическое представление результатов пиросеквенирования *UGT1A1* (*rs8175347*) при использовании тест-системы «АмплиСенс Пироскрин *UGT1A1*-скрин»

Примечание. На графиках указано число выявленных повторов ТА (6/7/8) в локусе *rs8175347* и соответствующий генотип. Стрелками указаны пики, по высоте которых проводится детекция генотипа с 6 и 8 ТА-повторами.

rs8175347). Так, если аллель «дикого типа» *1 характеризуется шестью тандемными повторами ТА, то при мутациях, ассоциированных с СЖ, их число увеличивается до семи (аллель *28) или восьми (аллель *37). Ещё одна вариация промоторной области характеризуется уменьшением числа повторов ТА до пяти (аллель *36) и приводит к повышению активности *UGT1A1* без патологических проявлений [5]. Установлено, что носители генотипа *1/*28 и особенно *28/*28 имеют в среднем более высокий уровень билирубина в сыворотке крови, чем гомозиготы *1/*1 [4, 8].

Известны также мутации в экзонной области гена, снижающие активность фермента *UGT1A1* за счёт его структурных изменений. Таковы нуклеотидные замены 211G>A (*rs 4148323*) и 686C>A (*rs 35350960*), приводящие к аминокислотным заменам в белке Gly71Arg и Pro229Gln соответственно. Имеются и другие мутации *UGT1A1*, редкие или специфичные для отдельных этнических групп и не представляющие большого интереса с клинической точки зрения при рассмотрении европеоидных популяций [6, 7].

Популяционно-генетические исследования мутаций *UGT1A1* показывают, что большинство случаев СЖ связаны с наличием у пациента гомозиготного генотипа *28/*28, так как именно аллель *28 является наиболее распространённым мутантным вариантом *UGT1A1*. Частота указанного аллеля

среди представителей европеоидной расы варьирует от 30,9 до 36,1%, что соответствует ожидаемой частоте гомозигот *28/*28 в пределах 9,5–13,0%. Суммарная частота прочих мутаций, снижающих активность *UGT1A1*, в большинстве исследованных популяций не превышает 1% [5, 6, 8]. Таким образом, около 10% населения европейских стран являются потенциальными или уже выявленными больными с СЖ. Данных о генетическом полиморфизме *UGT1A1* у населения России крайне мало. Так, Е. Shatalova и соавт. [15] в выборке из 121 женщины русской национальности выявили аллели *1 и *28 с частотой 68,22 и 31,78%. При этом частота клинически значимого генотипа *28/*28 составила лишь 5,93%.

Генотипирование мутаций *UGT1A1* для персонализированной фармакотерапии. Будучи ферментом группы трансфераз, *UGT1A1* является важным элементом системы детоксикации организма, защищая его от воздействия потенциально опасных метаболитов и ксенобиотиков. Нормальными субстратами для *UGT1A1* являются билирубин и сходные по структуре стероиды, а перечень субстратов-ксенобиотиков фермента включает такие широко используемые лекарственные средства, как иринотекан.

Иринотекан является препаратом первой линии химиотерапии при лечении колоректального рака, хотя назначается и при других онкопатологиях (глиобластоме, раке лёгкого,

желудка, поджелудочной железы и пр.). Терапевтический эффект препарата связан с образованием в организме его активного метаболита SN-38, который, в свою очередь, подвергается глюкуронированию UGT1A1, дезактивируется и выводится [2].

Наиболее частыми токсическими эффектами накопления SN-38 являются нейтропения, тяжёлая диарея, а также тошнота и рвота, которые регистрируются примерно у 34, 20 и 13% пациентов соответственно. Более того, по наблюдениям отдельных авторов, принятая в США при монотерапии иринотеканом терапевтическая доза 350 мг/м² может быть летальной для 1,6% пациентов за счёт избыточной токсичности препарата [16].

