

ДЕТЕКЦИЯ МАЖОРНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *CFTR*, *SERPINA1*, *HFE* ПРИ ФЕНОТИПЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ НЕКОНЬЮГИРОВАННОЙ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ

DOI: 10.17691/stm2024.16.4.04

УДК 616.36:616.15:575.224.22

Поступила 12.01.2024 г.

© **А.А. Иванова**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний¹;
Н.Е. Апарцева, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека¹;
А.П. Каширина, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека¹;
Е.Г. Немцова, к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М. Рысса²;
Ю.В. Иванова, ординатор¹;
М.В. Кручинина, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии¹;
С.А. Курилович, д.м.н., профессор, зав. лабораторией гастроэнтерологии¹;
В.Н. Максимов, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний¹

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Б. Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089;

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, Санкт-Петербург, 191015

Цель исследования — поиск ассоциаций фенотипа доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии с мутациями rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*.

Материалы и методы. Дизайн исследования — «случай–контроль». Группа с фенотипом синдрома Жильбера (СЖ) ($n=414$; средний возраст — $36,7 \pm 15,9$ года; 49,8% мужчин) сформирована врачами-гастроэнтерологами. В нее включены лица с неконъюгированной гипербилирубинемией, прошедшие стандартное клиническое обследование. Лиц с известными причинами неконъюгированной гипербилирубинемии в исследование не включали. Группа контроля ($n=429$, средний возраст — $38,5 \pm 14,3$ года, 52,2% мужчин) — случайная выборка лиц из банков ДНК участников проекта MONICA, скрининга молодых людей 25–44 лет и одномоментного исследования школьников г. Новосибирска. ДНК была выделена методом фенол-хлороформной экстракции или экспресс-методом (ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА; ООО «ДНК-Технология», Москва) из венозной крови. Генотипирование групп по вариантам нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* выполнено методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин фрагментов на полиакриламидном геле.

Результаты. По генотипам и аллелям вариантов нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* не найдено статистически значимых различий между группой с СЖ и контрольной группой ($p>0,05$).

Заключение. Варианты нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* или их сочетания с rs3064744 гена *UGT1A1* не ассоциированы с СЖ.

Для контактов: Иванова Анастасия Андреевна, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Ключевые слова: синдром Жильбера; *UGT1A1*; *HFE*; *CFTR*; *SERPINA1*; неконъюгированная гипербилирубинемия.

Как цитировать: Ivanova A.A., Apartseva N.E., Kashirina A.P., Nemtsova E.G., Ivanova Y.V., Kruchinina M.V., Kurilovich S.A., Maksimov V.N. Detection of major mutations in *CFTR*, *SERPINA1*, *HFE* genes in benign unconjugated hyperbilirubinemia phenotype. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(4): 38, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.4.04>

English

Detection of Major Mutations in *CFTR*, *SERPINA1*, *HFE* Genes in Benign Unconjugated Hyperbilirubinemia Phenotype

A.A. Ivanova, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Testing of Therapeutic Diseases¹;

N.E. Apartseva, PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Genetic and Environmental Determinants of Human Life Cycle¹;

A.P. Kashirina, PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Genetic and Environmental Determinants of Human Life Cycle¹;

E.G. Nemtsova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology, and Dietology named after S.M. Ryssa²;

Y.V. Ivanova, Resident¹;

M.V. Kruchinina, MD, DSc, Associate Professor, Leading Researcher, Gastroenterology Laboratory¹;

S.A. Kurilovich, MD, DSc, Professor, Head of Gastroenterology Laboratory¹;

V.N. Maksimov, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Testing of Therapeutic Diseases¹

¹Institution of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 175/1 B. Bogatkova St., Novosibirsk, 630089, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 41 Kirochnaya St., Saint Petersburg, 191015, Russia

The aim of the study was to search for the associations of benign unconjugated hyperbilirubinemia phenotype with rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) mutations of *HFE* gene, rs113993960 (Δ F508) of *CFTR* gene, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) mutations of *SERPINA1* gene.

