

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сидоренко Д.В.¹, Назаров В.Д.¹, Волникова Е.Г.¹, Кондрашева Е.А.², Пешкова Н.Г.², Ковалева И.С.²,
Кокорина О.С.², Сватковская И.Б.², Лапин С.В.¹

ЗАВИСИМОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ГЕНА *UGT1A1*, АССОЦИИРОВАННОГО С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА

¹Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины
ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава РФ,
197022, Санкт-Петербург, Россия;

²ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», 125047, Москва, Россия

Диагностика синдрома Жильбера основывается на выявлении гомозиготного носительства дополнительного *TA*-повтора в промоторе гена *UGT1A1*, приводящего к снижению активности фермента уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы (УДФ-ГТ). В Российской Федерации не было проведено крупных исследований, посвященных распространенности носительства синдрома Жильбера, а также биохимическому и молекулярному профилю таких пациентов. Целью исследования является оценка биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов с синдромом Жильбера. В исследование включены 124 здоровых добровольца (1-я группа) и 5650 пациентов с анамнестическими, клиническими и биохимическими признаками синдрома Жильбера (2-я группа). Для всех участников было определено число *TA*-повторов в промоторной области гена *UGT1A1* с помощью фрагментного анализа. Для 299 пациентов из 2-й группы были проанализированы следующие биохимические показатели: уровень билирубина и его фракций, АСТ, АЛТ, холестерин и ЛПНП. В 1-й группе частота встречаемости генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%, редких форм не обнаружено. Во 2-й группе частота встречаемости генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 6,04%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 73,7%, редких аллелей – 0,2%, среди которых $(TA)_5/(TA)_6$, $(TA)_5/(TA)_7$, $(TA)_6/(TA)_8$ и $(TA)_7/(TA)_8$, а также новый, не описанный в литературе генотип – $(TA)_4/(TA)_6$. Было выявлено значимое повышение уровня общего билирубина и его фракций при сравнении генотипа синдрома Жильбера $(TA)_6/(TA)_7$ с референсным генотипом $(TA)_6/(TA)_6$ и генотипом $(TA)_6/(TA)_7$. Было продемонстрировано значимое повышение уровня общего билирубина у носителей большего количества *TA*-повторов. Статистически значимой разницы концентрации АЛТ, АСТ, холестерина, ЛПНП между подгруппами выявлено не было. Увеличение *TA*-повторов гена *UGT1A1* сопряжено с повышением общего билирубина и его непрямой фракции, в том числе при носительстве редких аллельных вариантов ($TA \leq 5$, $TA \geq 8$). Влияния генотипа *UGT1A1* на активность АЛС и АСТ, а также на липидный профиль продемонстрировано не было.

Ключевые слова: синдром Жильбера; ген *UGT1A1*; гипербилирубинемия.

Для цитирования: Сидоренко Д.В., Назаров В.Д., Волникова Е.Г., Кондрашева Е.А., Пешкова Н.Г., Ковалева И.С., Кокорина О.С., Сватковская И.Б., Лапин С.В. Зависимость биохимических показателей крови от различных генотипов гена *UGT1A1*, ассоциированного с синдромом Жильбера. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (2): 69-75
DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-69-75

Для корреспонденции: Сидоренко Дарья Владимировна, врач клин. лаб. диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний; e-mail: si-do-renko@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.11.2021

Принята к печати 24.11.2021

Опубликовано 23.02.2022

Sidorenko D.V.¹, Nazarov V.D.¹, Volnikova E.G.¹, Kondrasheva E.A.², Peshkova N.G.², Kovaleva I.S.², Kokorina O.S.²,
Svatkovskaya I.B.², Lapin S.V.¹

DEPENDENCE OF BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS ON VARIOUS GENOTYPES OF THE *UGT1A1*
GENE ASSOCIATED WITH GILBERT'S SYNDROME

¹Laboratory for diagnostics of autoimmune diseases» of Department of Molecular Medicine of First Pavlov State Medical
University of St. Petersburg, 197022, Saint-Petersburg, Russia;

²Limited Liability Company «Independent laboratory INVITRO», 125047, Moscow, Russia

Diagnosis of Gilbert's syndrome is based on the detection of homozygous carriage of an additional *TA*-repeat in the promoter of the *UGT1A1* gene, leading to a decrease in the activity of the UGT enzyme. No large studies have been done in the Russian Federation on the prevalence of carriage of Gilbert's syndrome, as well as the biochemical and molecular profile of such patients. The aim of the study is to evaluate biochemical and molecular genetic parameters in patients with Gilbert's syndrome in Russia. The study included 124 healthy volunteers (group 1) and 5650 patients with suspected Gilbert's syndrome (group 2). The number of *TA*-repeats of the promoter region of the *UGT1A1* gene was determined by the method of fragment analysis for all participants. The following biochemical parameters were analyzed for 299 patients from group 2: the level of bilirubin and its fractions, AST, ALT, cholesterol and LDL. In group 1 the prevalence of genotype $(TA)_6/(TA)_6$ was 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%, no rare forms were found. In group 2 the prevalence of genotype $(TA)_6/(TA)_6$ was 6,04%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05%, $(TA)_7/(TA)_7$

