

что в определенной степени нивелирует несколько большую токсичность исследуемых веществ.

**Список литературы:**

1. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 691 с.
2. Цыган В.Н., Камилова Т.А., Скальный А.В. и др. Патолофизиология клетки. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014 – 128 с.
3. Al-Madhoun A.S., Johnsamuel J., Barth R.F., Tjarks W., Eriksson S. Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy // Cancer Res – 2004. - V.64. – P. 6280 – 6286
4. Barth R.F., Yang W., Al-Madhoun A., et al. Boron-containing nucleosides as potential delivery agents for neutron capture therapy of brain tumors // Cancer research. – 2004. - V.64. – P. 6287– 6295

УДК 616.079.3

**Банина Д.Ю.**

**АКТУАЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ  
ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА**

Департамент биологии и фундаментальной медицины  
Уральский федеральный университет  
Екатеринбург, Российская Федерация

**Banina D.Y.**

**RELEVANCE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS FOR DIAGNOSIS  
OF GILBERT'S SYNDROME**

Department of Biology and Fundamental Medicine  
Ural Federal University  
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: baninadarya@gmail.com

**Аннотация.** В статье рассмотрена изменчивость ТА-повторов промоторной области гена UGT1A1, приводящая к изменению активности УДФ-глюкуронилтрансферазы. Пониженная активность этого фермента является одной из причин синдрома Жильбера (СЖ). Цель работы - установить актуальность молекулярно-генетического анализа для диагностики СЖ. Была исследована изменчивость ТА-повторов у 168 жителей Екатеринбурга с использованием методов ПЦР, электрофореза, секвенирования. В обследуемой группе были выявлены три из четырех известных аллелей гена UGT1A1 ((ТА)<sub>5</sub>, (ТА)<sub>6</sub> и (ТА)<sub>7</sub>). Частоты генотипов распределились следующим образом: генотип (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>6</sub> – 42,8%, (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> – 41,7 %, (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub> – 14,9%, редкий

генотип (ТА)<sub>5</sub>/(ТА)<sub>6</sub> – 0,6%. По результатам исследования был сделан вывод о неактуальности молекулярно-генетического анализа для подтверждения СЖ.

**Annotation.** The article deals the variability of TA repeats of the promoter region of the UGT1A1 gene, leading to a change in the activity of UDP-glucuronosyl transferase. The decreased activity of this enzyme is one of the causes of Gilbert's syndrome (GS). The purpose of the work is to establish the relevance of molecular genetic analysis for the diagnosis of GS. The variability of TA repeats was studied in 168 residents of Yekaterinburg using the methods of PCR, electrophoresis and sequencing. Three of the four known alleles of the UGT1A1 gene were identified in the study group ((ТА)<sub>5</sub>, (ТА)<sub>6</sub> и (ТА)<sub>7</sub>). The frequencies of genotypes were distributed as follows: genotype (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>6</sub> – 42,8%, (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> – 41,7%, (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub> – 14,9 %, rare genotype (ТА)<sub>5</sub>/(ТА)<sub>6</sub> – 0,6%. According to the results of the study, it was concluded that the molecular genetic analysis was irrelevant to confirm the GS.

**Ключевые слова:** синдром Жильбера, ген UGT1A1, аллель, генотип, молекулярно-генетический анализ

**Key words:** Gilbert's syndrome, gene UGT1A1, allele, genotype, molecular genetic analysis

### **Введение**

Синдром Жильбера (СЖ) – патология, характеризующаяся умеренным повышением уровня непрямого билирубина в крови, может проявляться периодами желтухи, особенно при стрессовых ситуациях. На сегодняшний день известно, что одной из причин СЖ является сниженная активность фермента уридин-5-дифосфат (УДФ) - глюкуронилтрансферазы, из-за мутаций в гене UGT1A1. В частности, известно четыре аллеля с 5, 6, 7 и 8 ТА-повторами ((ТА)<sub>5-8</sub>) в его промоторе. Считается, что оптимальная работа фермента для утилизации билирубина, обеспечивается генотипом с аллелем (ТА)<sub>6</sub> в гомозиготном состоянии, тогда как увеличение числа повторов приводит к снижению активности фермента. Аллели (ТА)<sub>5</sub> и (ТА)<sub>8</sub> встречаются крайне редко.

