



Оригинальная статья

Ассоциация rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией

Иванова А.А.¹ • Апарцева Н.Е.¹ • Каширина А.П.¹ • Немцова Е.Г.² • Иванова Ю.В.¹ • Кручинина М.В.¹ • Курилович С.А.¹ • Максимов В.Н.¹

Иванова Анастасия Андреевна –

д-р мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9460-6294>
✉ 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, д. 175/1, Российская Федерация. E-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Апарцева Наталья Евгеньевна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3772-1058>. E-mail: tusya_evdokimova@mail.ru

Каширина Анастасия Петровна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1968-9712>. E-mail: kashirina_a_p_91@mail.ru

Немцова Елена Геннадьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М. Рысса лечебного факультета²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1501-6796>. E-mail: neg-85@yandex.ru

Иванова Юлия Владимировна – ординатор, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1251-4610>. E-mail: juliaivanovvaa@yandex.ru

Кручинина Маргарита Витальевна – д-р мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаборатории гастроэнтерологии¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0077-3823>. E-mail: kruchmargo@yandex.ru

Курилович Светлана Арсентьевна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией гастроэнтерологии¹; ORCID: <http://orcid.org/0009-0000-7764-7513>. E-mail: kurilovich@yandex.ru

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7165-4496>. E-mail: medik11@mail.ru

Актуальность. Доброкачественная неконъюгированная гипербилирубинемия, также известная как синдром Жильбера, представляет собой распространенное в популяции умеренное повышение концентрации общего и неконъюгированного билирубина в крови у лиц без патологии печени и гемолиза.

Цель – проверить наличие ассоциации rs3755319, rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией.

Материал и методы. В исследование «случай – контроль» включена группа пациентов с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией ($n = 414$, средний возраст – $36,7 \pm 15,9$ года, 49,8% мужчин) и контрольная группа ($n = 381$, средний возраст – $39,1 \pm 15,9$ года, 52,5% мужчин), составленная случайным образом из участников проекта MONICA, скрининга молодых людей 25–44 лет и одномоментного исследования школьников г. Новосибирска. ДНК выделена методом фенолхлороформной экстракции или экспресс-методом (набор реагентов ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, ООО «ДНК-Технология», Россия) из венозной крови. Генотипирование групп по вариантам нуклеотидной последовательности rs3755319, rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* выполнено методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов.

Результаты. По генотипам и аллелям вариантов нуклеотидной последовательности rs16928809 гена *SLC22A18* не установлено статистически значимых различий между группой пациентов с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией и контрольной группой ($p > 0,05$). Генотип CC и аллель C rs3755319 гена *UGT1A1* встречались в группе пациентов с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией

чаще, чем в контрольной группе (CC vs AC + AA: отношение шансов (ОШ) 21,1, 95% доверительный интервал (ДИ) 14,7–30,4, $p < 0,001$; C vs A: ОШ 12,4, 95% ДИ 9,4–16,4, $p < 0,001$). Концентрация общего и неконъюгированного билирубина была больше у носителей генотипа CC rs3755319 по сравнению с носителями двух других генотипов ($p < 0,05$). Вариант rs4148325 гена *UGT1A1* неравновесно сцеплен с вариантом rs3064744 гена *UGT1A1*. Генотип GG и аллель G rs2328136 гена *NUP153-AS* встречались в группе пациентов с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией чаще, чем в контрольной группе (GG vs AA: ОШ 1,361, 95% ДИ 1,002–1,848, $p = 0,048$; G vs A: ОШ 1,33, 95% ДИ 1,02–1,73, $p = 0,034$).

Заключение. Генотип CC и аллель C rs3755319 гена *UGT1A1*, генотип GG и аллель G rs2328136 гена *NUP153-AS* являются генотипами и аллелями риска доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии. Не обнаружено ассоциации rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией.

Ключевые слова: синдром Жильбера, rs3755319, rs4148325, rs2328136, rs16928809, полиморфизм длин рестриционных фрагментов, билирубин

Для цитирования: Иванова АА, Апарцева НЕ, Каширина АП, Немцова ЕГ, Иванова ЮВ, Кручинина МВ, Курилович СА, Максимов ВН. Ассоциация rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией. Альманах клинической медицины. 2024;52(6):315–323. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-033.