(TA)7 – 73,7%, rare alleles – 0,2%. Rare alleles included (TA)5/(TA)6, (TA)5/(TA)7, (TA)6/(TA)8 and (TA)7/(TA)8, as well as a new genotype not described in the literature previously – (TA)7/(TA)9. When assessing the level of total bilirubin and its fractions, a difference was revealed between the genotype of Gilbert's syndrome (TA)7/(TA)7 and the reference genotype (TA)6/(TA)6, and between genotypes (TA)7/(TA)7 and (TA)6/(TA)7. A significant increase in total bilirubin was demonstrated in carriers of a larger number of TA-repeats. There was no significant difference in the concentration of ALT, AST, cholesterol or LDL between different genotypes. The number of TA-repeats of the UGT1A1 gene affects the increase of total bilirubin and its indirect fraction, including the cases of rare allelic variants (TA_{≤5}, TA_{≥8}), but not the activity of ALT and AST and the lipid profile.

Key words: Gilbert's syndrome; UGT1A1 gene; hyperbilirubinemia.

For citation: Sidorenko D.V., Nazarov V.D., Volnikova E.G., Kondrasheva E.A., Peshkova N.G., Kovaleva I.S., Kokorina O.S., Svatkovskaya I.B., Lapin S.V. Dependence of blood biochemical parameters on various genotypes of the UGT1A1 gene associated with Gilbert's syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 69-75 (in Russ.) DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-69-75

For correspondence: Sidorenko Dar'ya Vladimirovna, clinical laboratory diagnostics specialist of Laboratory for diagnostics of autoimmune diseases; e-mail: si-do-renko@mail.ru

Information about authors:

Sidorenko D.V., <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>;
Nazarov V.D., <https://orcid.org/0000-0002-9354-879>;
Volnikova E.G., <https://orcid.org/0000-0001-7703-0396>;
Kondrasheva E.A., <https://orcid.org/0000-0002-8240-5452>;
Peshkova N.G., <https://orcid.org/0000-0001-7703-7221>;
Kovaleva I.S., <https://orcid.org/0000-0002-1675-3328>;
Kokorina O.S., <https://orcid.org/0000-0002-8368-6700>;
Svatkovskaya I.B., <https://orcid.org/0000-0001-8389-9872>;
Lapin S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was performed without external funding.

Received 01.11.2021
Accepted 24.11.2021
Published 23.02.2022

Введение. Синдром Жильбера представляет собой генетическую патологию с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующуюся нарушением конъюгации билирубина и обусловленную мутациями в гене UGT1A1. Ген UGT1A1 кодирует A1 изоформу фермента уридин-5-дифосфат глюкуронозилтрансферазы (УДФ-ГТ). Основной функцией данного фермента является глюкуронирование свободной фракции билирубина гепатоцитами с превращением его в конъюгированный (прямой, растворимый) для последующей секреции в желчь. Кроме того, УДФ-ГТ принимает участие в биотрансформации эндогенных гормонов, нейротрансмиттеров и экзогенных ксенобиотиков, канцерогенов и лекарственных средств, способствуя их выведению из организма [1].

Характерным внешним признаком патологии является иктеричность кожных покровов, склер и слизистых оболочек. Отмечаются разнообразие диспептические явления и астеновегетативный синдром. Симптомы патологии обычно возникают на фоне физического перенапряжения, инфекционных заболеваний, после голодания или низкокалорийной диеты, при приеме некоторых лекарственных препаратов. Диагностика синдрома Жильбера основывается на изменениях лабораторных показателей обмена билирубина – основным проявлением является увеличение общего билирубина за счет его непрямой фракции.

Основные клинические проявления синдрома Жильбера носят транзиторный характер и не ведут напрямую к тяжелым поражениям печени. Несмотря на легкость проявлений и симптомов синдрома Жильбера, важно дифференцировать доброкачественную гипербилирубинемиию, связанную с мутациями в гене UGT1A1, и повышение уровня билирубина в связи с более тяжелой патологией печени. Молекулярно-генетический анализ

аббераций в гене UGT1A1 позволяет установить этиологию гипербилирубинемии пациента и рационально подойти к диагностике и профилактике заболеваний гепатобилиарной системы. В настоящее время известно более 130 изменений в гене UGT1A1, способных влиять на активность глюкуронозилтрансферазы, частота которых варьирует среди представителей различных этнических групп [2]. Они могут затрагивать как кодирующие последовательности гена, так и локализоваться в некодирующих регионах. Наиболее распространённой в европейской популяции мутацией, связанной с формированием синдрома Жильбера, является увеличение числа TA-повторов в промоторном регионе гена UGT1A1 [3].