Material and Methods. The study design is case–control. The group with Gilbert’s syndrome (GS) phenotype (n=414; mean age — 36.7±15.9 years; 49.8% men) was formed by gastroenterologists, and included the individuals with unconjugated hyperbilirubinemia who underwent a standard clinical examination. The individuals with known causes of unconjugated hyperbilirubinemia were excluded from the group. The control group (n=429; mean age — 38.5±14.3 years; 52.2% men) was a random sampling from DNA banks of MONICA project participants, the screening of young people aged 25–44 and a one-time study of schoolchildren in Novosibirsk (Russia). DNA was isolated by phenol-chloroform extraction or by the express method (PROBA-RAPID-GENETIKA; DNA-Technology, Moscow, Russia) from venous blood. Genotyping of groups by nucleotide sequence rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) of *HFE* gene, rs113993960 (Δ F508) of *CFTR* gene, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) of *SERPINA1* gene was performed by polymerase chain reaction followed by the analysis of fragment length polymorphism on a polyacrylamide gel.

Results. According to the genotypes and alleles of the variants rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) of *HFE* gene, rs113993960 (Δ F508) of *CFTR* gene, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) of *SERPINA1* gene, no statistically significant differences were found between the GS group and the control group (p>0.05).

Conclusion. Nucleotide sequence variants rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) of *HFE* gene, rs113993960 (Δ F508) of *CFTR* gene, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) of *SERPINA1* gene, or their combinations with rs3064744 of *UGT1A1* gene were found to have no association with GS.

Key words: Gilbert’s syndrome; *UGT1A1*; *HFE*; *CFTR*; *SERPINA1*; nonconjugated hyperbilirubinemia.

Введение

Актуальность поиска молекулярно-генетических маркеров доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии не вызывает сомнений, так как данная патология широко распространена. Частота

синдрома Жильбера (СЖ) в популяции составляет около 10%. Для СЖ характерна вариабельная экспрессивность и пенетрантность, что говорит о неполноте фундаментальных знаний об этом синдроме [1]. Недостаточная корреляция «фенотип–генотип» является одним из важных критериев олигогенности

болезни. Вероятно, для европеоидного населения кроме частого варианта rs3064744 гена *UGT1A1* существуют другие варианты нуклеотидной последовательности генов и молекулярно-генетические механизмы, которые могут объяснить разную степень проявления клинических симптомов неконъюгированной гипербилирубинемии при разных генотипах варианта гена *UGT1A1*.

Как показывает клиническая практика, на течение доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии может влиять носительство редких аллелей мутаций, которые вызывают другие заболевания (муковисцидоз, альфа-1-антитрипсиновая недостаточность, гемохроматоз), нарушающие функции печени.

Развитие муковисцидоза связано с мутациями в гене *CFTR*, которые приводят к нарушению функции хлоридного канала, контролирующего секрецию и абсорбцию воды и ионов в эпителиальных тканях. Наиболее распространенной мутацией в гене *CFTR* при муковисцидозе является вариант rs113993960 ($\Delta F508$) гена *CFTR* (OMIM 602421).

Наследственный гемохроматоз первого типа развивается вследствие мутаций в гене *HFE*, вызывающих дисфункцию белка — регулятора абсорбции железа. Большинство случаев наследственного гемохроматоза первого типа связывают с вариантами rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE* (OMIM 235200).

Причиной развития альфа-1-антитрипсиновой недостаточности являются мутации в гене *SERPINA1* (наиболее часто — варианты rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена), приводящие к нарушению функции кодируемого геном белка — ингибитора сериновой протеазы.

Такие мутации вызывают серьезные нарушения функций гепатоцитов, что значительно снижает их способность адаптироваться и компенсировать любые вредные воздействия и факторы, в первую очередь химической и биологической природы. Например, описаны случаи тяжелого поражения печени при сочетании редких вариантов гена *UGT1A1* с мутациями в гене *HFE* [2].

Таким образом, **целью исследования** является анализ ассоциации доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии с мажорными мутациями rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 ($\Delta F508$) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*.

Материалы и методы

Дизайн исследования — «случай–контроль».

Группа лиц с фенотипом СЖ (n=414; средний возраст — 36,7±15,9 года; 49,8% мужчин и 50,2% женщин) сформирована врачами-гастроэнтерологами. В нее включены лица с неконъюгированной гипербилирубинемией, прошедшие стандартное клини-

ческое обследование. Лиц с известными причинами неконъюгированной гипербилирубинемии в исследование не включали. ДНК была выделена методом фенол-хлороформной экстракции или экспресс-методом (ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА; ООО «ДНК-Технология», Москва) из венозной крови.

Контрольная группа (n=429; средний возраст — 38,5±14,3 года; 52,2% мужчин и 47,8% женщин) — случайная выборка лиц из банков ДНК участников проекта MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CArdiovascular disease), скрининга молодых людей 25–44 лет и одномоментного исследования школьников г. Новосибирска. ДНК была выделена методом фенол-хлороформной экстракции из венозной крови.