Токсические эффекты иринотекана достоверно чаще регистрируются у пациентов со сниженной функцией UGT1A1 (обычно с генотипом *28/*28) [17–20]. Для лиц с генотипом *1/*1 максимальная допустимая разовая доза препарата составляет 850 мг, для носителей генотипа *1/*28 – 700 мг, генотипа *28/*28 – 500 мг [21]. Эти данные ставят вопрос о необходимости предварительного определения генотипа UGT1A1 у пациента и назначении индивидуальной схемы приёма препарата.

Несколько независимых исследовательских групп пришли к заключению о целесообразности снижения начальной дозы иринотекана, назначаемой пациентам с генотипом *28/*28. В этом случае стандартная (принятая в странах Западной Европы) доза препарата 180 – 230 мг/м² должна быть уменьшена на 25 – 30%, по крайней мере в первом цикле приёма лекарства. Высокие дозы иринотекана (более 240 мг/м²) могут назначаться только пациентам с генотипом *1/*1 [6]. В США, где принята иная схема фармакотерапии, разовая доза до 250 мг/м² может быть прописана вне зависимости от генотипа. При необходимости назначения более высоких доз препарата учитывается генотип пациента, гомозиготам с пониженной функцией гена снижают дозу на 30% [22].

Белиностан используется для лечения периферической Т-клеточной лимфомы. Вещество подвергается глюкуронированию преимущественно UGT1A1 [23], поэтому его фармакологическая эффективность и кинетика в организме напрямую зависят от активности фермента. Недостаточная скорость выведения препарата часто приводит к разнообразным токсическим реакциям: тошноте, рвоте, анемии, пирексии и состоянию общей усталости. Уже на основании доклинических исследований была сформулирована рекомендация снижать терапевтическую дозу препарата на 25% пациентам, гомозиготным по аллелю *28 UGT1A1 [10].

В отличие от иринотекана и белиностана ряд лекарственных препаратов не даёт специфических побочных эффектов, а провоцирует развитие на фоне фармакотерапии симптомокомплекса СЖ. Это означает, что лекарство само по себе не является субстратом UGT1A1, а лишь вызывает проявление дисфункции печени, характерной для носителей мутаций UGT1A1 либо ингибирует экспрессию гена или активность фермента.

Так, пазопаниб, используемый при лечении распространённого почечно-клеточного рака и распространённой саркомы мягких тканей, метаболизируется печёночными цитохромами, прежде всего изоферментом CYP3A4. У многих пациентов, принимавших 800 мг препаратов ежедневно, отмечались эпизоды гипербилирубинемии. У гомозиготных носителей аллеля *28 UGT1A1 частота события составляла около 50%, в то время как у гетерозигот *1/*28 и гомозигот *1/*1 лишь 13 и 7% [24].

Аналогично приём нилотиниба больными хроническим миелоидным лейкозом приводил к гипербилирубинемии преимущественно у пациентов с генотипом *28/*28 или другими генетическими вариантами, снижающими активность фермента UGT1A1 [25, 26]. А относительный риск гипер-

билирубинемии 3-й степени (уровень общего билирубина в 3–10 раз выше верхней границы нормы) для носителей этого генотипа повышен в 4,5 раза по сравнению с прочими индивидуумами [25].

Атазанавир – ингибитор вирусной протеазы ВИЧ в качестве побочного эффекта при антиретровирусной терапии даёт тяжёлую гипербилирубинемия. Установлен высокий риск развития данного осложнения при наличии у пациента аллеля *28 UGT1A1, особенно в гомозиготном состоянии. Предсказательная ценность генотипа *28/*28 ещё более возрастает, если во внимание принимать только вероятность возникновения гипербилирубинемии 3-й и 4-й степени [27–29]. На основании обобщения имеющихся данных некоторые исследователи предлагают назначать пациентам с генотипом *28/*28 вместо атазанавира альтернативные препараты. В случае невозможности такой замены ожидать гипербилирубинемии, по крайней мере, в 20% случаев [30].