У большинства людей в здоровой популяции ТАТА-боксы (ТАТА-box) промоторного региона гена UGT1A1 включает 6 tandemных повторов, что соответствует последовательности A(TA)₆TAA и обозначается как UGT1A1*1. Для данной аллели «дикого типа» (wild-type) характерен высокий уровень функциональной активности УДФ-ГТ и нормальные значения билирубина и его фракций. Показано, что увеличение количества ТА-повторов промоторного региона гена UGT1A1 снижает аффинность ТАТА-связывающего белка к ТАТА-боксу, вызывая снижение экспрессии гена и, как следствие, приводящее к непрямой гипербилирубинемии. Наиболее часто встречается инсерция дополнительного седьмого ТА-повтора (A(TA)₇TAA), что обозначается как UGT1A1*28 [4]. Гомозиготное носительство данной аллели является основной причиной формирования синдрома Жильбера и приводит к снижению активности УДФ-ГТ более чем на 50% относительно нормы [5].

Носительство A(TA)₇TAA довольно широко распространено – от 3% до 13% популяции являются гомозиготами по данной абберации [6], а аллельная частота A(TA)₇TAA в западной популяции достигает 40% [7].

Однако носительство аллели этнически неоднородно, так, среди населения Африки можно обнаружить до 23% гомозиготных носителей $A(TA)_7TAA$, а Европы – только 8%. В то же время мутация довольно редко отмечается у представителей азиатского происхождения (3% гомозигот), где синдром Жильбера чаще связан с другими aberrациями в гене *UGT1A1* [8]. Менее распространёнными аллельными вариантами гена *UGT1A1* являются изменение числа тандемных повторов до 5 ($A(TA)_5TAA$, *UGT1A1*36*) и 8 ($A(TA)_8TAA$, *UGT1A1*37*). Распространённость $A(TA)_7TAA$ в Российской Федерации до сих пор точно не ясна.

Кроме того, представляет интерес влияние количества TA -повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* на метаболизм липидов. Так, ряд исследований показывает, что люди с синдромом Жильбера имеют в три раза более низкие риски возникновения сердечно-сосудистой патологии по сравнению с носителями генотипа *UGT1A1*28/*1* и *UGT1A1*1/*1* [9], а также у них отмечается значимое уменьшение содержания ХС, ТГ и ЛПНП [10].

Целью данного исследования является оценка биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов с синдромом Жильбера в России.

Материал и методы. Для изучения распространённости аллели $A(TA)_7TAA$ на территории Северо-Запада России была отобрана группа контроля из 124 добровольцев (1-я группа). Также были проанализированы образцы венозной крови 5650 пациентов (2-я группа), направленных на молекулярное исследование гена *UGT1A1* из различных регионов Российской Федерации в связи с подозрением на наличие синдрома Жильбера на основании анамнестических, клинических и лабораторных данных (иктеричность кожных покровов и слизистых, диспепсические расстройства, гипербилирубинемия в анамнезе, наличие близких родственников с диагностированным синдромом Жильбера). Для всех участников было проведено молекулярно-генетическое исследование промотора гена *UGT1A1* с использованием высокоточного фрагментного анализа с помощью метода, разработанного в лаборатории диагностики ау-

тоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Миздрава РФ, позволяющего выявлять количество TA -повторов. Паттерны электроферограммы представлены на рис. 1, а–г. Условия ПЦР реакции и последовательность праймеров могут быть сообщены по запросу. Для проведения исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя из венозной крови.

Для 299 пациентов из 2-й группы была собрана информация по следующим лабораторным показателям: уровень билирубина (общий, прямой, непрямой), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Измерение биохимических показателей производилось кинетическим и колориметрическим фотометрическим методами.

Все пациенты были разделены на 3 подгруппы в зависимости от результата анализа генетического исследования промоторной области гена *UGT1A1*: $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$.

Статистическая обработка полученных данных была произведена с использованием программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В общей группе из 5774 пациентов после проведения молекулярно-генетического тестирования была определена распространённость различных генотипов и аллельная частота гена *UGT1A1*. Статистическая обработка производилась непараметрическими методами Пирсона (χ^2), Фишера. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

В 1-й группе распространённость генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 39,52% (49 добровольцев), гетерозиготного носительства $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23% (66 добровольцев), гомозиготной мутации $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26% (9 добровольцев).

Во 2-й группе распространённость генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 6,04% (341 пациент), гетерозиготно-