Исследование одобрено этическим комитетом НИИТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН — и соответствует требованиям Хельсинкской декларации (2013). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на молекулярно-генетический анализ.

Группы статистически значимо не отличались друг от друга по полу и возрасту.

В обеих группах методом полимеразной цепной реакции определены частоты генотипов rs3064744 (количество ТА-повторов в промоторе) гена *UGT1A1*; методика генотипирования описана в предыдущих публикациях [3].

Генотипирование групп по вариантам нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 ($\Delta F508$) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* проведено методом полимеразной цепной реакции, полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов на полиакриламидных гелях.

Для генотипирования по варианту rs1799945 (H63D) использовали праймеры 5'-TGGTCTTTCTTTGTTTGAAGC-3'(F) и 5'-TCCATAATAGTCCAGAAGTCAACAG-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-HCl (pH=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,4 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: 35 циклов, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 60°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы Ksp22 I («СибЭнзайм», Новосибирск). Размер продукта амплификации — 195 п.н. После проведения рестрикции при генотипе CC детектировались продукты 137 и 58 п.н., при генотипе GG — 195 п.н., при гетерозиготном генотипе CG — 195, 137 и 58 п.н.

Для генотипирования по rs1800562 (C282Y) использовали праймеры 5'-CCCTGGGGAAGAGCAGAGAT-

3'(F) и 5'-ССТТТGATTGCCACCCTC-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,4 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: 35 циклов, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 60°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы Rsa I («СибЭнзайм», Новосибирск). Размер продукта амплификации — 207 п.н. После проведения рестрикции при генотипе AA детектировались продукты 137 и 76 п.н., при генотипе GG — 207 п.н., при гетерозиготном генотипе GA — 207, 131 и 76 п.н.

Для генотипирования по rs1800730 (S65C) использовали праймеры 5'-TGTTGCTCTGTCTCCAGGT-3'(F) и 5'-CTGGAAACCCATGGAGTTC-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 3,5 мМ MgCl₂, по 0,8 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: 35 циклов, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 58°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы Hinf I («СибЭнзайм», Новосибирск). Размер продукта амплификации — 171 п.н. После проведения рестрикции при генотипе ТТ детектировался продукт 171 п.н., при генотипе АА — 133 и 38 п.н., при гетерозиготном генотипе АТ — 171, 133 и 38 п.н.

Для генотипирования по rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR* использовали праймеры 5'-TTTTCTGGATTATGCCTGGCACC-3'(F) и 5'-GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,4 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: 33 цикла, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 63°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Детекцию продуктов амплификации выполняли в 10% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Размер продукта амплификации при генотипе II — 97 п.н., ID — 97, 94 и 3 п.н., DD — 94 и 3 п.н.

Для генотипирования по rs28929474 (PIZ) использовали праймеры 5'-АТААГГСТGTGCTGACCATCGTC-3'(F) и 5'-TTGGGTGGGATTCACCACTTTTC-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,4 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следу-

ющих условиях: 35 циклов, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 56°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Рестрикцию проводили с 10 единицами активности рестриктазы Taq I («СибЭнзайм», Новосибирск). Размер продукта амплификации — 179 п.н. После проведения рестрикции при генотипе GG детектировались продукты 160 и 19 п.н., при генотипе АА — 179 п.н., при гетерозиготном генотипе GA — все перечисленные продукты (179, 160 и 19 п.н.)

Для генотипирования по rs17580 (PIS) использовали праймеры 5'-TGAGGGGAACTACAGCACCTCG-3'(F) и 5'-AGGTGTGGCAGCTTCTTGGTCA-3'(R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН=9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 3,5 мМ MgCl₂, по 0,8 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: 35 циклов, включающих денатурацию, — 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров — 61°C в течение 30 с и элонгацию — 72°C в течение 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы Taq I («СибЭнзайм», Новосибирск). Размер продукта амплификации — 121 п.н. После проведения рестрикции при генотипе АА детектировались продукты 100 и 21 п.н., при генотипе ТТ — продукт 121 п.н., при гетерозиготном генотипе АТ — все перечисленные продукты (121, 100 и 21 п.н.)

