

tent was higher in the group of combination of the trauma and the tourniquet comparatively to isolated mechanical trauma. These facts confirmed role of the tourniquet as the factor that has complicated course of traumatic decease because of ischemic-reperfusion syndrome development. Involvement of both organs – kidney and liver has shown that in pathogenesis of posttraumatic violations progress they play significant role, especially in rets with hypovolemic shock.

Conclusions. All types of our intervention have caused hypoxia – as a result of isolated bleeding and stop of blood maintaining due to haemostatic tourniquet. Among the reasons, that have activated pathological mechanisms of ischemic-reperfusion injury necessary attention should be paid to influences from toxic derivatives of rhabdomyolysis, which came into blood after limb release from tourniquet in overconcentration. Intensification of liver function was the result of protective reaction for pathogenic affecting.

Key words: ischemia-reperfusion syndrome, liver, kidney, trauma, blood loss, haemostatic tourniquet, lipid peroxidation.

Рецензент – проф. Костенко В. О.
Стаття надійшла 07.05.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-91-96

УДК 575.224.2:616.36

¹Гайбонюк І. Є., ²Кравченко С. А., ¹Макух Г. В., ³Дац-Опока М. І., ²Пампуха В. М.,

¹Третяк Б. І., ³Кіселик І. О.

ЧАСТОТА АСОЦІЙОВАНОГО З СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА НИЗЬКО ФУНКЦІОНАЛЬНОГО АЛЕЛЮ 7(TA) ГЕНА *UGT1A1* (rs8175347) В УКРАЇНІ

¹ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (м. Львів)

²Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ (м. Київ)

³Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького (м. Львів)

makukh.h@ihp.lviv.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. У статті подаються результати досліджень, отримані в ході виконання науково-дослідної роботи, яка запланована на базі ДУ «ІСП НАМН України». Тема НДР: «Дослідження генетичних чинників обтяженого клінічного перебігу моногенних і мультифакторних захворювань». № державної реєстрації 0117U000655.

Вступ. Синдром Жильбера (СЖ) – спадкова некон'югаційна гіпербілірубінемія, що пов'язана зі зниженням активності уридиндифосфатглюкуроілтрансферази (УДФ-ГТ1) у печінці [1]. Розрізняють вроджений варіант синдрому Жильбера і синдром Жильбера, клінічні прояви якого маніфестують після перенесеного гострого вірусного гепатиту з розвитком постгепатитної гіпербілірубінемії [2]. Хворим із постгепатитною гіпербілірубінемією слід також проводити диференційну діагностику між синдромом Жильбера і хронічним вірусним гепатитом [3]. Основною трансферазою, що кон'югує білірубін у печінці людини є УДФ-ГТ1, а у 2000-х роках був відкритий ген, що кодує УДФ-ГТ1 (*UGT1A1*). Також став відомий основний поліморфізм гена УДФ-ГТ1, що призводить до зниження активності ферменту, і є основним спадковим чинником СЖ [4,5]. В нормі промотор гена *UGT1A1* містить A(TA)₆TAA повторів. При інсерції додаткової пари TA повторів, або алель *UGT1A1**28 знижується активність фермента на 25%. При інсерції в гомозиготному стані – на 70% [6,7].

До застосування генетичної діагностики СЖ вважали рідкісною патологією. На даний час за оцінками епідеміологічних досліджень СЖ зустрічається від 5 до 10% у світовій популяції. За деякими даними кількість гетерозиготних носіїв у Європі може сягати 40% [8]. Встановлена висока частота виявлення СЖ серед населення країн Африки (36%-50%), Німеччи-

ни (11%), Шотландії (10-13%), Іспанії (9%), низька – серед азіатів (близько 3%).

Серед хворих на СЖ переважають чоловіки, що пояснюється впливом чоловічих статевих гормонів на обмін білірубину (10:1) [3]. Гістологічні зміни печінки в ранні терміни захворювання зазвичай не спостерігаються. Гепатоз виявляється в більш пізні терміни і служить свідченням прогресу хвороби. Запропонована класифікація СЖ за варіантами перебігу: диспептичний, астеновегетативний, жовтяничний, латентний [9]. Перший епізод жовтяниці й інші симптоми захворювання з'являються нерідко після голодування, перевтоми, надмірного фізичного навантаження, лихоманки, гострої респіраторної вірусної інфекції, гострого апендициту, перенесеного гострого вірусного гепатиту [10,11].

Дані щодо поширеності СЖ в Україні є обмеженими, як інформація про розповсюдження в загальній популяції низько функціональних алелів гена *UGT1A1*. Високий білірубін при нормальних рівнях АЛТ та АСТ є ознакою синдрому Жильбера, хоча односторонньо диференціювати його від інших схожих станів можна лише за результатами генетичного тестування.

Мета роботи: встановити поширеність низькофункціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед практично здорових жителів України та в групі осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями.