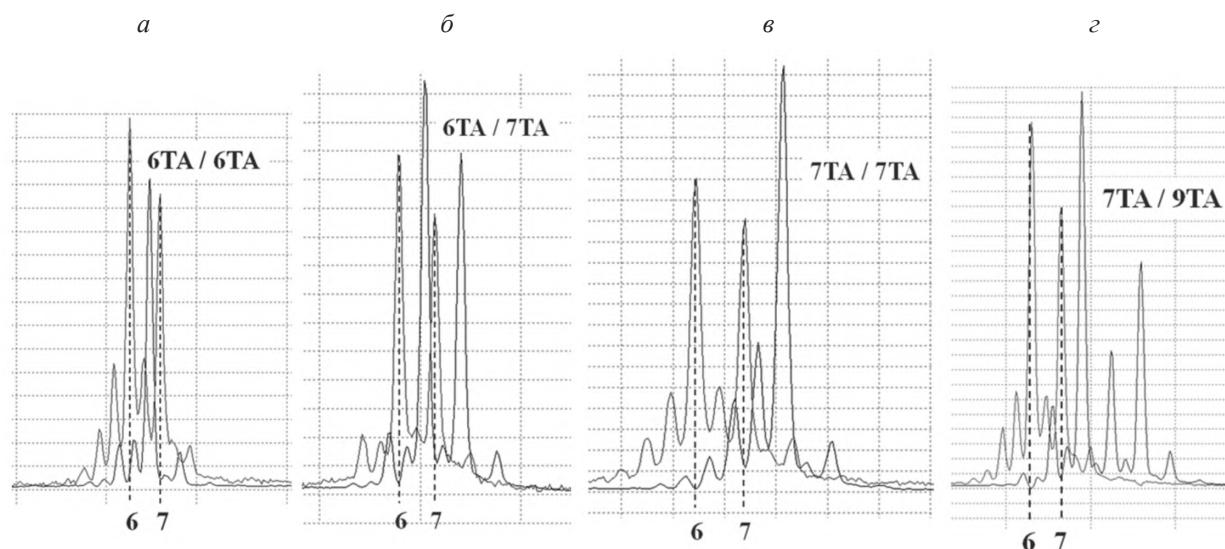


Рис. 1. Паттерн электроферограммы различных генотипов *UGT1A1*. а – генотип $(TA)_6/(TA)_6$; б – генотип $(TA)_6/(TA)_7$; в – генотип $(TA)_7/(TA)_7$; г – генотип $(TA)_7/(TA)_9$.

BIOCHEMISTRY

го носительства $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05% (1133 пациента), гомозиготной мутации $(TA)_7/(TA)_7$ – 73,7% (4165 пациентов), а на долю редких аллелей пришлось 0,2% (11 пациентов). Среди редких аллелей были обнаружены: $(TA)_5/(TA)_6$ – 0,02% (1 пациент), $(TA)_5/(TA)_7$ – 0,11% (6 пациентов), $(TA)_6/(TA)_8$ – 0,02% (1 пациент), $(TA)_7/(TA)_8$ – 0,04% (2 пациента) и новый, ранее не описанный в литературе генотип, $(TA)_7/(TA)_9$ – 0,02% (1 пациент). Паттерн электроферограммы пациента с генотипом $(TA)_7/(TA)_9$ представлен на рис. 1, з.

Распространённость генотипов *UGT1A1* для 1-й и 2-й групп отображена на рис. 2, а. Аллельная частота различных аллелей гена *UGT1A1* для 1-й и 2-й групп отображена на рис. 2, б.

Для 299 пациентов из 2-й группы было произведено исследование биохимических показателей крови. Между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ было проведено сравнение уровня следующих лабораторных показателей: общий билирубин, прямой билирубин, не прямой билирубин, АЛТ, АСТ, общий холестерин и ЛПНП.

Средние значения общего билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $15,2 \pm 9,9$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $22,8 \pm 13$ мкмоль/л,

$(TA)_7/(TA)_7$ – $35,9 \pm 17,1$ мкмоль/л. Была показана статистически значимая разница концентрации общего билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ ($p=0,019$), $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$). Данные приведены на рис. 3, а.

Средние значения показателей общего билирубина для всех генотипов *UGT1A1*, включая редкие аллели, продемонстрированы на рис. 3, б.

Средние концентрации прямого билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $5,8 \pm 2,2$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $7,1 \pm 2,7$ мкмоль/л, $(TA)_7/(TA)_7$ – $9,5 \pm 2,4$ мкмоль/л. Также была обнаружена статистически значимая разница концентрации прямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), но не для $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ ($p=0,12$). Данные приведены на рис. 4, а.

Средние значения непрямого билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $11,2 \pm 6,7$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $15,6 \pm 10,8$ мкмоль/л, $(TA)_7/(TA)_7$ – $25,7 \pm 15,2$ мкмоль/л. Была показана статистически значимая разница концентрации непрямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$