Статистический анализ. Полученные результаты генотипирования статистически обработаны с помощью пакета программ SPSS 16.0. С использованием критерия χ^2 оценено соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга в контрольной группе. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей, относительный риск по конкретному аллелю или генотипу вычислены с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону, точного двустороннего критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. За уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

Частоты генотипов мутации rs3064744 (количество ТА-повторов в промоторе) гена *UGT1A1* в группе СЖ и контрольной группе представлены на рис. 1. По частотам генотипов варианта rs3064744 найдены статистически значимые различия между группами ($p < 0,001$). Генотип 7ТА/7ТА мутации rs3064744 чаще встречается в группе лиц с неконъюгированной гипербилирубинемией по сравнению с контрольной группой (ОШ=20,6; 95% ДИ: 14,2–29,9; $p < 0,001$).

В контрольной группе наблюдаемые частоты генотипов вариантов нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*

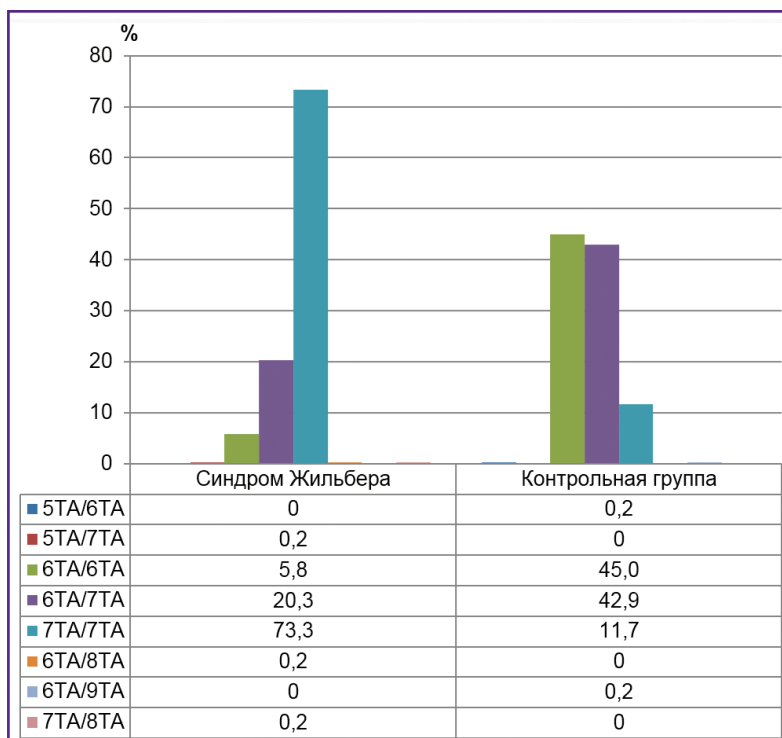


Рис. 1. Частоты генотипов мутации rs3064744 гена *UGT1A1* в группе с синдромом Жильбера и в контрольной группе ($p < 0,001$)

соответствуют ожидаемым согласно равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2=0,60; 0,38; 0,16; 0,001; 0,05; 0,03$ соответственно).

По частотам генотипов и аллелей rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 ($\Delta F508$) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* не найдено статически значимых различий между группой СЖ и контрольной группой ($p > 0,05$). Частоты этих генотипов представлены на рис. 2–4.

В группе с СЖ 64% участников не являются носителями редких аллелей изученных вариантов олигоценных заболеваний печени — rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, $\Delta F508$ гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*.

6 из 24 человек группы с СЖ с генотипом 6TA/6TA варианта rs3064744 являются носителями гетерозиготного генотипа CG rs1799945 (H63D) гена *HFE*, 1 человек — гетерозиготного генотипа GA rs28929474 (PIZ) гена *SERPINA1*, также 1 человек — гетерозиготных генотипов