Поступила 07.10.2024; доработана 21.11.2024; принята к публикации 26.11.2024; опубликована онлайн 09.12.2024

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, Российская Федерация



Доброкачественная неконъюгированная гипербилирубинемия, также известная как синдром Жильбера (СЖ), представляет собой умеренное повышение концентрации общего и неконъюгированного билирубина в крови у лиц без патологии печени и гемолиза [1]. Тип наследования синдрома – аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью и варибельной экспрессивностью. Диагноз устанавливают на основании клинической картины и данных лабораторных исследований методом исключения другой патологии печени, желчного пузыря, системы крови [2]. Наиболее частый метод молекулярно-генетического анализа при СЖ – определение количества ТА-повторов в промоторе гена *UGT1A1* (rs3064744): у пациентов с СЖ чаще всего идентифицируют увеличение количества ТА-повторов до 7 при норме 6. Однако у лиц с нормальным количеством ТА-повторов (6ТА/6ТА) или у носителей только одной аллели гена *UGT1A1* с увеличенным количеством ТА-повторов (6ТА/7ТА) также может быть зафиксирован фенотип СЖ.

В 2012 г. в лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН) была начата работа по поиску молекулярно-генетических маркеров СЖ: сформированы группа лиц с фенотипом СЖ и контрольная группа, в которых определено количество ТА-повторов в промоторе гена *UGT1A1*. Оказалось, что в группе СЖ носителей генотипа 7ТА/7ТА было 303 человека, 6ТА/7ТА – 84, 6ТА/6ТА – 24, генотипов 5ТА/7ТА, 6ТА/8ТА, 7ТА/8ТА – по 1 человеку. В контрольной группе 45 человек были носителями генотипа 7ТА/7ТА, 163 – 6ТА/7ТА, 171 – 6ТА/6ТА, по 1 человеку – 5ТА/6ТА, 6ТА/9ТА [3]. В группах проверена ассоциация с СЖ вариантов нуклеотидной последовательности rs34993780, rs56059937, rs4148323, rs4124874 гена *UGT1A1*, rs1799945 (H63D), rs1800562 (C282Y) гена *HFE*, ΔF508 гена *CFTR*, rs28929474 (PIZ), rs17580 (PIS) гена *SERPINA1*. Выявлено, что генотип GG rs4124874 гена *UGT1A1* ассоциирован с повышенным риском СЖ. Выбор вариантов нуклеотидной последовательности для исследования был осуществлен на основании данных литературы об ассоциации этих вариантов с гипербилирубинемией, СЖ, редкими наследственными заболеваниями, при которых происходит повреждение гепатоцитов [3, 4].

Проведено прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру экзонов и части промотора гена *UGT1A1* для 24 человек с непрямой гипербилирубинемией, идентифицированы однонуклеотидные варианты неопределенной клинической значимости rs3755319, rs28899472, rs2125984650 гена *UGT1A1*, а также патогенные и вероятно патогенные для СЖ rs4148323, rs1273237448 [5]. Так как вариант rs3755319 гена *UGT1A1*, найденный по результатам секвенирования по Сэнгеру, часто встречается в популяции, было принято решение о необходимости проверки наличия ассоциации этого варианта с СЖ в общей группе.

По результатам поиска среди опубликованных данных исследований были найдены варианты нуклеотидной последовательности rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18*, которые ассоциированы с концентрацией билирубина [6–12]. В этих работах выявлены разные молекулярно-генетические маркеры нозологий в зависимости от этнических групп, что диктует необходимость проведения исследования этих вариантов нуклеотидной последовательности в российской популяции. Кроме того, исследований ассоциации rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* непосредственно с СЖ в литературе найдено не было.

Цель – проверить наличие ассоциации rs3755319, rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией.

Материал и методы

Исследование построено по принципу «случай – контроль». Группа СЖ (n = 414, средний возраст – 36,7 ± 15,9 года, 49,8% мужчин) сформирована врачами-гастроэнтерологами по результатам стандартного клинического обследования из пациентов с неконъюгированной гипербилирубинемией. В группу не включали пациентов с известными негенетическими причинами неконъюгированной гипербилирубинемии. ДНК выделена методом фенолхлороформной экстракции или экспресс-методом (набор реагентов ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, ООО «ДНК-Технология», Россия) из венозной крови.

Контрольная группа (n = 381, средний возраст – 39,1 ± 15,9 года, 52,5% мужчин) – случайная выборка 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 лиц, включенных в контрольную группу, выделена методом фенолхлороформной экстракции из венозной крови.

Для исследования были отобраны 4 варианта нуклеотидной последовательности: rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18*.