Об'єкт і методи досліджень. Матеріалом для дослідження слугували зразки банку ДНК лабораторії генетичних досліджень ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» та лабораторії генетики спадкових патологій ІМБіГ, Київ практично здорових осіб, жителів Західного (ЗР) та центрального регіонів (ЦР) України. Молекулярно-генетичне дослідження алелей A(TA)₆TAA до A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* проведено у 244 практично здорових осіб віком від 18 до 35 років,

серед них 168 жінок, 76 чоловіків, в групі пацієнтів з гепатобіліарними захворювання нез'ясованого генезу (43 особи), а також в групі пацієнтів з підозрою синдрому Жильбера (69 осіб), серед них 43 особи із Західного регіону України, переважно м. Львова (8 осіб жіночої статі, 35 осіб чоловічої статі) та 26 осіб з Центрального регіону України, переважно з м. Києва (7 особи жіночої статі, 19 осіб чоловічої статі) віком від 6 до 55 років. У всіх пацієнтів тривалий час був високий білірубін, при тому, що інші печінкові проби (АЛТ, АСТ) знаходились в межах норми. Усім пацієнтам виключено наявність вірусних гепатитів.

Виділення та очищення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові виконано методом висолювання (Н. Makukh, 2008). Ампліфікацію специфічних послідовностей гена *UGT1A1* проводили методом ПЛР. Подальший аналіз проводили декількома методами. Використовували суміш dNTP та термостійку DreamTaq Green ДНК полімераза, суміш для HRM аналізу Eva Green (ThermoFisher scientific, USA, Solis Biodyne, EN), та наступні олігонуклеотиди: F5'- TGT TGC ATG AGA AAA CGC CA, R5'- GTC GCC TGT TCA CCA AGG AT (M Vukovic, 2018). Аналіз ампліфікованих продуктів проводили у 10% ПААГ, який містив бромистий етидид. Наявності на електрофореграмі фрагмента розміром 98 bp відповідає генотипу дикого типу $A(TA)_6TAA$ гена *UGT1A1*. Додаткова копія TA повтору в промоторній ділянці гена відповідає фрагменту розміром 100 bp. Наявність низько функціональної алелі $7(TA)$ в гетерозиготному стані відповідає двом фрагментам 98 та 100 bp, а також появою гетеродуплексів. Електрофореграму гетеродуплексного аналізу алелей $A(TA)_6TAA$ до $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1* наведено на **рис. 1**.

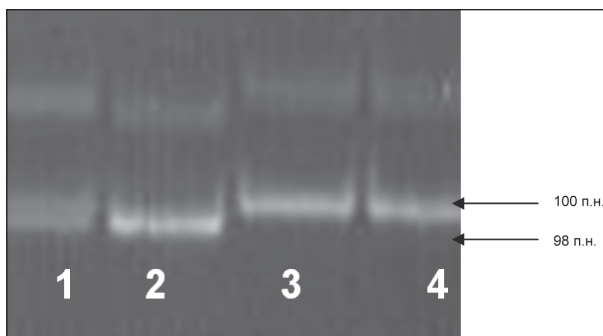


Рисунок 1 – Електрофореграма гетеродуплексного аналізу алелей $A(TA)_6TAA$ до $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1*. 1- генотип $6(TA)\backslash 7(TA)$, 2 – генотип $6(TA)\backslash 6(TA)$, 3-4 – генотип $7(TA)\backslash 7(TA)$.

Аналіз кількості TA повторів в промоторній ділянці гена *UGT1A1* проводили за допомогою ПЛР та подальшого фрагментного аналізу флуоресцентно мічених продуктів ПЛР з використанням автоматичного лазерного аналізатора «A.L.F. express» (Amersham Pharmacia Biotech, Швеція) наведено на **рисунок 2**.

Паралельно проведено HRM аналіз продуктів ампліфікації фрагмента гена *UGT1A1*, що містить промоторну послідовність. Аналіз кривих плавлення проводили в автоматичному режимі на приладі BioRad CFX96 Real-Time System. На основі різних температур плавлення кривих контрольних зразків робили висновки про ефективність даного методу для впровадження в практику. Відмінність в температурі плавлення гомозиготного $A(TA)_6TAA$ та гетерозиготного $A(TA)_6TAA/A(TA)_7TAA$ становить $1^\circ C$ та є важкою

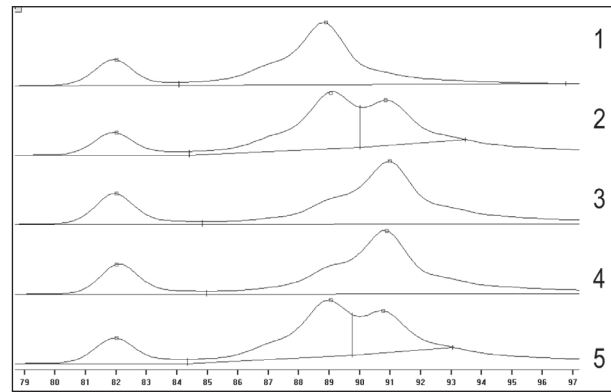


Рисунок 2 – Фрагментний аналіз продуктів ПЛР поліморфного локусу *UGT1A1* (rs8175347) з використанням лазерного флуориметра ALF-Express II: 1 – гомозигота $(TA)_6/(TA)_6$; 2, 5 – гетерозигота $(TA)_6/(TA)_7$; 3, 4 – гомозигота $(TA)_7/(TA)_7$.