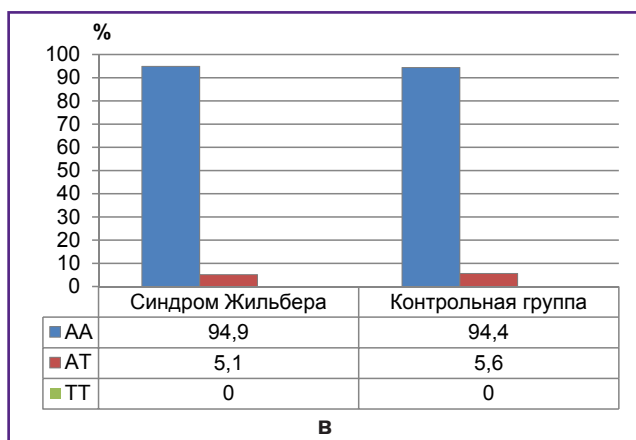
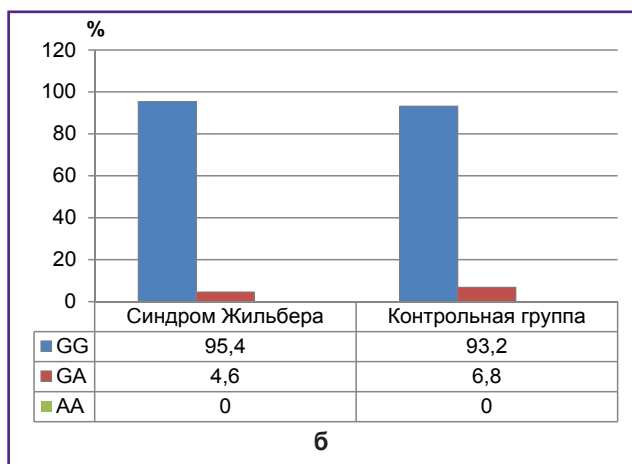
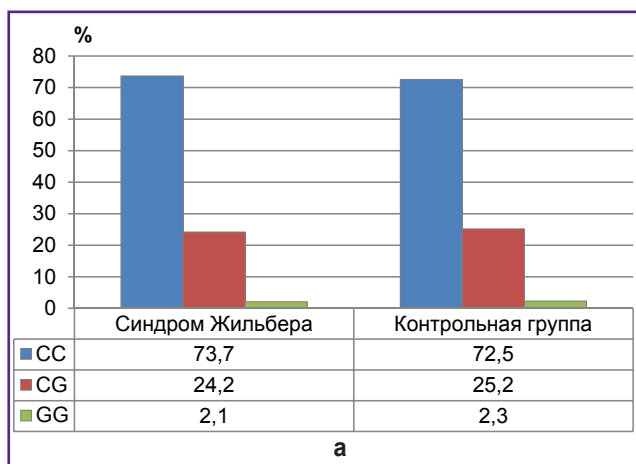


Рис. 2. Частоты генотипов варианта rs1799945 (H63D) (а), rs1800562 (C282Y) (б) и rs1800730 (S65C) (в) гена *HFE* в группе с синдромом Жильбера и в контрольной группе

Рис. 3. Частоты генотипов варианта rs113993960 (ΔF508) гена CFTR в группе с синдромом Жильбера и в контрольной группе

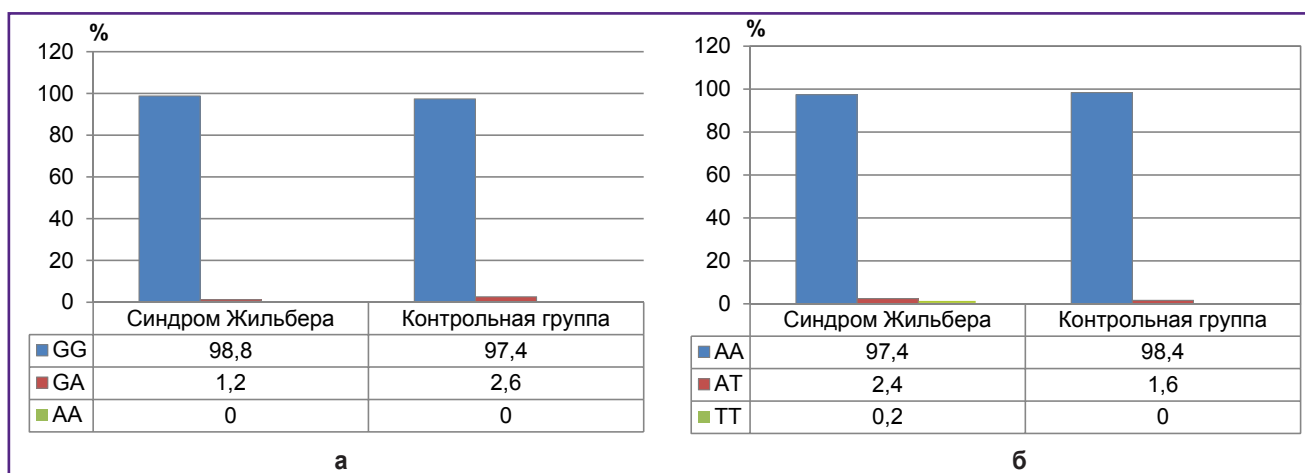
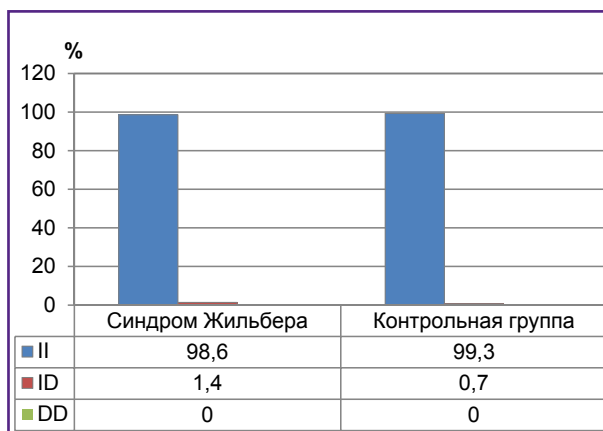