Генотипирование групп по вариантам нуклеотидной последовательности выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов. Последовательность праймеров, температурный режим ПЦР, использованные рестриктазы, длины продуктов после амплификации и рестрикции представлены в табл. 1 и 2. Температурный режим ПЦР включал в себя 1 цикл предварительного прогрева 95 °С 5 минут и 1 завершающий цикл 72 °С 7 минут. Для рестрикции использовали 10 единиц активности рестриктазы.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено этическим комитетом НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН (протокол № 4 от 14.02.2023). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

Статистический анализ. Размер выборки предварительно не рассчитывали. Частоты генотипов и аллелей в группах, отношение шансов (ОШ) по конкретной аллели или генотипу вычисляли в SPSS 16.0 с помощью таблиц сопряженности, критерия χ^2 Пирсона, точного двустороннего критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. Нормальность распределения концентрации общего и неконъюгированного билирубина определяли по тесту Колмогорова – Смирнова,

Таблица 1. Последовательность праймеров для полимеразной цепной реакции исследованных вариантов нуклеотидной последовательности

Однонуклеотидный вариант	Последовательность праймеров (F; R)
rs3755319 гена <i>UGT1A1</i>	5'-ATCTTCCCTTTTGACTTCTG-3'; 5'-GGAAACCAATAGATAAGCA-3'
rs4148325 гена <i>UGT1A1</i>	5'-AATTAAGTAAGCCATTACCAG-3'; 5'-TGGTTTTTCTGAACCTCTT-3'
rs2328136 гена <i>NUP153-AS</i>	5'-GTTATACGTAGAGGAGATTATCG-3'; 5'-TCAAAGAATAGCCTCCAA-3'
rs16928809 гена <i>SLC22A18</i>	5'-TGCTCAGCTGCTGAGAGGAAGTCG-3'; 5'-AACTGTCACCATTGCCTCTGGGG-3'

далее использовали тесты Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни. Уровнем значимости считали $p < 0,05$. Анализ неравновесного сцепления rs3064744 и rs4148325 гена *UGT1A1* выполнен с помощью алгоритма CubeX [13].

Результаты

В контрольной группе частоты генотипов вариантов нуклеотидной последовательности rs3755319, rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* соответствовали ожидаемым частотам согласно равновесию Харди – Вайнберга ($\chi^2 = 0,43; 0,02; 1,93; 0,76$ соответственно) (табл. 3).

По частотам генотипов вариантов нуклеотидной последовательности rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1* установлены значимые различия

Таблица 2. Условия полимеразной цепной реакции исследованных вариантов нуклеотидной последовательности

Однонуклеотидный вариант	Смесь для ПЦР	Условия ПЦР	Рестриктаза	Генотип – длины продуктов после рестрикции, п.н.
rs3755319	12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 1,4 мМ каждого праймера, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2 мкг ДНК	35 циклов: 95 °С 30 с, 56 °С 30 с, 72 °С 30 с	Ksp22I	CC – 122, AC – 122, 120, 20 AA – 102, 20
rs4148325	Трис-НСI (рН 9,0) 75 мМ, $(NH_4)_2SO_4$ 20 мМ, Tween-20 0,01%, 3,5 мМ $MgCl_2$, по 1,2 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единица активности ДНК-полимеразы	35 циклов: 95 °С 30 с, 56 °С 30 с, 72 °С 30 с	AspLEI	TT – 144, CT – 144, 119, 25 CC – 119, 25
rs2328136	12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 1,2 мМ каждого праймера, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2 мкг ДНК	35 циклов: 95 °С 30 с, 54 °С 30 с, 72 °С 40 с	TaqI	GG – 135, AG – 135, 113, 22 AA – 113, 22
rs16928809	12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 1,0 мМ каждого праймера, 2 мкг ДНК	35 циклов: 95 °С 30 с, 62 °С 30 с, 72 °С 30 с	TaqI	GG – 146, GA – 146, 124, 22 AA – 124, 22

П.н. – пара нуклеотидов, ПЦР – полимеразная цепная реакция

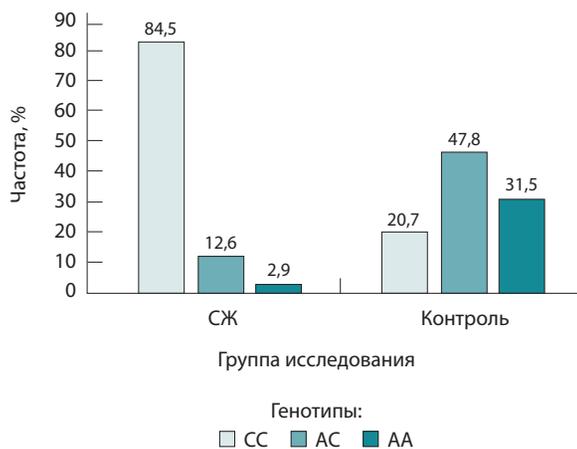


Рис. 1. Частоты генотипов rs3755319 гена *UGT1A1* в группе синдрома Жильбера (СЖ) и контрольной группе