Кроме перечисленных лекарственных средств с UGT1A1, возможно, взаимодействуют этопозид, ралоксифен, ралтегравир, индакатерол, оланзапин [10, 31]. Имеются также отдельные сообщения об ингибировании фермента препаратами сорафениб, траниласт, индинавир, что приводит к манифестации СЖ у носителей генотипа *28/*28 UGT1A1 [10]. По мере дальнейшего накопления фармакогенетических данных и появления новых лекарственных препаратов диагностическое значение выявления мутаций UGT1A1, вероятно, будет только возрастать.

Современные методы генотипирования мутаций UGT1A1. Генодиагностика мутаций UGT1A1: предпосылки и поиск решений. В 2005 г. FDA рекомендовала проводить генотипирование UGT1A1 для определения индивидуальной схемы приёма иринотекана, что нашло отражение в инструкции по применению лекарственного препарата [9]. В связи с высокой популяционной частотой генотипа *28/*28 и его выраженным клиническим эффектом, возник вопрос о необходимости внедрения в медицинскую практику методов выявления мутаций UGT1A1.

Мировыми разработчиками диагностических тест-систем были предложены различные алгоритмы генотипирования UGT1A1, из них наибольшую известность получил молекулярно-генетический тест «Invader UGT1A1 Molecular Assay», предлагаемый как часть рекомендации FDA. В основу метода положена специфическая гибридизация зонда-репортёра с тем или иным аллелем изучаемого полиморфного участка UGT1A1. Часть зонда в момент присоединения к ДНК отщепляется и накапливается в растворе. На следую-

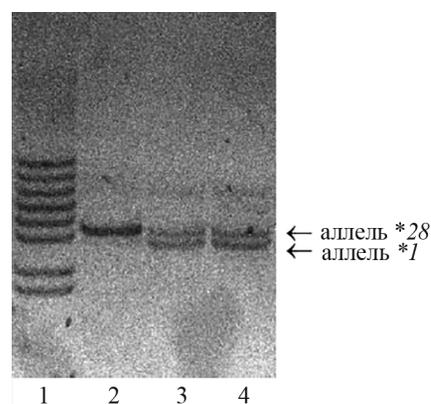


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР локуса *rs8175347 UGT1A1* и молекулярного стандарта при использовании тест-системы «UGT1A1-STR»

Примечание. 1 – молекулярный стандарт; 2 – генотип *28/*28; 3, 4 – генотип *1/*28.

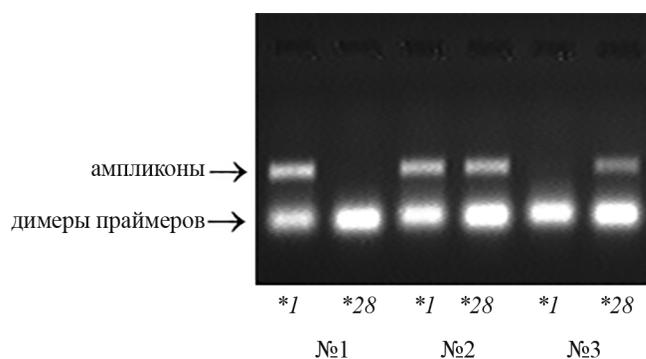


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР локуса *rs8175347 UGT1A1* при использовании тест-системы «Синдром Жильбера»

Примечание. Генотипы образцов: №1 – **1/*1*; №2 – **1/*28*; №3 – **28/*28*.

шем этапе в другой реакционной смеси накопленные фрагменты зонда-репортёра инициируют ещё одну химическую реакцию, сопровождающуюся накоплением флуоресценции, которая регистрируется флуориметром [5, 32]. Этот несложный с технической точки зрения и показавший хорошие аналитические характеристики метод требует для реализации наличия дорогостоящего оборудования и реагентов, что делает высокой стоимость лабораторного анализа.