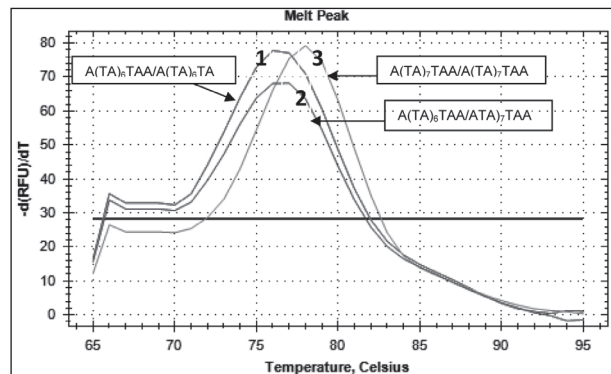


Рисунок 3 – Результати HRM аналізу (аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності) продуктів ампліфікації фрагмента промотора гена *UGT1A1* при різних генотипах: $A(TA)_6TAA/A(TA)_6TAA$, $A(TA)_6TAA/A(TA)_7TAA$ та $A(TA)_7TAA/A(TA)_7TAA$.

для візуальної диференціації. Проте, різниця в температурах плавлення визначається автоматично. Результати HRM аналізу (аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності) продуктів ампліфікації фрагмента промотора гена *UGT1A1* при різних генотипах наведено на **рис. 3**.

Отримані криві плавлення фрагмента ДНК промоторної ділянки гена *UGT1A1*, який містить TA повтори показали, що нормальній кількості повторів $A(TA)_6TAA$ в гомозиготному стані відповідає температура плавлення $76^\circ C$ (крива 1), варіанту в гетерозиготному стані відповідає температура плавлення $77^\circ C$ (крива 2), генотипу $A(TA)_7TAA$ в гомозиготному стані відповідає крива плавлення $78^\circ C$ (крива 3). Отримані результати відповідають очікуванню, оскільки додаткова пара TA повтору в гомозиготному стані збільшує температуру плавлення фрагменту ДНК. Низько функціональний алель в гетерозиготному стані візуально диференціювати не вдалось. Даний метод дослідження потребує подальшої валідації та був використаний у роботі в повторі з методикою електрофоретичного розділення в ПААГ.

Результати дослідження та їх обговорення. Для встановлення генотипу промоторної ділянки гена *UGT1A1* використано декілька методик (електрофорез в ПААГ, фрагментний аналіз та HRM тестування). Встановлено співпадіння між результатами генотипування при застосуванні різних методик. При HRM аналізі продуктів ампліфікації не вдалось досягнути візуального диференціювання низькофункціональ-

ного алелю в гетерозиготному стані у порівнянні з іншими генотипами. Подальше доопрацювання методики слід спрямувати на збільшення різниці в температурі плавлення між генотипами A(TA)₆TAA/A(TA)₆TAA, A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA та A(TA)₇TAA/A(TA)₇TAA, що можна досягнути зміною праймерів, параметрів ПЛР та кроку плавлення ДНК.

У результаті проведеного дослідження поліморфного локусу UGT1A1 алель предкового типу в гомозиготному стані виявили у 105 осіб серед 244 обстежених. У 26 осіб виявлено 7(TA) алель-ризик в гомозиготному стані та 113 особи були гетерозиготами. Результати генотипування наведено в **таблиці 1**.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в обох популяційних вибірках свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності з розподілом Харді-Вайнберга (P>0,05). Проведений порівняльний аналіз алельного поліморфізму локусу UGT1A1 (rs8175347) не виявив вірогідної різниці в розподілі частот алелів та генотипів цього локусу між вибірками із Західного та Центрального регіонів України (p=0,38) (**табл. 1**). Також не було виявлено вірогідної різниці в розподілі алельних варіантів у пацієнтів чоловічої та жіночої статі. Встановлено, що серед жителів західноукраїнського регіону гомозиготами за генотипом A(TA)₇TAA повторів гена UGT1A1 є 12% осіб, та 6% в центральному регіоні, та в середньому по Україні – 10,7%. Гомозиготами за генотипом A(TA)₇TAA повторів гена UGT1A1 є 12% шотландців, 16-18% європейців, 12% індійців, 8% єгиптян і 23% афроамериканців [0]. Серед практично здорових осіб, жителів Західного регіону України, віком від 25 до 35 років частота алелю A(TA)₇TAA становить 35%, натомість у жителів Центрального регіону України частота цього алелю складає 30,5% (p> 0,05) та в середньому по Україні – 33,8%.