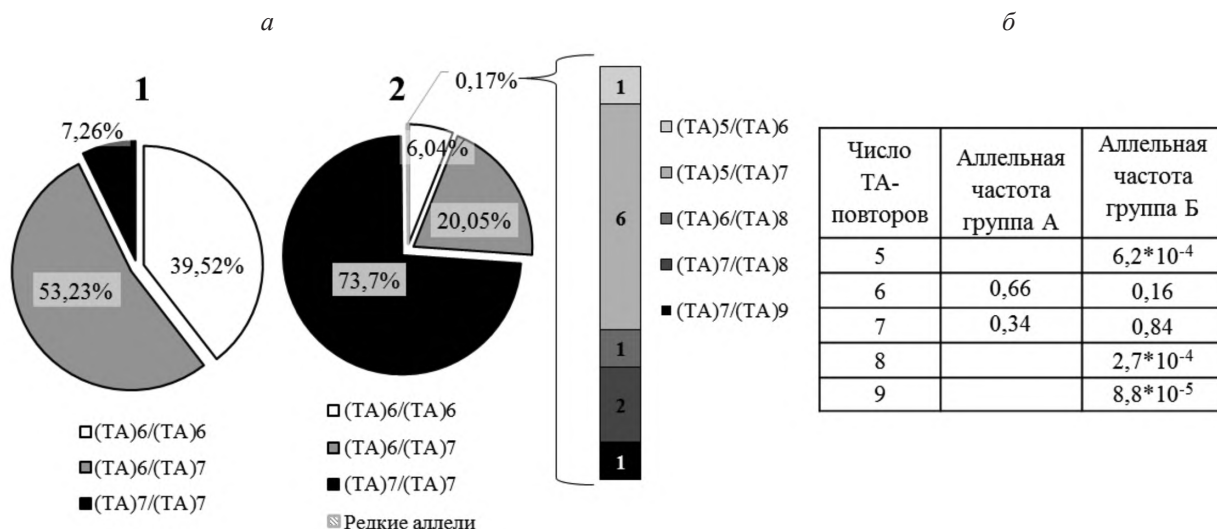


Рис. 2. Распространённость генотипов *UGT1A1*. а – частота генотипов; б – аллельная частота. 1 – 1-я группа; 2 – 2-я группа.

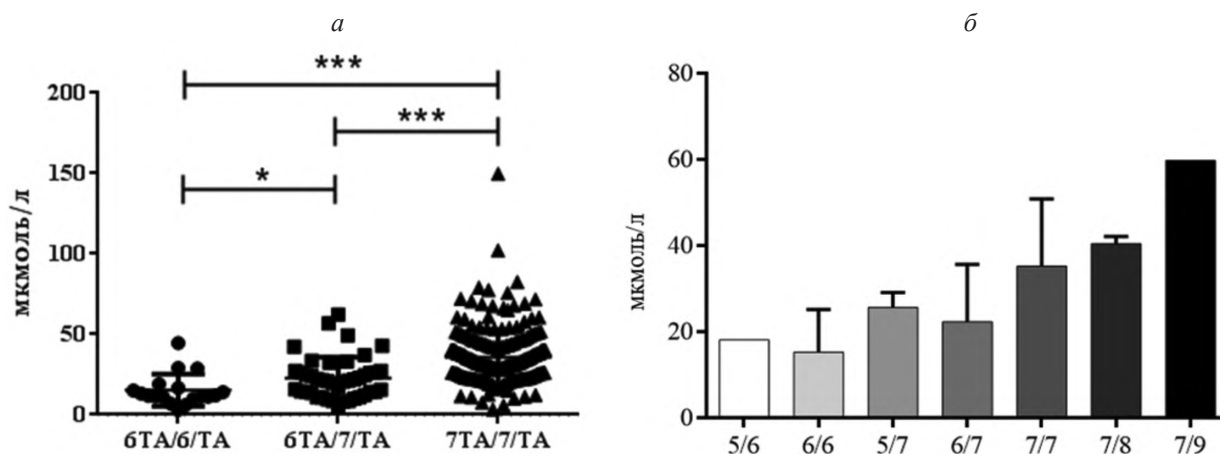


Рис. 3. Концентрация общего билирубина в зависимости от генотипа *UGT1A1*. а – значения концентраций; б – средние значения.

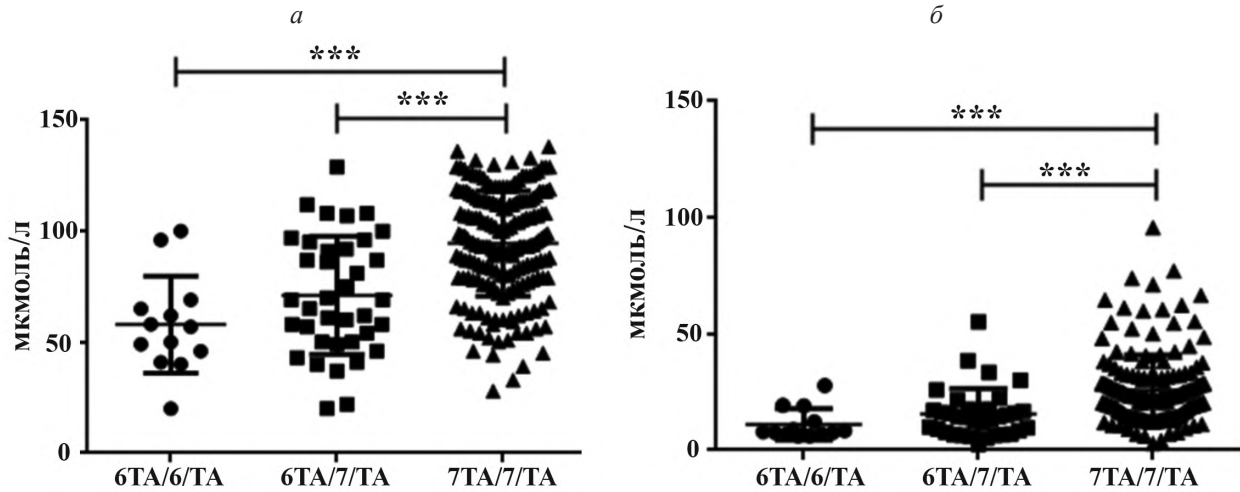


Рис. 4. Значение концентраций фракций билирубина в зависимости от генотипа *UGT1A1*. а – прямая фракция; б – непрямая фракция.