Для подтверждения диагноза СЖ в последнее время все чаще проводятся исследования промоторной области гена UGT1A1 на предмет определения числа ТА-повторов. С другой стороны, появляется все больше научных публикаций, ставящих под сомнение изменчивость в области промотора в качестве надежного признака СЖ. В частности, показано, что некоторые пациенты с установленным диагнозом СЖ, имеют генотип (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>6</sub> [7]. Тем не менее, генотипирование области промотора гена UGT1A1 представляет интерес с точки зрения фармакогенетики, так как количество ТА-повторов влияет на активность утилизации продуктов распада некоторых лекарственных средств.

Кроме того, следует отметить, что частоты ТА-аллелей сильно зависят от этнической и расовой принадлежности. Так, например, встречаемость аллеля

(ТА)<sub>7</sub> среди афроамериканцев составляет 42-56%, европеоидов - около 30%, а среди азиатов всего лишь 9-16% [2].

**Цель исследования** – установить надежность молекулярно - генетического анализа промоторной области гена UGT1A1 для диагностики СЖ на выборке жителей г. Екатеринбурга.

#### **Материалы и методы исследования**

Из жителей Екатеринбурга была сформирована случайная выборка - 168 человек (49 мужчин и 119 женщин) в возрасте 19 – 85 лет, принадлежащие к европеоидному типу. В ходе опроса (осведомленность уровня билирубина и т.д.) только 9 человек отметили характерные признаки (4 – с повышенным уровнем билирубина, 2 – с семейным анамнезом по СЖ, 2 – с установленным ранее СЖ, 1 – с характерной пигментацией в период беременности).

Выделение ДНК из буккального эпителия проводили с использованием набора «Проба Рапид» (ДНК-Технология, Москва) согласно инструкции производителя. ПЦР промоторного участка гена UGT1A1 проводили с использованием реакционного буфера ОТ-ПЦР-2FEP/FRT и полимеразы TaqF («ИнтерЛабСервис», Россия), праймеры и условия проведения соответствовали ранее опубликованным [5]. ПЦР проводилась в амплификаторе Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Разделение полученных ПЦР-фрагментов проводили методом вертикального электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (С=5, Т=20).

Для подтверждения результатов электрофореза была определена нуклеотидная последовательность отдельных ПЦР-образцов методом Сенгера, с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystems, USA). Последовательности гетерозигот обрабатывались в программе Poly Peak Parser [4] и MegaX [6].

Проверка на достоверность встречаемости генотипов проведена в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга с использованием метода хи-квадрат. При оценке распространённости генотипов в популяции жителей Екатеринбурга использовались формулы для нахождения доверительного интервала для доли признака в генеральной совокупности. Критический уровень значимости принимался равным 0,05.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Из 168 обследованных преобладали гомозиготы (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>6</sub> и гетерозиготы (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> приблизительно с одинаковым процентным соотношением (Табл. 1). В ходе исследования был обнаружен генотип (ТА)<sub>5</sub>/(ТА)<sub>6</sub> с редким аллелем (ТА)<sub>5</sub>. Полученные результаты распределения генотипов достоверны в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ( $\chi^2=2$ ).

Таблица 1

Частота встречаемости генотипов и ТА-аллелей в выборке  
с распространением на генеральную совокупность