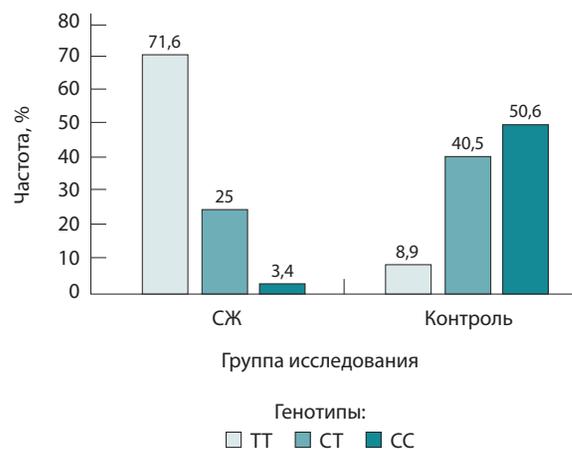


Рис. 2. Частоты генотипов rs4148325 гена *UGT1A1* в группе синдрома Жильбера (СЖ) и контрольной группе

между группой СЖ и контрольной группой ($p < 0,001$).

Генотип *CC* rs3755319 встречался в группе СЖ чаще, а генотип *AC* и *AA* – реже, чем в контрольной группе (*CC* vs *AC* + *AA*: ОШ 21,1, 95% доверительный интервал (ДИ) 14,7–30,4, $p < 0,001$; *AC* vs *AA* + *CC*: ОШ 0,16, 95% ДИ 0,11–0,22, $p < 0,001$; *AA* vs *AC* + *CC*: ОШ 0,06, 95% ДИ 0,04–0,12, $p < 0,001$ соответственно) (рис. 1). Носителей аллели *C* rs3755319 в группе СЖ было больше, чем в контрольной группе (ОШ 12,4, 95% ДИ 9,4–16,4, $p < 0,001$). При

разделении группы СЖ и контрольной группы на три подгруппы (6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА и 7ТА/7ТА rs3064744 гена *UGT1A1*) статистически значимые различия по частотам генотипов rs3755319 сохранились только в подгруппе носителей генотипов 6ТА/7ТА и 7ТА/7ТА ($p < 0,001$), в которых носители генотипа *CC* и аллели *C* чаще встречались среди лиц с СЖ.

Обнаружено статистически значимое различие концентрации общего ($p = 0,013$) и неконъюгированного ($p = 0,049$) билирубина в зависимости

Таблица 3. Частоты генотипов и аллелей rs3755319, rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* в группе синдрома Жильбера и контрольной группе

Однуклеотидный вариант	Генотип / аллель	Группа СЖ (n = 414)		Контрольная группа (n = 381)	
		n	%	n	%
rs3755319	CC	350	84,5	79	20,7
	AC	52	12,6	182	47,8
	AA	12	2,9	120	31,5
rs4148325	TT	63	71,6	7	8,9
	CT	22	25,0	32	40,5
	CC	3	3,4	40	50,6
rs2328136	GG	282	68,1	232	61,0
	AG	126	30,4	136	35,8
	AA	6	1,5	13	3,2
rs16928809	GG	383	92,5	341	89,5
	GA	31	7,5	40	10,5
	AA	0	0	0	0

СЖ – синдром Жильбера



Рис. 3. Частоты генотипов rs2328136 гена *UGT1A1* в группе синдрома Жильбера (СЖ) и контрольной группе

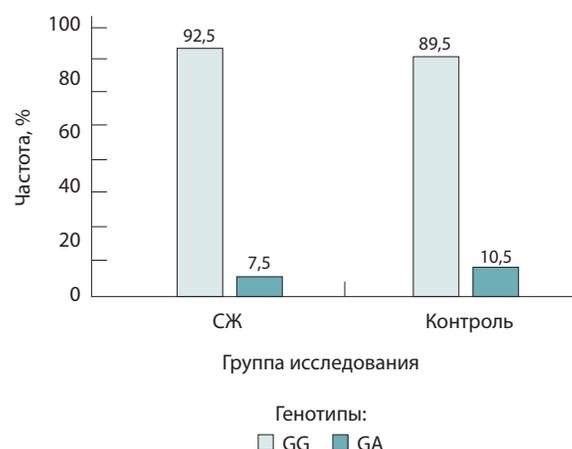


Рис. 4. Частоты генотипов rs16928809 гена *SLC22A18* в группе синдрома Жильбера (СЖ) и контрольной группе

от генотипов варианта rs3755319 гена *UGT1A1*. Концентрация общего и неконъюгированного билирубина была больше у носителей генотипа CC rs3755319 гена *UGT1A1* по сравнению с носителями генотипов AC и AA (табл. 4).