Рис. 4. Частоты генотипов варианта rs28929474 (PIZ) (а), rs17580 (PIS) (б) гена SERPINA1 в группе с синдромом Жильбера и в контрольной группе

AT rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* и ID rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*.

32 человека из 84 с генотипом 6TA/7TA варианта rs3064744 являются носителями одной мажорной мутации в гетерозиготном состоянии — rs1800730 (S65C) гена *HFE*/rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*/rs28929474 (PIZ) гена *SERPINA1* или в гомозиготном/гетерозиготном состоянии — rs1799945 (H63D) гена *HFE*.

У 102 человек из 303 с генотипом 7TA/7TA rs3064744 обнаружено носительство редких аллелей вариантов rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. Так, мальчик 14 лет (7TA/7TA rs3064744; концентрация общего билирубина, с которым пациент попал в поле зрения направившего его на исследование врача, — 57,0 мкмоль/л) является носителем гетерозиготного генотипа CG rs1799945 (H63D) гена *HFE* и гетерозиготного генотипа AT rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. 2 человека с генотипом 7TA/7TA rs3064744 и гетерозиготным генотипом CG rs1799945 (H63D) гена *HFE* также имеют гетерозиготный гено-

тип AT rs1800730 (S65C) гена *HFE* (женщина 39 лет с концентрацией общего билирубина 51,8 мкмоль/л и мужчина 46 лет без данных биохимического исследования). У девушки 17 лет (7TA/7TA rs3064744) обнаружен гетерозиготный генотип AT rs1800730 (S65C) гена *HFE* и гетерозиготный генотип ID ΔF508 гена *CFTR* (концентрация общего билирубина — 39,4 мкмоль/л).

У девушки 22 лет с эпизодом высокой концентрации общего (170,0 мкмоль/л) и несвязанного билирубина (155,8 мкмоль/л) верифицирован редкий генотип 5TA/7TA варианта rs3064744 гена *UGT1A1*, гетерозиготный генотип CG варианта rs1799945 (H63D) гена *HFE* и гомозиготный генотип TT варианта rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. Кроме того, по результатам секвенирования по Сэнгеру гена *UGT1A1* данная пациентка является носителем миссенс-варианта rs2125984650 в первом экзоне гена *UGT1A1* (с.188A>T, р.Asp63Val) неопределенной клинической значимости.

В группе контроля 67,8% человек не являются носителями редких аллелей изученных вариантов rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*,

rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. В этой группе также встречаются носители редких аллелей нескольких вариантов, однако из-за отсутствия данных о состоянии гепатобилиарной системы, концентрации общего и неконъюгированного билирубина описание этих сочетаний не представляет научной ценности.

Статистически значимых различий по сочетаниям генотипов вариантов rs3064744 гена *UGT1A1* с генотипами вариантов rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (ΔF508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* между группами не обнаружено.

Обсуждение

Ген *HFE* (homeostatic iron regulator, 6p22.2) кодирует мембранный белок, который, как предполагается, регулирует абсорбцию железа за счет влияния на взаимодействие трансферрина и его рецептора [4]. Дефекты гена *HFE* (rs1799945 — g.26090951C>G, p.His63Asp, H63D; rs1800562 — g.26092913G>A, p.Cys282Tyr, C282Y; rs1800730 — g.26090957A>T, p.Ser65Cys, S65C) приводят к развитию наследственного гемохроматоза (аутосомно-рецессивный тип наследования), который характеризуется чрезмерным всасыванием железа, что в свою очередь приводит к интоксикации организма, циррозу печени, смерти [5].