Наступним етапом роботи стало встановлення поширеності алелю A(TA)₇TAA гена UGT1A1 серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Ця група осіб були жителями західноукраїнського регіону. У вибірку пацієнтів з гепатобіліарними захворювання нез'ясованого генезу увійшли 43 особи (14 жіночої статі, 29 чоловічої статі) віком від 13 до 62 років зі зміненими біохімічними показниками крові (високий білірубін, високі рівні трансаміназ та лужної фосфатази) при виключенні вірусних гепатитів. Усім пацієнтам проведено генетичне тестування мутацій C282Y, H63D гена HFE, та H1069Q гена APOB, для виключення спадкового гемахроматозу та хвороби Вільсона, що можуть зумовлювати зміни біохімічних показників крові, а саме рівнів АЛТ, АСТ та білірубіну. Результати генотипування наведено в **таблиці 2**.

Серед досліджуваної вибірки частота мутантного алелю A(TA)₇TAA гена UGT1A1 становить 34,9%, що подібне до даних загальної вибірки практично здорових осіб. Частота гомозиготного генотипу A(TA)₇TAA 9,3%, що подібне із даними у загальній вибірці (12,2%). На підставі отриманих результатів вважаємо доцільним проводити генетичне тестування низькофункціонального алелю A(TA)₇TAA гена UGT1A1 для виключення доброякісної гіпобілірумінемії, яка не

Таблиця 1 – Розподіл частот генотипів та алелів за поліморфним локусом UGT1A1 (rs8175347) в загальних вибірках Західного та Центрального регіонів України

Територіальна приналежність	Частота генотипів A(TA) _x TAA, n (f)			Частота алелю (f)		χ ²	p
	6/6	6/7	7/7	6	7		
ЗРУ, n=180	76 (0,422)	82 (0,456)	22 (0,122)	0,650	0,350	1.27	0.38
ЦРУ, n=64	29 (0,453)	31 (0,484)	4 (0,063)	0,695	0,305		
Разом	105 (0,430)	113 (0,463)	26 (0,107)	0,662	0,338		

Примітка: n – абсолютна кількість, f – частота, x – кількість повторів (6 або 7).

Таблиця 2 – Частота алелів A(TA)₆TAA та A(TA)₇TAA гена UGT1A1 серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями

Кількість обстежених	Частота генотипів A(TA) _x TAA, n (f)			Частота алелю (f)	
	6/6	6/7	7/7	6	7
n=43	16 (0,372)	22 (0,512)	4 (0,093)	54 (0,628)	30 (0,349)

Примітка: n – абсолютна кількість, f – частота, x – кількість повторів (6 або 7).

Таблиця 3 – Розподіл частот генотипів та алелів промоторної ділянки гена UGT1A1 серед пацієнтів з клінічною підозрою синдрому Жильбера

Територіальна приналежність	Частота генотипів A(TA) _x TAA, n (f)			Частота алелю (f)	
	6/6	6/7	7/7	6	7
Західний регіон, n=43	1 (0,023)	5 (0,117)	37 (0,860)	0,081	0,919
Центральний регіон, n=26	2 (0,077)	3 (0,115)	21 (0,808)	0,135	0,865
Разом, n=69	3 (0,043)	8 (0,116)	58 (0,841)	0,101	0,899

Примітка: n – абсолютна кількість, f – частота, x – кількість повторів (6 або 7).

потребує лікування, проте вимагає уникнення певних лікарських середників та корекції способу життя.

Наступним етапом роботи був аналіз промоторної ділянки гена UGT1A1 серед пацієнтів з клінічною підозрою синдрому Жильбера: 43 особи із Західного та 26 осіб з Центрального регіонів України. У когорті пацієнтів, які проходили генетичне тестування у Львові 35% (16/43) усіх пацієнтів склали хлопці, віком 16-18 років. Середній вік маніфестації синдрому Жильбера складає 14-18 років, коли в організмі спостерігається спалах статевих [12]. Особи жіночої статі звертались з таким діагнозом значно рідше, що пояснюється впливом чоловічих статевих гормонів на обмін білірубіну. Співвідношення чоловіків до жінок у вибірці пацієнтів з клінічними ознаками синдрому Жильбера становить 4-5:1. Серед пацієнтів з підозрою синдрому Жильбера, які проходили генетичне тестування у Києві чоловіків виявилось також значно більше: 19 проти 7. Результати тестування алелю A(TA)₇TAA гена UGT1A1 наведено в **таблиці 3**.

У 58 із 69 пацієнтів (84,1%) з клінічними проявами синдрому Жильбера виявлено алель A(TA)₇TAA гена UGT1A1 в гомозиготному стані, що дозволяє генетично верифікувати діагноз. Саме в цій когорті частота алелю A(TA)₇TAA сягнула 90%, у порівнянні із загальнопопуляційною вибіркою, де такий генотип виявлено у 33% осіб.