По однонуклеотидному варианту rs4148325 было проведено генотипирование 88 человек в группе СЖ и 79 человек в группе контроля. Генотип ТТ rs4148325 встречался в группе СЖ чаще, а генотип СТ и ТТ – реже, чем в контрольной группе (ТТ vs СТ + CC: ОШ 25,9, 95% ДИ 10,5–63,9, $p < 0,001$; СТ vs ТТ + CC: ОШ 0,49, 95% ДИ 0,25–0,95, $p = 0,046$; CC vs СТ + ТТ: ОШ 0,03, 95% ДИ 0,01–0,12, $p < 0,001$ соответственно) (рис. 2). Носителей аллели Т rs3755319 в группе СЖ было больше, чем в контрольной группе (ОШ 12,9, 95% ДИ 7,6–21,9, $p < 0,001$). При анализе результатов оказалось, что носители генотипа 7ТА/7ТА варианта rs3064744 гена *UGT1A1* являются носителями генотипа ТТ варианта rs4148325, носители генотипа 6ТА/7ТА – генотипа СТ, носители генотипа 6ТА/6ТА – генотипа CC, за исключением 4 человек в группе контроля и 1 человека в группе СЖ. При анализе неравновесного сцепления между

rs3064744 и rs4148325 гена *UGT1A1* D' составил $-0,975$, $r^2 = 0,9388$. Полученные результаты позволили сделать вывод, что варианты rs3064744 и rs4148325 гена *UGT1A1* сцеплены и дальнейшее генотипирование всех участников групп нецелесообразно.

По частотам генотипов однонуклеотидного варианта rs2328136 гена *UGT1A1* не обнаружено значимых различий между группой СЖ и контрольной группой ($p = 0,071$). Однако при использовании модели «генотип 1 vs генотип 2 + генотип 3» оказалось, что генотип GG rs2328136 встречался в группе СЖ чаще, чем в контрольной группе (GG vs AG + AA: ОШ 1,361, 95% ДИ 1,002–1,848, $p = 0,048$). Носители аллели G rs2328136 также встречались в группе СЖ чаще, чем в контрольной группе (ОШ 1,33, 95% ДИ 1,02–1,73, $p = 0,034$) (рис. 3). При разделении группы СЖ и контрольной группы по генотипам варианта rs3064744 гена *UGT1A1* на три подгруппы – носители генотипа 6ТА/6ТА, 6ТА/7ТА и 7ТА/7ТА – статистически значимые различия по частотам генотипов rs2328136 не сохранились ни в одной подгруппе ($p > 0,05$). Ассоциации генотипов rs2328136

Таблица 4. Концентрация общего и неконъюгированного билирубина в зависимости от генотипа rs3755319 гена *UGT1A1*

Генотип rs3755319	Общий билирубин, Ме [Q25; Q75], мкмоль/л	Неконъюгированный билирубин, Ме [Q25; Q75], мкмоль/л
CC	37,2 [27,5; 44,0]	30,1 [21,1; 37,1]
AC + AA	31,6 [25,0; 35,3]	25,1 [19,5; 28,9]
p	0,003	0,012

Ме – медиана, Q25 – 25-й процентиль, Q75 – 75-й процентиль



с концентрацией общего или неконъюгированного билирубина не обнаружено ($p > 0,05$).

По частотам генотипов и аллелей не установлено статистически значимых различий между группой СЖ и контрольной группой по вариантам rs16928809 гена *SLC22A18* ($p > 0,05$) (рис. 4). Ассоциация генотипов rs16928809 с концентрацией общего или неконъюгированного билирубина также не выявлена ($p > 0,05$).

Обсуждение

В настоящей работе установлено, что однонуклеотидные варианты rs3755319 гена *UGT1A1* и rs2328136 гена *NUP153-AS* ассоциированы с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией. Однонуклеотидный вариант rs4148325 гена *UGT1A1* находится в неравновесном сцеплении с вариантом rs3064744 гена *UGT1A1*. Нами не выявлено ассоциации однонуклеотидного варианта rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией.

Вариант нуклеотидной последовательности rs3755319 (g.234667582A>C) локализован в промоторе гена *UGT1A1*¹. Вариант связывают с транзитной семейной неонатальной гипербилирубинемией (ClinVar), метаболизмом некоторых лекарственных средств, влиянием на экспрессию гена *UGT1A1* [14–18]. По результатам проведенного исследования, генотип CC и аллель C оказались генотипом и аллелью риска СЖ, что было наиболее значимо для носителей генотипов 6ТА/7ТА и 7ТА/7ТА rs3064744 гена *UGT1A1*. Кроме того, нами показано, что у носителей генотипа CC были более высокие концентрации общего и неконъюгированного билирубина по сравнению с носителями генотипов AA и AC. Полученные результаты не противоречат данным мировой литературы, так как низкая экспрессия гена *UGT1A1* при генотипе CC, выявленная в Китае [18], объясняет низкую активность фермента УДФ-глюкуронозилтрансферазы и, соответственно, повышение концентрации неконъюгированного билирубина и развитие СЖ.