В качестве альтернативного метода была предложена схема выявления мутаций *UGT1A1* с использованием ДНК-микрочипов. При этом диагностическая панель может включать зонды для многих мутаций в изучаемом гене, что недоступно при использовании «Invader *UGT1A1* Molecular Assay». Более того, в панель могут быть включены различные гены, представляющие интерес в том или ином аспекте. Таков, например «PHARMAChip», позволяющий одновременно проводить генотипирование не только *UGT1A1*, но и ряда других генов, задействованных в метаболизме различных лекарственных средств. Высокие аналитические показатели теста были подтверждены в ходе независимых испытаний [33]. Вместе с тем для выполнения исследования, как и ранее, требуется сложное оборудование, а анализ большого количества мутаций для каждого пациента необоснованно повышает цену исследования, так как далеко не все гены и мутации представляют интерес в конкретной ситуации.

Многочисленные клинико-генетические исследования, проведённые с момента опубликования рекомендаций FDA и включавшие генотипирование *UGT1A1*, были основаны на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных её модификациях. Для этих исследований характерны использование реагентов «домашнего приготовления» и собственный дизайн реакционных смесей. Проверка надёжности получаемых результатов с помощью референсных методов обычно не проводится [4, 8, 15]. По этим причинам непосредственное внедрение данных методических подходов в медицинскую практику невозможно.

Методы генотипирования *UGT1A1* не только должны отвечать требованиям надёжности, оперативности исполнения, простоты постановки и интерпретации полученных результатов, но и обладать низкой себестоимостью, чтобы стать максимально доступной медицинской услугой для населения. Соответствующие тест-системы должны в идеале производиться на территории Российской Федерации для выполнения требования импортозамещения на рынке лабораторных диагностикомов. Учитывая это, далее нами были охарактеризованы коммерческие тест-системы отечественных производителей, предназначенные для генотипирования *UGT1A1*.

Выявление мутаций *UGT1A1* путём секвенирования.

Секвенирование целого гена или его части подразумевает прямое определение нуклеотидной последовательности изучаемого участка ДНК. На протяжении десятилетий ключевым методом такого чтения генома было секвенирование по Сэнгеру. Современные технологические решения отличаются разнообразием подходов к задаче и большей продуктивностью с точки зрения как скорости выполнения анализа, так и объёма получаемой информации. Однако сложность проведения секвенирования и анализа получаемого сиквенса, а также высокая цена исследования остаются главными препятствиями на пути повсеместного внедрения этих методов в лабораторную практику медицинских учреждений. По этой причине количество коммерческих тестов для секвенирования крайне мало.

Единственной доступной на российском рынке тест-системой для секвенирования *UGT1A1*, по нашим данным, является набор реагентов «АмплиСенс Пироскрин *UGT1A1*-скрин» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии). Система рассчитана на выявление вариации числа динуклеотидных повторов *TA* в промоторной области *UGT1A1* (*rs8175347*) путём пиросеквенирования на приборах серии PyroMark («QIAGEN», Германия). В основе данного метода лежит детекция пирофосфата, который высвобождается при каждом цикле включения нуклеотида в синтезируемую нить ДНК. В дальнейшем пирофосфат инициирует хемилюминесцентный сигнал, регистрируемый системой.

Как и всякое секвенирование, пиросеквенирование позволяет выявить все аллели в изучаемой области гена, включая такие редкие, как **36* и **37*. Это является несомненным преимуществом данной методики. По результатам собственных лабораторных испытаний разработчика набор обладает высокой аналитической и диагностической чувствительностью и специфичностью (99–100%).

Технология пиросеквенирования включает несколько стадий. Сначала проводится амплификация целевого участка образца ДНК. Затем выполняется пробоподготовка ПЦР-продукта. Данная стадия достаточно трудоёмка, требует использования дополнительного лабораторного оборудования и включает ряд ручных манипуляций, увеличивающих время анализа и повышающих зависимость результата от квалификации и опыта персонала. На завершающем этапе в автоматическом режиме проводится собственно пиросеквенирование подготовленных ПЦР-образцов.