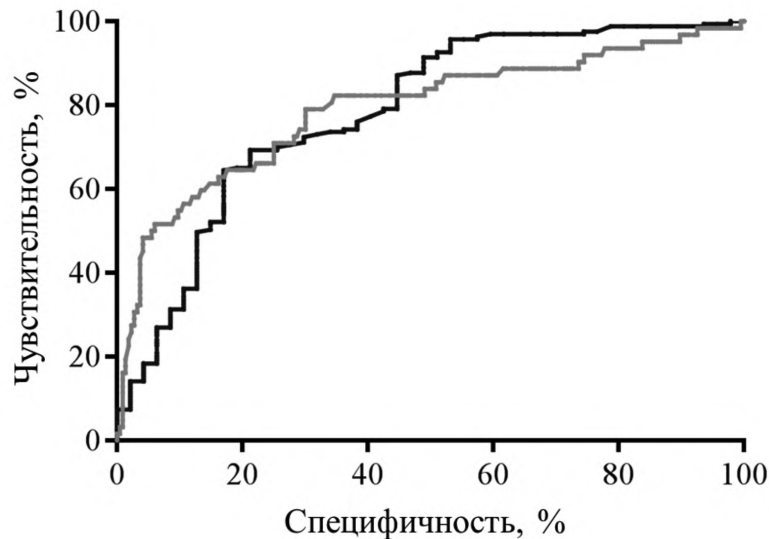


Рис. 5. Кривая ROC-анализа уровня общего (черный цвет) и непрямого билирубина (серый цвет) при сравнении пациентов с генотипом $(TA)_7/(TA)_7$ против $(TA)_7/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_6$.

($p < 0,0001$). Статистически значимой разницы в концентрации непрямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ обнаружено не было ($p = 0,18$). Данные приведены на рис. 4, б.

При проведении ROC-анализа для группы пациентов с синдромом Жильбера (генотип $(TA)_7/(TA)_7$) в сравнении с остальными участниками (рис. 5) значение площади под кривой для уровня непрямого билирубина составило $AUC = 0,79$, для общего билирубина – $AUC = 0,78$. В качестве скрининга на синдром Жильбера по данным нашего исследования оптимальное значение cut-off составило непрямого билирубин $> 12,3$ мкмоль/л с чувствительностью 91,41% и специфичностью 51,06%.

Статистически значимой разницы концентрации АЛТ, АСТ, холестерина, ЛПНП между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ найдено не было ($p > 0,05$).

Обсуждение. В 1-й группе, состоявшей из 124 здоровых добровольцев, аллельная частота $A(TA)_7TAA$ составила 34%, а $A(TA)_6TAA$ – 66%, что соответствует дан-

ным, полученным в исследовании E. Beutler и соавт. [4], где аллельная частота $A(TA)_7TAA$ и $A(TA)_6TAA$ составила 38,7% и 61,3% соответственно. Результаты генотипирования контрольной группы составили: $(TA)_6/(TA)_6$ – 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%. Такое распределение является сопоставимым с результатами исследования из Малазии, в котором приняли участие 248 добровольцев европеоидного происхождения – $(TA)_6/(TA)_6$ – 44,4%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 47,1%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 8,5% [11]. Таким образом, структура аллельных вариантов промоторной области гена *UGT1A1* в Российской Федерации в целом соответствует общеевропейской.

Во 2-й группе из 5650 пациентов с подозрением на синдром Жильбера частота встречаемости патологической аллели $A(TA)_7TAA$ составила 84%, а нормальной $A(TA)_6TAA$ – 16%, что значительно отличается от здоровой европейской популяции. Это может объясняться особенностью представленной выборки, поскольку в данное исследование включались пациенты с подозрением на синдром Жильбера по результатам клинической

картины и лабораторных показателей, что и объясняет такую высокую распространённость мутации. Генотипы *UGT1A1* в группе распределились следующим образом: (TA)₇/(TA)₇ – 73,7%, (TA)₆/(TA)₇ – 20,05%, (TA)₆/(TA)₆ – 6,04%. Эти данные являются сопоставимыми с результатами генотипирования 51 младенца с диагнозом синдром Жильбера – (TA)₇/(TA)₇ – 76,5%, (TA)₆/(TA)₇ – 15,9%, (TA)₆/(TA)₆ – 3,9% [12]. Таким образом, для более 70% пациентов из 2-й группы с подозрением на синдром Жильбера удалось верифицировать диагноз молекулярно-генетическими методами.