Вариант нуклеотидной последовательности rs4148325 (c.865-2371C>T) локализован в интроне гена *UGT1A1*². По данным ряда исследований, вариант rs4148325 ассоциирован с концентрацией билирубина [6–9]. В настоящем исследовании выявлено, что вариант rs4148325 ассоциирован с фенотипом СЖ, но сцеплен с вариантом rs3064744 гена *UGT1A1* (количество ТА-повторов в промоторе), что не позволяет говорить о высокой значимости данного варианта как ДНК-маркера СЖ.

В литературе найдено только одно исследование, в котором упоминается о сцеплении варианта rs4148325, но не с rs3064744, а с миссенс-вариантами первого экзона [9].

Вариант нуклеотидной последовательности rs2328136 (g.17709551A>G) локализован рядом с геном *NUP153* (*NUP153-AS*)³. В полногеномном ассоциативном исследовании, проведенном в Индии, вариант rs2328136 был идентифицирован как ассоциированный с уровнем неконъюгированного билирубина. Белок, кодируемый геном *NUP153* (nucleoporin 153, бр22.3), является регуляторным фактором транспорта макромолекул из ядра в цитоплазму и обратно ассоциирован с транспортом биливердинредуктазы, которая играет роль в конъюгации билирубина⁴ [10]. В норвежском исследовании «случай – контроль» (150 человек с уровнем общего билирубина больше 17,5 ммоль/л, 150 человек с уровнем общего билирубина меньше 17,5 ммоль/л) проведено генотипирование групп по частому варианту в промоторе гена *UGT1A1* (определение количества ТА-повторов) и ряду других вариантов нуклеотидной последовательности, в том числе rs2328136 гена *NUP153-AS*. Вариант rs2328136 гена *NUP153-AS* не был ассоциирован с уровнем билирубина ($p = 0,55$) [11]. По результатам нашего исследования, rs2328136 гена *NUP153-AS* также не ассоциирован с уровнем общего или неконъюгированного билирубина, однако генотип GG и аллель G являются генотипом и аллелью риска доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии.

Вариант нуклеотидной последовательности rs16928809 (g.21002G>A) локализован в интроне гена *SLC22A18*⁵. Ген *SLC22A18* (solute carrier family 22 member 18, 11p15.4) – один из нескольких субтранспирируемых фрагментов, подавляющих опухоли, расположенных в импринтированном геномном домене 11p15.5, важной области гена-супрессора опухолей. Мутации гена обнаружены при опухоли Вильмса и раке легких. Белок *SLC22A18* может действовать как переносчик органических катионов и играть роль в транспортировке хлорохина и родственных хинидину соединений в почках⁶. Вариант rs16928809 фигурирует в метаанализе трех полногеномных ассоциативных исследований, и, хотя он не показал значимость, необходимую для полногеномных исследований, умеренная ассоциация с уровнем общего билирубина в этом метаанализе все же была зафиксирована [12]. Согласно результатам нашего исследования, вариант rs16928809 гена *SLC22A18* не ассоциирован с фенотипом СЖ.



Исследование по проверке ассоциации с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18* проведено впервые в Российской Федерации. В мировых исследованиях изученные однонуклеотидные варианты были проверены в отношении концентрации билирубина (rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*, rs2328136 гена *NUP153-AS*, rs16928809 гена *SLC22A18*), экспрессии гена *UGT1A1* (rs3755319 гена *UGT1A1*), фармакокинетики некоторых лекарственных средств (rs3755319 и rs4148325 гена *UGT1A1*). Публикаций результатов исследований вариантов в отношении риска развития СЖ мы не нашли.

Выявленные маркеры повышенного риска доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии могут быть использованы в диагностике СЖ после проведения дополнительных репликационных исследований на больших по размеру выборках, с включением в группы лиц разной расы, пола, возраста. С точки зрения фундаментальной значимости результаты исследования необходимы для лучшего понимания патогенеза СЖ, индивидуальных особенностей его течения и оценки прогноза, а также планирования будущих исследований по данной нозологии.

Ограничения исследования

Контрольная группа представляет собой случайную выборку участников нескольких исследований, что не исключает наличия у них доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии, но предполагается, что количество таких лиц не превышает среднее значение в популяции. Концентрации общего и неконъюгированного билирубина в группе СЖ – случайные значения, с которыми пациент был осмотрен врачом, что не исключает более высоких значений концентрации билирубина в истории болезни участников группы. В контрольной группе отсутствуют данные о концентрации общего и неконъюгированного билирубина.