Анализ данных выполняется с помощью программного обеспечения путём сравнения полученных результатов с референсной нуклеотидной последовательностью (рис. 1)¹. На этом этапе возможны определённые затруднения в интерпретации результатов. Как отмечают разработчики, при секвенировании повторяющихся последовательностей в гомозиготных образцах может детектироваться повышенный уровень фонового сигнала. Для гомозиготных образцов допустимо повышение фоновых значений в полиморфной области до 20%. Для гетерозигот допустимо колебание отношения аллелей **1* к **28* от 40% к 60%, до 60% к 40%. При этом образцы, в которых детектированы частоты аллелей, находящиеся в диапазоне 20–40%, требуют перестановки.

Дополнительную сложность представляет анализ редких аллелей *UGT1A1*. Дело в том, что порядок подачи нуклеотидов в реакционную смесь по умолчанию рассчитан на выявление наиболее частых аллелей (**1* и **28*). При подозрении на наличие в образце пяти или восьми *TA*-повторов необходимо провести повторный анализ с изменённым порядком подачи нуклеотидов и(или) изменённой последовательностью нуклеотидов для анализа.

¹ http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/217/piroskrin-ugt1a1_skrin_zaregistr_cha_150716.pdf

Учитывая сказанное, можно заключить, что пиросеквенирование *UGT1A1* является достаточно трудоёмкой технологией с использованием дорогостоящего оборудования и реагентов. Проведение анализа и интерпретация полученных данных должны выполняться высококвалифицированным персоналом. Все это неизбежно отразится на себестоимости анализа. Некоторого её снижения можно ожидать в случае одновременного анализа большого количества клинических образцов благодаря рациональному использованию реагентов. Анализ единичных образцов (что не редкость в лабораторной практике), напротив, экономически невыгоден.

Диагностика мутаций *UGT1A1* в формате ПЦР/детекция. ПЦР является обязательной стадией современного молекулярно-генетического анализа. В идеале она должна оставаться основным или единственным (в случае ПЦР с детекцией кинетики в реальном времени) этапом исследования. В связи с этим большой интерес представляют наиболее простые тест-системы на основе ПЦР-диагностики мутаций *UGT1A1*. Кроме высокой срочности исследований, лёгкости исполнения и интерпретации результатов такой формат гарантирует низкую стоимость медицинской услуги даже при работе с единичными клиническими образцами.

Поиск отечественных коммерческих диагностикомов для анализа мутаций *UGT1A1* в формате ПЦР/детекция позволил выявить лишь две тест-системы. ФГБУН ИБХФ РАН разработана панель «ТАПОТИЛИ» для генотипирования высокополиморфных локусов генома человека, используемых при установлении биологического родства. Частью панели является комплект реагентов «UGT1A1-STR» для обнаружения мутаций в промоторной области *UGT1A1*. ООО НПФ «Литех», в свою очередь, предлагает линейку реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС» для выявления различных полиморфизмов в геноме человека, в том числе набор «Синдром Жильбера» для генотипирования *rs8175347*.

Обе тест-системы рассчитаны на ПЦР-амплификацию полиморфного участка *UGT1A1* на любом амплификаторе, например «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия), с последующей электрофоретической детекцией результата ПЦР. К сожалению, разработчики не предоставляют данных о лабораторных испытаниях своих наборов. В то время как для повышения доверия к диагностикумам до внедрения их в широкую медицинскую практику желательнее исследование их чувствительности, специфичности и других аналитических и диагностических характеристик.

Набор «UGT1A1-STR» позволяет одновременно различить 4 варианта *rs8175347* с числом *TA*-повторов от пяти до восьми (аллели *36, *1, *28, *37). При этом используется одна пара праймеров, а в ходе амплификации в одной ПЦР-смеси возможно образование различных по длине продуктов-ампликонов. Детекция результата ПЦР осуществляется путём электрофореза в полиакриламидном геле в вертикальной камере, например «VE-20» (ООО «Компания Хеликон», Россия) (рис. 2). Последующее окрашивание гелей позволяет изучить полиморфизм длин амплифицированных фрагментов и сделать заключение о генотипе образца ДНК.