На долю редких аллелей во 2-й группе (меньше 6 и больше 7 TA-повторов) пришлось 0,2% всех исследуемых. Аллельная частота A(TA)₅TAA оставила $6,2 \cdot 10^{-4}$, а для A(TA)₈TAA – $2,7 \cdot 10^{-4}$. Аллельные частоты редких аллелей в данном исследовании были ниже, чем в исследовании Lamre и коллег ($5 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-3}$ соответственно для смешанной популяции) [13], A(TA)₅TAA и A(TA)₈TAA могут реже встречаться в российской популяции в связи с их преимущественным распространением на территории африканского континента [14]. Кроме того, удалось обнаружить ранее не описанную в литературе аллель – девятый TA-повтор в промоторе гена *UGT1A1* (A(TA)₉TAA). В контрольной группе редких аллелей гена *UGT1A1* обнаружено не было, что вероятно связано с небольшой выборкой участников исследования.

Необходимо отметить, что кроме промоторного региона также интерес представляют нуклеотидные замены в кодирующих областях гена *UGT1A1*. Так, аминокислотная замена р.G71R (*UGT1A1**6) в 1 экзоне, аллельная частота которой в азиатских странах превышает аллельную частоту A(TA)₇TAA (16-21% против 11-15%) [15], в случае гомозиготного носительства или при наличии феномена компаунд гетерозиготности с A(TA)₇TAA также приводит к формированию фенотипа синдрома Жильбера [11]. Распространённость этого полиморфизма на территории России в различных популяциях также требует дальнейшего изучения.

Для 299 пациентов из 2-й группы были собраны данные о различных биохимических показателях, включая уровень билирубина (общий, прямой, непрямой), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ), холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

При сравнении средних значений общего билирубина была установлена значимая разница между всеми подгруппами – (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₆/(TA)₇ ($p=0,019$), (TA)₆/(TA)₇ и (TA)₇/(TA)₇ ($p<0,0001$), (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₇/(TA)₇ ($p<0,0001$). Это отражает основной молекулярный механизм развития синдрома Жильбера – нарушение функциональной активности фермента УДФ-ГТ вследствие инсерции дополнительного TA-повтора в промоторную область гена *UGT1A1*, из-за чего нарушается нормальная утилизация билирубина из организма [4]. Аналогичные результаты были получены при исследовании на 1780 добровольцах, где между каждым генотипом *UGT1A1* (6/6, 6/7, 7/7) была найдена значимая разница в среднем уровне общего билирубина [9]. Таким образом, наличие даже 1 копии A(TA)₇TAA оказывает влияние на активность кодируемого фермента и может проявляться как умеренная гипербилирубинемия. Вероятно, это наблюдение стоит учитывать при назначении гетерозиготным носителям препаратов, метаболизирующихся ферментом УДФ-ГТ.

При исследовании средних уровней прямого и непрямого билирубина была получена значимая разница при сравнении гомозиготных носителей абберрации с гетерозиготными и с генотипом (TA)₆/(TA)₆ ($p<0,0001$). При сравнении нормального генотипа *UGT1A1* с гетерозиготными носителями значимой разницы не было получено ни для одной фракции билирубина ($p>0,05$). Это может быть объяснено тем, что при гетерозиготном носительстве A(TA)₇TAA уровень УДФ-ГТ снижается, но остается достаточным для утилизации большей части билирубина, то есть для развития синдрома Жильбера необходимо два патологических аллеля. Так, при исследовании количества продукта гена *UGT1A1* значимое уменьшение выработки УДФ-ГТ микросомами печени (что косвенно отражает активность фермента) наблюдалось между группами (TA)₆/(TA)₇ и (TA)₇/(TA)₇ и (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₇/(TA)₇, но не между (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₆/(TA)₇ [16].

По данным ROC-анализа для группы пациентов с синдромом Жильбера (генотип (TA)₇/(TA)₇) в сравнении с остальными участниками, наибольшее значение площади под кривой было выявлено для уровня непрямого билирубина (AUC=0,79). Учитывая преимущественное использование уровня непрямого билирубина в качестве скрининга на синдром Жильбера, по данным нашего исследования оптимальное значение cut-off составило >12,3 мкмоль/л с чувствительностью 91,41% и специфичностью 51,06%. Такие низкие показатели связаны прежде всего с тем, что для определенной части пациентов с синдромом Жильбера характерна транзиторная гипербилирубинемия, провоцируемая различными внешними факторами, таким образом биохимическое исследование вне обострения может быть не показательным.

При исследовании печеночных ферментов у пациентов с подозрением на синдром Жильбера не было обнаружено значимой разницы между носителями различных генотипов *UGT1A1* ($p>0,05$). В целом цитолитический синдром (АЛТ и/или АСТ > 40 Ед/л) был выражен только у 10% обследуемых и вероятно обусловлен иными причинами. Это связано с тем, что дефицит УДФ-ГТ и гипербилирубинемия в целом не оказывают цитопатического действия на гепатоциты, и гиперферментемия не свойственна таким пациентам [17]. Полученные данные подтверждаются исследованием S. Kamal и соавт. [18], где не было обнаружено значимой разницы в уровнях активности АЛТ и АСТ между пациентами с синдромом Жильбера и группой контроля.