Заключение

Генотип CC и аллель C rs3755319 гена *UGT1A1*, генотип GG и аллель G rs2328136 гена *NUP153-AS* являются генотипами и аллелями риска доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемии. Однонуклеотидный вариант rs4148325 гена *UGT1A1* находится в неравновесном сцеплении с вариантом rs3064744 *UGT1A1*. Не установлено ассоциации варианта нуклеотидной последовательности rs16928809 гена *SLC22A18* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией. ©

¹ Database SNP, rs3755319. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3755319> (дата обращения 07.10.2024).

² Database SNP, rs4148325. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4148325> (дата обращения 07.10.2024).

³ Database SNP, rs2328136. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2328136> (дата обращения 07.10.2024).

⁴ Database Gene, NUP153 nucleoporin 153 [Homo sapiens (human)]. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9972> (дата обращения 07.10.2024).

⁵ Database SNP, rs16928809. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs16928809> (дата обращения 07.10.2024).

⁶ Database Gene, SLC22A18 solute carrier family 22 member 18 [Homo sapiens (human)]. [Интернет]. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5002> (дата обращения 07.10.2024).

Дополнительная информация

Финансирование

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

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.А. Иванова – разработка концепции и дизайна исследования, молекулярно-генетический анализ, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; Н.Е. Апарцева – формирование группы синдрома Жильбера и контрольной группы, молекулярно-генетический анализ; А.П. Каширина – молекулярно-генетический анализ, анализ и интерпретация результатов исследования; Е.Г. Немцова, М.В. Кручинина, С.А. Курилович – разработка дизайна клинической части исследования, формирование группы синдрома Жильбера; Ю.В. Иванова –

молекулярно-генетический анализ, анализ и интерпретация результатов исследования; В.Н. Максимов – проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Благодарности

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



Список литературы / References

- Vítek L, Tiribelli C. Gilbert's syndrome revisited. *J Hepatol.* 2023;79(4):1049–1055. doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.004.
- Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr.* 2012;171(1):11–15. doi: 10.1007/s00431-011-1641-0.
- Иванова АА, Гуражева АА, Мельникова ЕС, Максимов ВН, Немцова ЕГ. Исследование молекулярно-генетических маркеров синдрома Жильбера. Бюллетень сибирской медицины. 2023;22(2):39–45. doi: 10.20538/1682-0363-2023-2-39-45.
- Ivanova AA, Apartseva NE, Kashirina AP, Nemtsova EG, Ivanova YV, Kruchinina MV, Kurilovich SA, Maksimov VN. Detection of major mutations in CFTR, SERPINA1, HFE genes in benign unconjugated hyperbilirubinemia phenotype. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2024;16(4):38. doi: 10.17691/stm2024.16.4.04.
- Иванова АА, Апарцева НЕ, Каширина АП, Немцова ЕГ, Иванова ЮВ, Кручинина МВ, Курилович СА, Максимов ВН. Результаты секвенирования гена UGT1A1 у лиц с фенотипом синдрома Жильбера. Бюллетень сибирской медицины. 2024;23(2):65–73. doi: 10.20538/1682-0363-2024-2-65-73.
- Ivanova AA, Apartseva NE, Kashirina AP, Nemcova EG, Ivanova JV, Kruchinina MV, Kurilovich SA, Maksimov VN. [Results of *UGT1A1* gene sequencing in individuals with the Gilbert syndrome phenotype]. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2024;23(2):65–73. Russian. doi: 10.20538/1682-0363-2024-2-65-73.
- Lin N, Damask A, Boyapati A, Hamilton JD, Hamon S, Ternes N, Nivens MC, Penn J, Lopez A, Reid JG, Overton J, Shuldiner AR, Abecasis G, Baras A, Paulding C. *UGT1A1* genetic variants are associated with increases in bilirubin levels in rheumatoid arthritis patients treated with sarilumab. *Pharmacogenomics J.* 2022;22(3):160–165. doi: 10.1038/s41397-022-00269-5.
- Bielinski SJ, Chai HS, Pathak J, Talwalkar JA, Limburg PJ, Gullerud RE, Sicotte H, Klee EW, Ross JL, Kocher JP, Kullo IJ, Heit JA, Petersen GM, de Andrade M, Chute CG. Mayo Genome Consortia: A genotype-phenotype resource for genome-wide association studies with an application to the analysis of circulating bilirubin levels. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(7):606–614. doi: 10.4065/mcp.2011.0178.
- DiStefano JK, Kingsley C, Craig Wood G, Chu X, Argyropoulos G, Still CD, Doné SC, Legendre C, Tembe W, Gerhard GS. Genome-wide analysis of hepatic lipid content in extreme obesity. *Acta Diabetol.* 2015;52(2):373–382. doi: 10.1007/s00592-014-0654-3.
- Oussalah A, Bosco P, Anello G, Spada R, Guéant-Rodriguez RM, Chery C, Rouyer P,