Дані дослідження вказують на високу інформативність генетичного тестування алелю A(TA)₇TAA

гена *UGT1A1* серед осіб з гіпербілірубінемією для виключення синдрому Жильбера. Наявність алелю A(TA)₇TAA в гомозиготному стані знижує активність фермента УДФ-ГТ1 на 70% та спричиняє розвиток гіпербілірубінемії. Раніше діагностику синдрому Жильбера проводили провокаційними методами, а саме біохімічним визначенням прямого білірубину при різних стресових станах, зокрема при голодуванні, сильному фізичному навантаженні, введенні нікотинової кислоти, прийомі фенобарбуталу. Згадані підходи не є специфічним, оскільки рівень некон'югованого білірубину підвищується також при голодуванні у пацієнтів з гемолізом або гепатитом, і те саме стосується й інших, згаданих вище методів діагностики. Генетично верифікований діагноз дозволяє призначити коректне лікування, врахувати дану особливість при призначенні терапії певними препаратами, підвищити настороженість щодо розвитку інших супутніх захворювань [13]. Окрім того, слід зазначити, що гіпербілірубінемія може свідчити про інші захворювання зі схожим перебігом, а саме синдромом Кригера-Найра (ген *UGT1A1*), Дубліна-Джонса (ген *ABCC2*) та Ротора (гени *SLCO1B1*, *SLCO1B3*) (<https://www.omim.org/entry/143500>). Зважаючи на неспецифічність проявів єдиним прямим та специфічним тестом діагностики синдрому Жильбера є генетичне тестування мутацій гена *UGT1A1*.

Висновки

1. Проведений порівняльний аналіз алельного поліморфізму локусу *UGT1A1* (rs8175347) не виявив вірогідної різниці в розподілі частот алелів та генотипів цього локусу між вибірками із Західного та Центрального регіонів України. Не виявлено значущої відмінності в розподілі алелів та генотипів між особами чоловічої та жіночої статі.

2. Частота низько функціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в Україні становить 33,8%. Асоційований з синдромом Жильбера гомозиготний генотип A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* виявлено у 10,7% осіб загальної вибірки жителів України.

3. Серед пацієнтів молодого віку з ураженнями гепатобіліарної системи нез'ясованого ґенезу частота гомозиготного генотипу A(TA)₇TAA відповідає даним у загальній вибірці.

4. У 84,1% пацієнтів з клінічними проявами синдрому Жильбера виявлено алель A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в гомозиготному стані, що дозволяє генетично верифікувати діагноз.

Підсумовуючи результати, отримані в ході виконання роботи встановлено частоту поширення алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед різних дослідних груп, зокрема вибірки практично здорових жителів України, що становить 33,8% генотипу A(TA)₇TAA/ A(TA)₇TAA серед пацієнтів з клінічними ознаками синдрому Жильбера (84,1%). Також апробовано різні підходи до генетичного тестування низько функціональних алелів промоторної ділянки гена *UGT1A1* для швидкої діагностики синдрому Жильбера.

Перспективи подальших досліджень. Вважаємо доцільним провести дослідження інших алельних варіантів в гені *UGT1A1* в загальній вибірці та серед пацієнтів окрім алелю A(TA)₇TAA. З цією метою можуть бути використані зібрані у цій роботі зразки банку ДНК. Також, актуальним є встановлення інших чинників клінічного прояву синдрому Жильбера та частки осіб з низько функціональним генотипом та відсутністю проявів.