Ген *CFTR* (CF transmembrane conductance regulator, 7q31.2) кодирует белок, который функционирует в качестве хлоридного канала, контролирует ионную и водную секрецию и абсорбцию эпителиальными клетками. Наиболее частая мутация гена — ΔF508 (rs113993960, p. Phe508del) приводит к нарушению сборки и транспорта белка, вызывая развитие муковисцидоза (аутосомно-рецессивный тип наследования) [6]. Муковисцидоз характеризуется развитием хронической легочной инфекции и воспаления, экзокринной недостаточности поджелудочной железы, мужского бесплодия, а также может включать несколько сопутствующих заболеваний, связанных с муковисцидозом, таких как диабет и патология печени [7]. Гетерозиготное носительство мутации ΔF508 ассоциировано с повышенным риском развития панкреатита, мужского бесплодия, бронхоэктазов, диабета, холелитиаза и других состояний [8].

Ген *SERPINA1* (serpin family A member 1, 14q32.13) кодирует белок альфа-1-антитрипсин, который синтезируется в печени, костном мозге, лимфоидной ткани, кишке; дефекты гена приводят к альфа-1-антитрипсиновой недостаточности (аутосомно-рецессивный тип наследования), выражающейся в хронических obstructивных заболеваниях легких, эмфиземе, хронических заболеваниях печени [9]. Наиболее частые варианты гена *SERPINA1*, приводящие к альфа-1-антитрипсиновой недостаточности, — rs28929474 (c.1096G>A, p.Glu366Lys, PIZ), rs17580 (c.863A>T, p.Glu288Val, PIS).

В нашей работе изучена взаимосвязь белков, кодируемых генами *HFE*, *CFTR*, *SERPINA1*, *UGT1A1*, с использованием платформы STRING (<https://string-db.org>). Согласно данным платформы, исследование методом аффинной хроматографии свидетельствует о возможной функциональной связи между белковыми продуктами генов *CFTR* и *SERPINA1*. Козэкспрессия ортологов генов *HFE* и *SERPINA1* наблюдалась для серой крысы и риса посевного.

Известно, что взаимодействие генов может изменять их экспрессию, влиять на манифестацию и проявление клинических симптомов заболеваний. Некоторые заболевания, ранее считавшиеся моногенными (один ген — одно заболевание), на данный момент относятся к олиогенным или даже полигенным в связи с влиянием на их развитие факторов окружающей среды [10]. На данный момент, согласно базе данных the OLIgogenic diseases DAtabase (OLIDA; <https://olida.ibsquare.be/>), муковисцидоз и наследственный гемохроматоз можно отнести к олиогенным заболеваниям, в развитие которых вносят вклад не только гены *CFTR* и *HFE*, но и ряд других.

В литературе встречаются упоминания о сочетанном носительстве вариантов генов *CFTR* и *SERPINA1* в случаях клинической картины муковисцидоза, но без гомозиготного носительства варианта гена *CFTR*. Это, по мнению M.D. Ramos с соавт. [11], говорит о том, что подобный фенотип является результатом сочетания генотипов нескольких генов (в исследовании помимо гена *SERPINA1* были включены гены *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G*). Влияние альфа-1-антитрипсина на уровень белка CFTR показано в исследовании на культуре клеток [12]. Есть данные о связи мутаций гена *HFE* с развитием мекониального илеуса и патологии печени при муковисцидозе [13].

В связи с вышесказанным мы предположили, что на клиническое течение СЖ также могут влиять варианты генов *HFE*, *CFTR* и *SERPINA1*. По результатам проведенного исследования не выявлено ассоциации СЖ с вариантами нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, ΔF508 гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. Однако для некоторых пациентов было найдено сочетанное носительство генотипа 6TA/6TA или 6TA/7TA rs3064744 и редких аллелей нескольких из изученных вариантов. Кроме того, у некоторых пациентов с генотипом 7TA/7TA rs3064744 также были обнаружены сочетания с другими вариантами, которые могут объяснить значительное повышение концентрации билирубина.

Таким образом, для лиц с фенотипом СЖ (при исключении других причин неконъюгированной гипербилирубинемии, кроме генетических) в случае обнаружения значительного повышения концентрации общего/неконъюгированного билирубина и/или при генотипе 6TA/6TA, 6TA/7TA rs3064744 целесообразно проведение исследования на поиск носительства редких аллелей вариантов rs1799945 (H63D),

rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*.