Частоты генотипов (168)*				Частоты аллелей (336)			
Генотип	n	%	%	Аллель	n	%	%

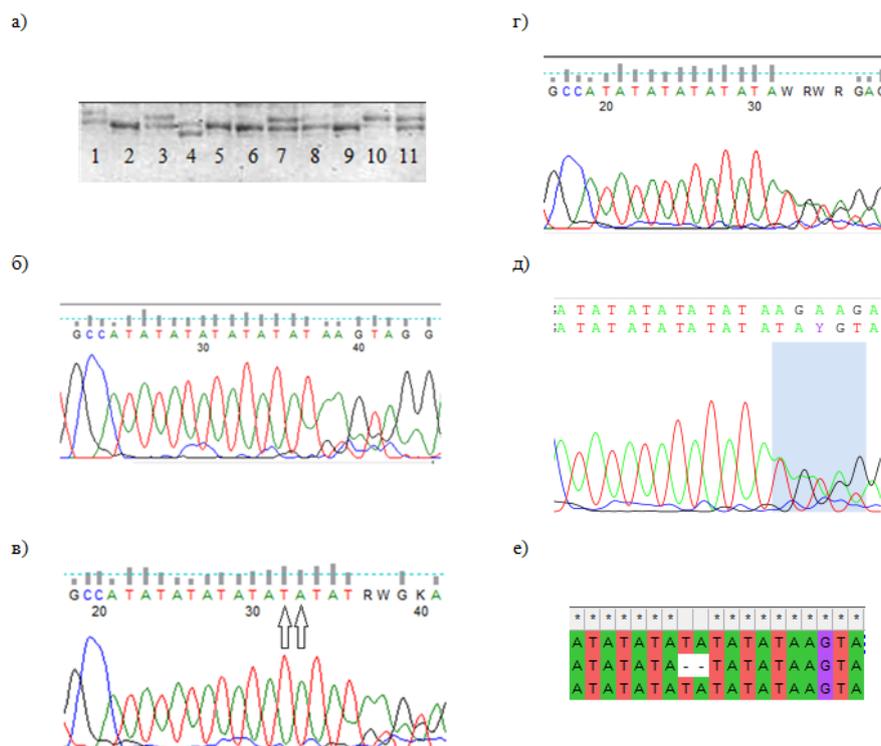
			ген.				ген.
(ТА) <sub>5</sub> /(ТА) <sub>6</sub>	1	<b>0,6</b>	± 1,2	(ТА) <sub>5</sub>	1	<b>0,3</b>	± 0,58
(ТА) <sub>6</sub> /(ТА) <sub>6</sub>	72	<b>42,8</b>	± 7,5	(ТА) <sub>6</sub>	215	<b>64</b>	± 5,13
(ТА) <sub>6</sub> /(ТА) <sub>7</sub>	70	<b>41,7</b>	± 7,4	(ТА) <sub>7</sub>	120	<b>35,7</b>	± 5,12
(ТА) <sub>7</sub> /(ТА) <sub>7</sub>	25	<b>14,9</b>	± 5,5	(ТА) <sub>8</sub>	-	-	-

\*статистических значимых отличий между женским и мужским полом не обнаружено

Среди девяти обследованных, отметивших какие-либо признаки, связанные с СЖ, шесть являлись гомозиготами (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub> (4 – с повышенным уровнем билирубина, 2 – с установленным ранее СЖ). У двух человек с семейным анамнезом генотипы определились как гетерозигота (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> и гомозигота (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>6</sub>. И один человек, отмечавший появление пигментации в период беременности, оказался с редким генотипом (ТА)<sub>5</sub>/(ТА)<sub>6</sub>. Последний случай неоднозначен, поскольку по некоторым данным аллель (ТА)<sub>5</sub> наоборот приводит к повышению активности фермента, однако пигментация могла быть вызвана факторами, не связанными с генотипом (ТА)<sub>5</sub>/(ТА)<sub>6</sub> [3]. Эта ситуация подтверждает недостаточность данных молекулярно-генетического анализа для выявления СЖ.

Исключая 6 человек описанных выше, 19 из 25 лиц с генотипом (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub> (76%) конкретных жалоб по уровню билирубина не высказывали. Можно предположить, что у данных людей нет СЖ, либо он носит скрытую форму и для его подтверждения необходимо проведение дополнительных исследований. Один человека с уровнем билирубина (18 мкмоль/л), лежащим в пределах нормы (8,5-20,5 мкмоль/л) имел генотип (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub>. Этот случай является примером того, что генотип не всегда служит надежным доказательством СЖ и показывает необходимость проведения нагрузочных проб, которые позволяют оценить изменение уровня билирубина при стрессовых ситуациях.