Література

- Sorokman TV, Popeliuk O-MV, Makarova OV. Syndrom Zhylybera: terminologia, epidemiologia, genetyka, petogenez (chastyna 1). *Zdorovia dytyny*. 2016;8(76):82-6. DOI: 10.22141/2224-0551.8.76.2016.90830 [in Ukrainian].
- Zhu XY, Liu LX. Ultrastructure of hepatocytes in Gilbert's syndrome patients and chronic hepatitis B patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2013 Dec;21(12):929-33. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.12.011
- Shcherbinina MB. Pacienty z syndromom Zhylybera: nova taktika vedennia. *Zdorovia Ukrainy. Gastroenterologia. Gepatologia. Koloproctologia*. 2014;4(34):49-50. [in Ukrainian].
- Shulyat'ev YS. Syndrom Zhylybera: klynyka, dyahnostyka, funktsional'noe sostoyanye pecheny (klynyko-henetycheskoe yssledovanye) [dissertatsiya]. Moskva; 2005. 20 s. [in Russian].
- Sorokman TV, Popeliuk O-MV, Makarova OV. Syndrom Zhylybera: klinika, diagnostyka, dyferencialna diagnostyka ta likuvanna (chastyna 2). *Zdorovia dytyny*. 2017;12(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0551.12.1.2017.95025> [in Ukrainian].
- Varlamova OS. Viral hepatitis A and Gilbert's syndrome. In: Conference on Hepatitis: modern views on the issue. 2016. s. 12-3.
- Demirbas T, Piskin T, Dayangac M, Yaprak O, Akyildiz M, Tokat Y, Yuzer Y. Right-lobe liver trans-plant from donors with Gilbert syndrome. *Exp Clin Transplant*. 2012;10(1):39-42.
- Kathemann S, Lainka E, Baba HA, Hoyer PF, Gerner P. Gilbert's syndrome – a frequent cause of unconjugated hyperbilirubinemia in children after orthotopic liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2012;16(2):201-4. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2012.01662.x
- Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, et al. Hyperbilirubinemia, augmentation of endothelial function, and decrease in oxidative stress in Gilbert syndrome. *Circulation*. 2012 Jul 31;126(5):598-603. DOI: 10.1161/circulationaha.112.105775
- Shiu TY, Huang HH, Lin HH, Shih YL, Chu HC, Chang WK, Hsieh TY. Restriction fragment length polymorphism effectively identifies exon 1 mutation of UGT1A1 gene in patients with Gilbert's Syndrome. *Liver. Int*. 2015 Aug;35(8):2050-6. DOI: 10.1111/liv.12785
- Makukh HV, Zastavna DV, Tyrkus MYa. Pat. 32044 UA, MPK G01N33/49 (2006.01) Sposib vydilannia DNK z lejokocytiv peryferijnoi krovii, zaiavnyk DU «Instytut spadkovoї patologii NAMNU». № u200801896; zaiavl. 14.02.2008; opubl. 25.04.2008, Biul. № 8. [in Ukrainian].
- Kamal S, Abdelhakam S, Ghoraba D, Massoud Y, Aziz KA, Hassan H, et al. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: a longitudinal study. *BMC Gastroenterol*. 2019 Feb 04;19(1):22.
- Haybonyuk I, Makukh H. Analiz nyz'kofunktsional'noyi aleli 7(TA) hena UGT1A1 sered vybirky praktychno zdorovykh osob zakhidnoho rehionu Ukrayiny. *Visnyk Kharkivs'koho natsional'noho universytetu im. N.V. Karazina*. 2019;33:29-34. [in Ukrainian].

ЧАСТОТА АСОЦІЙОВАНОГО З СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА НИЗЬКО ФУНКЦІОНАЛЬНОГО АЛЕЛЮ 7(TA) ГЕНА *UGT1A1* (rs8175347) В УКРАЇНІ

Гайбонюк І. Є., Кравченко С. А., Макух Г. В., Дац-Опока М. І., Пампуха В. М., Третяк Б. І., Кіселик І. О.

Резюме. *Мета.* Встановити поширеність низько функціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед практично здорових жителів України та в групі осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та синдромом Жильбера. *Методи.* Виділення ДНК виконано методом висолювання. Ампліфікацію специфічних

послідовностей проведено методом ПЛР. Аналіз ампліфікованих фрагментів проводили у 10% ПААГ гелі, методом фрагментного аналізу флуоресцентно мічених продуктів ПЛР та HRM (аналіз кривих плавлення). *Результати.* Проведений порівняльний аналіз алельного поліморфізму локусу *UGT1A1* (rs8175347) не виявив вірогідної різниці в розподілі частот алелів та генотипів цього локусу між вибірками із Західного та Центрального регіонів України. Не виявлено значущої відмінності в розподілі алелів та генотипів між особами чоловічої та жіночої статі, проте клінічно синдром Жильбера значно частіше виявляли в молодих чоловіків. Частота низько функціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в Україні становить 33,8%. Асоційований з синдромом Жильбера гомозиготний генотип A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* характерний для 10,7% осіб загальної вибірки жителів України.

У 84,1% пацієнтів з клінічними проявами синдрому Жильбера виявлено алель A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в гомозиготному стані, що дозволяє генетично верифікувати діагноз. Дані дослідження вказують на високу інформативність генетичного тестування алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед осіб з гіпербілірубінемією для виключення синдрому Жильбера. Генетично верифікований діагноз дозволяє призначити коректне лікування, врахувати дану особливість при призначенні терапії певними препаратами, підвищити настороженість щодо розвитку інших супутніх захворювань.

Висновки. Частота асоційованого з синдромом Жильбера гомозиготного генотипу A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в Україні становить 10,7%. Генетичне тестування алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед осіб з гіпербілірубінемією верифікувало діагноз синдром Жильбера у 84,1% пацієнтів.

Ключові слова: гіпербілірубінемія, ген *UGT1A1*, синдром Жильбера, генетична діагностика.

ЧАСТОТА АССОЦИИРОВАННОГО С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА НИЗКО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО АЛЛЕЛЯ 7(TA) ГЕНА *UGT1A1* (rs8175347) В УКРАИНЕ

Гайбонюк И. Е., Кравченко С. А., Макух Г. В., Дац-Опока М. И., Пампуха В. М., Третяк Б. И., Киселик И. О.