Ограничением данного исследования является отсутствие данных о клиническом течении неконъюгированной гипербилирубинемии в группе СЖ (доступными являются только данные об уровне общего и несвязанного билирубина, с которыми пациент обратился к врачу). Группа контроля представляет собой случайную выборку, что не исключает присутствия в ней небольшого числа лиц с диагностированным или недиагностированным СЖ.

Заключение

В результате проведенного исследования не выявлено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей вариантов нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* между группой лиц с неконъюгированной гипербилирубинемией и контролем. При анализе сочетаний генотипов варианта rs3064744 (количество ТА повторов в промоторе) гена *UGT1A1* с генотипами вариантов rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* также не выявлено значимых различий между группами. Таким образом, можно сделать вывод, что в исследуемой выборке варианты нуклеотидной последовательности rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y), rs1800730 (S65C) гена *HFE*, rs113993960 (Δ F508) гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1* не ассоциированы с неконъюгированной гипербилирубинемией.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность врачам-терапевтам и гастроэнтерологам г. Новосибирска за помощь в формировании группы лиц с синдромом Жильбера и д.м.н. Малютиной Софье Константиновне, д.м.н. Денисовой Диане Вахтанговне за предоставленную возможность сформировать контрольную группу из банков ДНК проекта MONICA, скрининга школьников и молодых людей.

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

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. King D., Armstrong M.J. Overview of Gilbert's syndrome. *Drug Ther Bull* 2019; 57(2): 27–31, <https://doi.org/10.1136/dtb.2018.000028>.

2. Sikorska K., Romanowski T., Stalke P., Jaskiewicz K., Bielawski K.P. Coexistence of *HFE* and rare *UGT1A1* genes mutations in patients with iron overload related liver injury. *Adv Med Sci* 2010; 55(1): 108–110, <https://doi.org/10.2478/v10039-010-0003-x>.

3. 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, <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-39-45>.

Ivanova A.A., Gurazheva A.A., Mel'nikova E.S., Maksimov V.N., Nemcova E.G. Study of molecular genetic markers of Gilbert's syndrome. *Bulletin of Siberian Medicine* 2023; 22(2): 39–45, <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-39-45>.

4. *HFE homeostatic iron regulator [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3077>.

5. Katsarou M.S., Papasavva M., Latsi R., Drakoulis N. Hemochromatosis: hereditary hemochromatosis and *HFE* gene. *Vitam Horm* 2019; 110: 201–222, <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.010>.

6. *CFTR CF transmembrane conductance regulator [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1080>.

7. Shteinberg M., Haq I.J., Polineni D., Davies J.C. Cystic fibrosis. *Lancet* 2021; 397(10290): 2195–2211, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3).

8. Miller A.C., Comellas A.P., Hornick D.B., Stoltz D.A., Cavanaugh J.E., Gerke A.K., Welsh M.J., Zabner J., Polgreen P.M. Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(3): 1621–1627, <https://doi.org/10.1073/pnas.1914912117>.

9. *SERPINA1 serpin family A member 1 [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5265>.

10. Nachtegaele C., Gravel B., Dillen A., Smits G., Nowé A., Papadimitriou S., Lenaerts T. Scaling up oligogenic diseases research with OLIDA: the Oligogenic Diseases Database. *Database (Oxford)* 2022; 2022: baac023, <https://doi.org/10.1093/database/baac023>.

11. Ramos M.D., Trujillano D., Olivar R., Sotillo F., Ossowski S., Manzanares J., Costa J., Gartner S., Oliva C., Quintana E., Gonzalez M.I., Vazquez C., Estivill X., Casals T. Extensive sequence analysis of *CFTR*, *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G* and *SERPINA1* suggests an oligogenic basis for cystic fibrosis-like phenotypes. *Clin Genet* 2014; 86(1): 91–95, <https://doi.org/10.1111/cge.12234>.

12. Stanke F., Janciauskiene S., Tamm S., Wrenger S., Raddatz E.L., Jonigk D., Braubach P. Effect of alpha-1 antitrypsin on *CFTR* levels in primary human airway epithelial cells grown at the air-liquid-interface. *Molecules* 2021; 26(9): 2639, <https://doi.org/10.3390/molecules26092639>.

13. Rohlfis E.M., Shaheen N.J., Silverman L.M. Is the hemochromatosis gene a modifier locus for cystic fibrosis? *Genet Test* 1998; 2(1): 85–88, <https://doi.org/10.1089/gte.1998.2.85>.