Для исключения ошибок электрофоретического определения генотипа было проведено секвенирование нескольких образцов, результаты которого



подтвердили данные электрофореза (Рис.1). При этом последовательность гомозигот полностью соответствовала представленным последовательностям в GenBank. Этот факт доказывает высокую консервативность областей, не затрагивающих повторы, что делает метод электрофореза приемлемым в использовании.

Рис. 1. Результаты использованных методов генотипирования.

(а) – электрофорез, где 2,5,6,9 –  $(TA)_6/(TA)_6$ ; 3,7,11 – аллельные лестницы, включающие аллели  $(TA)_6$  и  $(TA)_7$ ; 4 –  $(TA)_5/(TA)_6$ , 1,8 –  $(TA)_6/(TA)_7$ ; 10 –  $(TA)_7/(TA)_7$ . (б,в,г) – секвенирование, генотипы  $(TA)_6/(TA)_6$ ,  $(TA)_7/(TA)_7$ ,  $(TA)_5/(TA)_6$  соответственно, стрелками указана вставка ТА. (д) – разделение аллелей гетерозиготы  $(TA)_5/(TA)_6$  в Poly Peak Parser. (е) – разделение аллелей гетерозиготы  $(TA)_5/(TA)_6$  в MegaX, где верхняя строка референсная последовательность –  $(TA)_6$ , нижние строки – аллели  $(TA)_5$  и  $(TA)_6$

Данные по частоте встречаемости аллелей гена UGT1A1 у жителей Екатеринбурга сопоставимы с результатами, полученными для Европы и отдельных регионов России [1]. Частоту встречаемости аллеля  $(TA)_8$  оценить невозможно, так как он не встретился в нашем исследовании.

Все вышеизложенное говорит о том, что установление генотипа по промоторной области гена UGT1A1 не является надежным признаком СЖ. Хотя генотип  $(TA)_7/(TA)_7$  и является в некоторых случаях информативным, однако, вероятно, существуют другие факторы, влияющие на общую картину и состояние уровня билирубина в том числе. Установленный генотип по гену

UGT1A1 может рассматриваться как косвенный признак или указывать на возможную предрасположенность к СЖ.

### **Выводы**

Определение числа ТА-повторов промоторной области гена UGT1A1 не является надежным генетическим тестом для постановки диагноза СЖ, но в то же время может быть использовано в персонализированной фармакогенетике.

### **Список литературы**

1. Волков А. Н. Мутация гена UGT1A1 как маркер высокого риска возникновения синдрома Жильбера: научно-прикладные аспекты/ А. Н. Волков, Е. В. Цуркан // Анализ риска здоровью. – 2019. – №. 2

2. Barbarino J. M. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1 // Pharmacogenetics and genomics. – 2014. – Т. 24. – №. 3. – С. 177

3. Beutler E., Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? / E. Beutler, T. Gelbart, A. Demina // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Т. 95. – №. 14. – С. 8170-8174

4. Hill J. T. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products // Developmental Dynamics. – 2014. – Т. 243. – №. 12. – С. 1632-1636

5. Hsieh T. Y. Rapid molecular diagnosis of the Gilbert's syndrome-associated exon 1 mutation within the UGT1A1 gene // Genet Mol Res. – 2014. – Т. 13. – №. 1. – С. 670-679

6. Kumar S. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Molecular biology and evolution. – 2018. – Т. 35. – №. 6. – С. 1547-1549

7. Vukovic M. UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> promoter genotype: Diagnostic and population pharmacogenetic marker in Serbia // Balkan Journal of Medical Genetics. – 2018. – Т. 21. – №. 1. – С. 59-68

УДК 616-092

**Баранова М.Д., Хайкин А.А., Хайкин Н.А., Попугайло М.В.  
ВЛИЯНИЕ ОЖИРЕНИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ У  
ЛЮДЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

Кафедра патологической физиологии  
Уральского государственного медицинского университета  
Екатеринбург, Российская Федерация

**Baranova M.D., Khaykin A.A., Khaykin N.A., Popugailo M.V.  
INFLUENCE OF OBESITY ON AN OSTEANAGENESIS AT PEOPLE WITH  
A DIABETES MELLITUS.**

Department of pathological physiology