Резюме. Цель. Установить распространенность низко функционального аллеля A (TA)₇TAA гена UGT1A1 среди практически здоровых жителей Украины и в группе лиц с идиопатическими гепатобилиарными нарушениями и синдромом Жильбера. Методы. Проводили выделение ДНК методом высаливания. Амплификацию специфических последовательностей проведено методом ПЦР. Анализ амплифицированных фрагментов проводили в 10% ПААГ геле, методом фрагментного анализа флуоресцентно меченых продуктов ПЦР и HRM (анализ кривых плавления). Результаты. Проведенный сравнительный анализ аллельного полиморфизма локуса rs8175347 гена *UGT1A1* не выявил достоверной разницы в распределении частот аллелей и генотипов этого локуса между выборками из Западного и Центрального регионов Украины. Не выявлено значимого различия в распределении аллелей и генотипов между лицами мужского и женского пола, однако клинически синдром Жильбера значительно чаще обнаруживали у молодых мужчин. Частота низко функционального аллеля A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в Украине составляет 33,8%. Ассоциированный с синдромом Жильбера гомозиготный генотип A (TA)₇TAA гена *UGT1A1* характерен для 10,7% лиц общей выборки жителей Украины.

У 84,1% пациентов с клиническими проявлениями синдрома Жильбера обнаружено аллель A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в гомозиготном состоянии, позволяющем генетически верифицировать диагноз. Данные исследования указывают на высокую информативность генетического тестирования аллеля A (TA)₇TAA гена *UGT1A1* среди лиц с гипербилирубинемией для исключения синдрома Жильбера. Генетически верифицированный диагноз позволяет назначить корректное лечение, учесть данную особенность при назначении терапии определенными препаратами, повысить настороженность по развитию других сопутствующих заболеваний. Генетически верифицированный диагноз позволяет назначить корректное лечение, учесть данную особенность при назначении терапии определенными препаратами, повысить настороженность по развитию других сопутствующих заболеваний.

Выводы. Частота ассоциированного с синдромом Жильбера гомозиготного генотипа A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* в Украине составляет 10,7%. Генетическое тестирование аллеля A (TA)₇TAA гена *UGT1A1* среди лиц с гипербилирубинемией верифицировало диагноз синдром Жильбера у 84,1% пациентов.

Ключевые слова: гипербилирубинемия, ген *UGT1A1*, синдром Жильбера, генетическая диагностика.

THE FREQUENCY OF ASSOCIATED WITH THE GILBERT'S SYNDROME *UGT1A1* GENE LOW-FUNCTIONAL ALLELE 7(TA) (rs8175347) IN UKRAINE

Haiboniuk I., Kravchenko S., Makukh H., Dats-Opoka M., Pampukha V., Tretiak B., Kiselyk I.

Abstract. Goal. To determine the prevalence of the low-functional allele A (TA)₇TAA of the *UGT1A1* gene (rs8175347) among practically healthy residents of Ukraine and in the group of individuals with idiopathic hepatobiliary disorders and Gilbert's syndrome. Methods. DNA extraction was performed by the method of salting out. Amplification of specific sequences was performed by PCR. The analysis of the amplified fragments was performed by 10% PAGE gel electrophoresis, fragment analysis of fluorescently labeled PCR products and HRM analysis (melting curve analysis). Results. The comparative analysis of the allelic polymorphism of the *UGT1A1* gene rs8175347 revealed no significant difference in the distribution of allele frequencies and genotypes between samples from the Western and Central regions of Ukraine. No significant differences were found in the distribution of alleles and genotypes between males and females, but clinically Gilbert's syndrome was much more commonly found in young males. The frequency of associated with Gilbert's syndrome the homozygous genotype A(TA)₇TAA of *UGT1A1* gene is present among 10,7% of the total population of Ukraine. The frequency of the low-functional allele A (TA)₇TAA of the *UGT1A1* gene in Ukraine is 33.8%.

84,1% of patients with clinical manifestations of Gilbert's syndrome are homozygous for *UGT1A1* allele A(TA)₇TAA, which allows genetically verifying the diagnosis. These studies indicate the high informativeness of genetic testing of the allele A (TA)₇TAA of the *UGT1A1* gene among individuals with hyperbilirubinemia to rule out Gilbert syndrome. Genetically verified diagnosis allows you to assign the correct treatment, to take into account this feature when prescribing therapy with certain drugs, to increase alertness to the development of other comorbidities. Genetically verified diagnosis allows you to assign the correct treatment, to take into account this feature when prescribing therapy with certain drugs, to increase alertness to the development of other comorbidities.

Conclusions. The incidence of the homozygous genotype A(TA)₇TAA of *UGT1A1* gene associated with Gilbert syndrome in Ukraine is 10,7%. Genetic testing of *UGT1A1* gene A(TA)₇TAA allele among individuals with hyperbilirubinemia verified the diagnosis of Gilbert's syndrome in 84,1% of patients.