Специфика такого варианта электрофореза заключается в высокой разрешающей способности системы при различении ампликонов сопоставимой длины, что достигается достаточно большой продолжительностью процедуры. Повышение электрического напряжения позволяет несколько сократить время электрофореза. При этом возможны разогрев геля, потеря однородности электрическим полем и искажение полос ампликонов на электрофореграмме, что усложнит интерпретацию результата. Учитывая это, процедуру обычно проводят при пониженном напряжении в течение не менее 4–5 ч.

При работе с тест-системой «Синдром Жильбера» от ООО НПФ «Литех» выполняется аллельспецифическая ПЦР, в ко-

торой задействуются различные пары праймеров, специфичные к концевым участкам альтернативных аллелей *UGT1A1*. Таким образом, сами праймеры выполняют дискриминирующую функцию при различении вариантов *rs8175347*. Но при этом в одной ПЦР-пробирке выявляется только один из возможных аллелей. С учётом распространённости разных аллелей в популяциях человека и соответственно их диагностической значимости разработчики ограничили спектр выявляемых вариантов *UGT1A1* аллелями *1 и *28. В таком случае один клинический образец исследуется с помощью двух ПЦР-реакций.

Указанный формат ПЦР позволяет проводить детекцию продуктов амплификации в агарозном геле, более простом в приготовлении и эксплуатации, чем полиакриламидные гели, с использованием отечественного оборудования (например, камеры «SE-2», ООО «Компания Хеликон», Россия). Разрешающей способности системы должно быть достаточно лишь для разделений не израсходованных в ходе ПЦР праймеров и ампликонов, что достигается при концентрации агарозы в геле 3% и даже менее. Собственный опыт работы с данной тест-системой показывает, что в ходе горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле, проводимом при 200 В в течение 15 мин, ампликоны образуют чётко различимые дискретные полосы (рис. 3). Суммарное время стадии детекции (при внесении красителя для ДНК непосредственно в гель) составляет менее 1 ч.

Заключение. Генодиагностика мутаций *UGT1A1* имеет важное практическое значение в гастроэнтерологии, онкологии и ряде смежных медицинских областей. Анализ технических решений для генотипирования клинически значимых мутаций гена *UGT1A1* позволяет отметить, что на рынке лабораторных диагностикомов представлен небольшой ассортимент тест-систем, производимых в Российской Федерации. В ряде случаев нет данных об их основных аналитических и диагностических характеристиках, что крайне важно для повышения доверия к изделиям.

Положительным является то, что дизайн обсуждаемых наборов основан на использовании различных методических подходов. Это позволяет потенциальным потребителям сделать выбор в зависимости от финансово-технических возможностей лаборатории, объёма проводимых исследований, квалификации персонала. Наконец, существенно, что для инструментального обеспечения исследований вполне достаточным может быть лабораторное оборудование отечественных производителей, что потенциально позволит построить весь аналитический цикл на основе принципа импортозамещения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 13-33 см. REFERENCES)

11. Дубровина Г.М., Ботвиньев О.К., Колотилина А.И. Сочетание синдрома Жильбера с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24(3): 13-21.
12. Захарова И.Н., Пыков М.И., Калоева З.В., Катаева Л.А., Шишкина С.В., Бережная И.В., Резниченко Е.В., Молоткова Н.В. Апостериорная ценность клинических и лабораторных проявлений синдрома Жильбера у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2011; 8(4): 101-4.

REFERENCES

1. Fujiwara R., Yokoi T., Nakajima M. Structure and protein-protein interactions of human UDP-glucuronosyltransferases. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 10.3389/fphar.2016.00388.
2. Barbarino J.M., Haidar C.E., Klein T.E., Altman R.B. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. *Pharmacogenomics*. 2014; 24: 177-83.
3. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltrans-

- ferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3(3): 136–58.
4. Carpenter S.L., Lieff S., Howard T.A., Eggleston B., Ware R.E. UGT1A1 promoter polymorphisms and the development of hyperbilirubinemia and gallbladder disease in children with sickle cell anemia. *Am. J. Hematol.* 2008; 83(10): 800–3.
 5. Palomaki G.E., Bradley L.A., Douglas M.P., Kolor K., Dotson W.D. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med.* 2009; 11(1): 21–34.
 6. Etienne-Grimaldi M.C., Boyer J.C., Thomas F., Quaranta S., Picard N., Loriot M.A., Narjoz C., Poncet D., Gagnieu M.C., Ged C., Broly F., Le Morvan V., Bouquie R., Gaub M.P., Philibert L., Ghiringhelli F., Le Guellec C. UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015; 29(3): 219–37.
 7. Han F.F., Guo C.L., Yu D., Zhu J., Gong L.L., Li G.R., Lu Y.L., Liu H., An G.Y., Liu L.H. Associations between UGT1A1*6 or UGT1A1*6/*28 polymorphisms and irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014; 73(4): 779–88.
 8. Hong A.L., Huo D., Kim H.J., Niu Q., Fackenthal D.L., Cummings S.A., John E.M., West D.W., Whittmore A.S., Das S., Olopade O.I. UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms and total bilirubin levels in an ethnically diverse cohort of women. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35(8): 1254–61.
 9. Innocenti F., Ratain M.J. Pharmacogenetics of irinotecan: clinical perspectives on the utility of genotyping. *Pharmacogenomics.* 2006; 7(8): 1211–21.
 10. Goey A.K., Figg W.D. UGT genotyping in belinostat dosing. *Pharmacol. Res.* 2016; 105: 22–7.
 11. Dubrovina G.M., Botvin'yev O.K., Kolotilina A.I. Combination of Gilbert's syndrome and gastrointestinal diseases. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, hepatologii, coloproktologii.* 2014; 24(3): 13–21. (in Russian)
 12. Zakharova I.N., Pykov M.I., Kaloyeva Z.V., Kataeva L.A., Shishkina S.V., Berejnaya I.V., Reznichenko E.V., Molotkova N.V. Gilbert's syndrome in children: contemporary diagnostic potentialities. *Pediatricskaya farmakologiya.* 2011; 8(4): 101–4. (in Russian)
 13. Buch S., Schafmayer C., Völzke H., Seeger M., Miquel J.F., Sookoian S.C., Egberts J.H., Arlt A., Pirola C.J., Lerch M.M., John U., Franke A., von Kampen O., Brosch M., Nothnagel M., Kratzer W., Boehm B.O., Bröring D.C., Schreiber S., Krawczak M., Hampe J. Loci from a genome-wide analyses of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition. *Gastroenterology.* 2010; 139(6): 1942–51.
 14. Tsezou A., Tzetis M., Giannatou E., Spanos I., Roma E., Fretzayas A., Kanavakis E., Kitsiou-Tzeli S. Gilbert syndrome as a predisposing factor for cholelithiasis risk in the Greek adult population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009; 13(1): 143–6.
 15. Shatalova E.G., Loginov V.I., Braga E.A., Kazubskaja T.P., Sudomoina M.A., Blanchard R.L., Favorova O.O. Association of polymorphisms in SULT1A1 and UGT1A1 genes with breast cancer risk and phenotypes in Russian women. *Mol. Biol.* 2006; 40(2): 228–34.
 16. Fuchs C.S., Moore M.R., Harker G., Villa L., Rinaldi D., Hecht J.R. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 5: 807–14.
 17. Hoskins J.M., Goldberg R.M., Qu P., Ibrahim J.G., McLeod H.L. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007; 17: 1290–5.
 18. Liu X., Cheng D., Kuang Q., Liu G., Xu W. Association of UGT1A1*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. *Pharmacogenomics J.* 2014; 2: 120–9.
 19. Hu Z.Y., Yu Q., Pei Q., Guo C. Dose-dependent association between UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin. Cancer Res.* 2010; 15: 3832–42.