При оценке лабораторных показателей носителей редких аллелей (A(TA)₅TAA, A(TA)₈TAA) была отмечена прямая зависимость между количеством TA-повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* и средними уровнями общего билирубина (см. рис. 5). По-видимому, число TA-повторов имеет обратную зависимость с уровнем экспрессии гена и активностью фермента – в исследованиях показано, что носительство A(TA)₅TAA ассоциировано с повышением промоторной активности гена [15], а A(TA)₈TAA, напротив, со снижением уровня УДФ-ГТ. Так, в исследовании E. Beutler и соавт. [4] показано, что носители A(TA)₅TAA обладали более высокой активностью УДФ-ГТ по сравнению с генотипом A(TA)₆TAA, а носители A(TA)₇TAA и A(TA)₈TAA – сниженной. Также среди исследуемых индивидуумов был обнаружен ранее не описанный *in vivo* генотип – инсерция девятого TA-повтора в промоторе гена *UGT1A1*. Несмотря на отсутствие литературных данных, в той же работе E. Beutler было показано, что синтезированный путем мутагенеза

промотор А(ТА)₉ТАА обладал активностью, схожей с А(ТА)₈ТАА.

Заключение. Таким образом, нами было проведено объемное исследование, посвященное лабораторным и молекулярно-биологическим характеристикам синдрома Жильбера в Российской Федерации. Большинство пациентов с подозрением на эту нозологию по результатам клинической картины и биохимических показателей являлись гомозиготными носителями инсерции седьмого повтора в промоторном регионе гена *UGT1A1*, что является лабораторным подтверждением диагноза. Число ТА-повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* напрямую влияет на степень повышения общего билирубина и его непрямой фракции. Также впервые был описан феномен инсерции девятого ТА-повтора и обнаружен генотип (ТА)₇/(ТА)₉. Вопрос о протективном влиянии генотипов *UGT1A1* на липидный профиль остаётся открытым и требует дальнейшего углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tukey R.H., Strassburg C.P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 581–616.
2. Canu G., Minucci A., Zuppi C., Capoluongo E. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2013; 50: 273–80.
3. Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C., Gantla S., de Boer A., Oostra B.A. et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1171–5.
4. Beutler E., Gelbart T., Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 8170–4.
5. Auclair C., Hakim J., Boivin P., Troube H., Boucherot J. Bilirubin and paranitrophenol glucuronyl transferase activities of the liver in patients with Gilbert's syndrome. An attempt at a biochemical breakdown of the Gilbert's syndrome. *Enzyme.* 1976; 21: 97–107.
6. Travan L., Lega S., Crovella S., Montico M., Panontin E., Demarini S. Severe neonatal hyperbilirubinemia and UGT1A1 promoter polymorphism. *J. Pediatr.* 2014; 165: 42–5.
7. Bosma P.J. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J. Hepatol.* 2003; 38: 107–17.
8. Burchell B., Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 14(10): 960-6.
9. Lin J.P., O'Donnell C.J., Schwaiger J.P., Cupples L.A., Lingenhel A., Hunt S.C. et al. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2006 Oct 3; 114(14):1476-81.
10. Boon A.-C., Hawkins C.L., Bisht K., Bakrania B., Coombes J.S., Wagner K.-H. et al. Reduced circulating oxidized LDL is associated with hypocholesterolemia and enhanced thiol status in Gilbert's syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52: 2120–7.
11. Zhang M., Wang H., Huang Y., Xu X., Liu W., Ning Q., Chen T., Qi J. 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.
12. Vukovic M., Radlovic N., Lekovic Z., Vucicevic K., Maric N., Kotur N. et al. UGT1A1 (TA)_n Promoter Genotype: Diagnostic and Population Pharmacogenetic Marker in Serbia. *Balkan J. Med. Genet.* 2018; 21(1): 59-68.
13. Lampe J.W., Bigler J., Horner N.K., Potter J.D. UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics.* 1999 Jun; 9(3): 341-9.
14. Iolascon A., Faienza M.F., Centra M., Storelli S., Zelante L., Savoia A. (TA)₈ allele in the UGT1A1 gene promoter of a Caucasian with Gilbert's syndrome. *Haematologica.* 1999 Feb; 84(2): 106-9.
15. Maruo Y., Nishizawa K., Sato H., Sawa H., Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics.* 2000; 106: E59.
16. Fang J.L., Lazarus P. Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes. from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13(1): 102-9.
17. Kaplan M., Hammerman C., Maisels M.J. Bilirubin genetics for the nongeneticist: Hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation. *Pediatrics.* 2003; 111: 886–93.
18. Kamal S., Abdelhakam S., Ghoraba D., Massoud Y., Aziz K.A., Hassan H. et al. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: a longitudinal study. *BMC Gastroenterology.* 2019 Feb 4; 19(1): 22.