Key words: hyperbilirubinemia, *UGT1A1* gene, Gilbert syndrome, genetic diagnostic.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 10.04.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-96-98

УДК 617.735 – 002 – 02:616.379 – 008.64:616 – 008.9 – 078.73

Гореча М. Ю., Лаповець Л. Є., Акімова В. М., Лаповець Н. Є., Цимбала О. П.

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА ДІАБЕТИЧНУ РЕТИНОПАТІЮ Національний медичний університет ім. Данила Галицького (м. Львів)

natla@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дане дослідження є фрагментом планової НДР «Вивчення нових біохімічних, молекулярно-генетичних, біофізичних та клінічних механізмів захворювань ока і розробка нових методів профілактики, лікування і прогнозування очних хвороб» (№ державної реєстрації: 0118U000103).

Вступ. Світова статистика останніх років свідчить про стрімкий ріст захворюваності на цукровий діабет серед населення. Ускладнення цукрового діабету з боку органу зору, займає одне з провідних місць серед відомих причин зниження зору та сліпоти, а число випадків втрати зору зберігає стійку тенденцію до постійного зростання. Найбільш значною та розповсюдженою причиною зниження зору при цукровому діабеті є патологія сітківки (діабетична ретинопатія).

Патогенетичні механізми розвитку діабетичної ретинопатії пов'язані з токсичним впливом гіперглікемії на розвиток окислювального стресу з наступною активацією стрес-чутливих систем [1].

Компенсація вуглеводного обміну та артеріальна гіпертензія мають ключовий вплив на розвиток діабетичної ретинопатії (ДР). Серед дорослого населення віком від 20 до 75 років ДР є самою розповсюдженою причиною виникнення сліпоти. Глаукома, катаракта та інші офтальмологічні захворювання також зустрічаються раніше та частіше серед хворих на цукровий діабет. Серед інших причин, пов'язаних з розвитком ДР є хронічна гіперглікемія, наявність нефропатії та артеріальної гіпертензії. Спочатку вона характеризується появою мікроаневризм капілярів сітківки, потім – макулярним набряком та неоваскуляризацією. Ранні скарги пацієнтів, симптоми або ознаки відсутні, але в кінці кінців розвиваються вогнищеві порушення, відшарування скловидного тіла та сітківки і часткова або повна втрата зору [2,3].

Метою роботи було вивчити стан клітинного імунітету у хворих на діабетичну ретинопатію з різною толерантністю до глюкози.

Об'єкт і методи дослідження. Проведено клініко-лабораторне обстеження 130 хворих на діабетичну ретинопатію (70 хворих, які є інсулін залежними

– група 1, та 60 інсулін незалежних пацієнтів – група 2). Середній вік хворих становив від 20 до 55 років. Отримані лабораторні показники порівнювали з контрольною групою, в яку ввійшли 30 практично здорових осіб.

У всіх обстежених осіб визначали кількість лейкоцитів (L), підраховували лейкоцитарну формулу (загальноприйнятими методами), вміст популяцій і субпопуляцій лімфоцитів з використанням моноклональних антитіл до CD3⁺ (Т-лімфоцити), CD4⁺ (Т-хелпери), CD8⁺ (Т-цитотоксичні/супресори), CD19⁺ (В-лімфоцити), CD23⁺ (активовані В-лімфоцити), CD25⁺ (активовані Т-лімфоцити), CD56⁺ (NK-клітини) в реакції непрямой імунофлуоресценції з антитілами міченими флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Фенотипування лімфоцитів периферичної крові проводилось методом непрямого імунофлуоресцентного визначення за допомогою моноклональних антитіл виробництва Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького, Україна [4]. Підрахунок популяцій та субпопуляцій лімфоцитів проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопу з фазавоконтрастною приставкою (Люмам-8).

Параметричні дані подано як $M \pm t$, оскільки розподіл даних у групах був нормальним, попарне апостеріорне порівняння груп виконували за допомогою критерію Ньюмена-Кейлса, використовуючи пакет програм STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA) [5].

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті наших досліджень, ми виявили вірогідні зміни показників клітинного імунітету у групах обстежених осіб (табл.).

В обстежених групах крові абсолютна кількість лімфоцитів статистично вірогідно не відрізнялась від рівня у групі контролю.

У хворих з групи 1 спостерігалась активація Т-лімфоцитів (CD3⁺) (в 1,3 раза вище ніж у групі контролю). Субпопуляція Т-хелперів (CD 4⁺) в даній групі хворих була в 1,2 раза нижчою за показник норми, а абсолютна кількість Т-супресорів (CD 8⁺) зросла вдвічі порівняно із групою контролю. Вміст активованих Т-лімфоцитів (CD 25⁺) був у 2,8 раза вищим за норму.