 20. Chen Y.J., Hu F., Li C.Y., Fang J.M., Chu L., Zhang X., Xu Q. The association of UGT1A1*6 and UGT1A1*28 with irinotecan-induced neutropenia in Asians: a meta-analysis. *Biomarkers.* 2014; 19(1): 56–62.
 21. Innocenti F., Schilsky R.L., Ramirez J., Janisch L., Undevia S., House L.K., Das S., Wu K., Turcich M., Marsh R., Karrison T., Maitland M.L., Salgia R., Ratain M.J. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32(22): 2328–34.
 22. Swen J.J., Nijenhuis M., de Boer A., Grandia L., Maitland-van der Zee A.H., Mulder H., Rongen G.A., van Schaik R.H., Schalekamp T., Touw D.J., van der Weide J., Wilffert B., Deneer V.H., Guchelaar H.J. Pharmacogenetics: from bench to byte – an update of guidelines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011; 89(5): 662–73.
 23. Wang L.Z., Ramirez J., Yeo W., Chan M.Y., Thuya W.L., Lau J.Y., Wan S.C., Wong A.L., Zee Y.K., Lim R., Lee S.C., Ho P.C., Lee H.S., Chan A., Ansher S., Ratain M.J., Goh B.C. Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients. *PLoS One.* 2013; 8: 10.1371/journal.pone.0054522.
 24. Xu C.F., Reck B.H., Xue Z., Huang L., Baker K.L., Chen M., Chen E.P., Ellens H.E., Mooser V.E., Cardon L.R., Spraggs C.F., Pandite L. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br. J. Cancer.* 2010; 102(9): 1371–7.
 25. Singer J.B., Shou Y., Giles F., Kantarjian H.M., Hsu Y., Robeva A.S., Rae P., Weitzman A., Meyer J.M., Dugan M., Ottmann O.G. UGT1A1 promoter polymorphism increases risk of nilotinib-induced hyperbilirubinemia. *Leukemia.* 2007; 21(11): 2311–5.
 26. Abumiya M., Takahashi N., Nioka T., Kameoka Y., Fujishima N., Tagawa H., Sawada K., Miura M. Influence of UGT1A1 6, 27, and 28 polymorphisms on nilotinib-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2014; 29(6): 449–54.
 27. Culley C.L., Kiang T.K., Gilchrist S.E., Ensom M.H. Effect of the UGT1A1*28 allele on unconjugated hyperbilirubinemia in HIV-positive patients receiving Atazanavir: a systematic review. *Ann. Pharmacother.* 2013; 47(4): 561–72.
 28. Lankisch T.O., Moebius U., Wehmeier M., Behrens G., Manns M.P., Schmidt R.E., Strassburg C.P. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. *Hepatology.* 2006; 44(5): 1324–32.
 29. Park W.B., Choe P.G., Song K.H., Jeon J.H., Park S.W., Kim H.B., Kim N.J., Oh M.D., Choe K.W. Genetic factors influencing severe atazanavir-associated hyperbilirubinemia in a population with low UDP-glucuronosyltransferase 1A1*28 allele frequency. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(1): 101–6.
 30. Gammal R.S., Court M.H., Haidar C.E., Iwuchukwu O.F., Gaur A.H., Alvarellos M., Guillemette C., Lennox J.L., Whirl-Carrillo M., Brummel S.S., Ratain M.J., Klein T.E., Schackman B.R., Caudle K.E., Haas D.W. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and atazanavir prescribing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2016; 99(4): 363–9.
 31. Cabaleiro T., López-Rodríguez R., Ochoa D., Román M., Novalbos J., Abad-Santos F. Polymorphisms influencing olanzapine metabolism and adverse effects in healthy subjects. *Hum. Psychopharmacol.* 2013; 28(3): 205–14.
 32. Hasegawa Y., Ando Y., Shimokata K. Screening for adverse reactions to irinotecan treatment using the Invader UGT1A1 Molecular Assay. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6(4): 527–33.
 33. Cuyàs E., Olano-Martín E., Khymenets O., Hernández L., Jofre-Monseny L., Grandoso L., Tejedor D., Martínez A., Farré M., de la Torre R. Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMACHIP. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(2): 257–66.

Поступила 07.11.17

Принята к печати 22.11.17