Association of rs3755319 and rs4148325 of the *UGT1A1* gene, rs2328136 of the *NUP153-AS* gene, and rs16928809 of the *SLC22A18* gene with benign unconjugated hyperbilirubinemia

A.A. Ivanova¹ • N.E. Apartseva¹ • A.P. Kashirina¹ • E.G. Nemcova² • J.V. Ivanova¹ • M.V. Kruchinina¹ • S.A. Kurilovich¹ • V.N. Maksimov¹

Background: Benign unconjugated hyperbilirubinemia, also known as Gilbert's syndrome, is a common in the population moderate increase in total and unconjugated bilirubin concentrations in individuals without liver disease or hemolysis.

Aim: To identify associations of rs3755319, rs4148325 of the *UGT1A1* gene, rs2328136 of the *NUP153-AS* gene, and rs16928809 of the *SLC22A18* gene with benign unconjugated hyperbilirubinemia.

Methods: This case-control study included a group of individuals with benign unconjugated hyperbilirubinemia ($n = 414$, mean age 36.7 ± 15.9 years, 49.8% men) and a control group ($n = 381$, mean age 39.1 ± 15.9 years, 52.5% men). The sample was randomly selected from the participants of the MONICA project, screening of young people aged 25–44 years and a cross-sectional study of schoolchildren in Novosibirsk. DNA was isolated from venous blood by phenol-chloroform extraction or an express assay (PROBA-RAPID-GENETICS, DNA-Technology, Russia). Genotyping of the groups by rs3755319, rs4148325 of the *UGT1A1* gene, rs2328136 of the *NUP153-AS* gene, and rs16928809 of the *SLC22A18* gene was performed by polymerase chain

reaction followed by restriction fragment length polymorphism analysis.

Results: No significant differences were found between the individuals with benign unconjugated hyperbilirubinemia and the control group by the genotypes and alleles of the nucleotide sequence variants of rs16928809 of the *SLC22A18* gene ($p > 0.05$). The CC genotype and the C allele of rs3755319 of the *UGT1A1* gene were more common in the individuals with benign unconjugated hyperbilirubinemia, than in the control group (CC vs AC + AA: odds ratio (OR) = 21.1, 95% confidence interval (CI) 14.7–30.4, $p < 0.001$; C vs A: OR = 12.4, 95% CI 9.4–16.4, $p < 0.001$). The concentrations of total and unconjugated bilirubin were higher in the carriers of the CC genotype of rs3755319, compared to the carriers of the other two genotypes ($p < 0.05$). rs4148325 of the *UGT1A1* gene was in the linkage disequilibrium with the rs3064744 *UGT1A1* variant. The GG genotype and the G allele rs2328136 of the *NUP153-AS* gene were more common in the individuals with benign unconjugated hyperbilirubinemia than in the control group (GG vs AG + AA: OR = 1.361, 95% CI 1.002–1.848, $p = 0.048$; G vs A: OR = 1.33, 95% CI 1.02–1.73, $p = 0.034$).

Conclusion: The CC genotype and the C allele of rs3755319 of the *UGT1A1* gene, the GG genotype and the G allele of rs2328136 of the *NUP153-AS* gene are the genotypes and alleles of risk for benign unconjugated hyperbilirubinemia. The rs16928809 of the *SLC22A18* gene is not associated with benign unconjugated hyperbilirubinemia.

Key words: Gilbert's syndrome, rs3755319, rs4148325, rs2328136, rs16928809, polymorphism, restriction fragment length, bilirubin

For citation: Ivanova AA, Apartseva NE, Kashirina AP, Nemcova EG, Ivanova JV, Kruchinina MV, Kurilovich SA, Maksimov VN. Association of RS3755319 and RS4148325 of the *UGT1A1* gene, RS2328136 of the *NUP153-AS* gene, RS16928809 of the *SLC22A18* gene with benign unconjugated hyperbilirubinemia. *Almanac of Clinical Medicine.* 2024;52(6):315–323. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-033.

Received 7 October 2024; revised 21 November 2024; accepted 26 November 2024; published online 9 December 2024



- Josse T, Romano A, Elia M, Bronowicki JP, Guéant JL. Exome-wide association study identifies new low-frequency and rare UGT1A1 coding variants and UGT1A6 coding variants influencing serum bilirubin in elderly subjects: a strobe compliant article. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(22):e925. doi: 10.1097/MD.0000000000000925.
10. Datta S, Chowdhury A, Ghosh M, Das K, Jha P, Colah R, Mukerji M, Majumder PP. A genome-wide search for non-UGT1A1 markers associated with unconjugated bilirubin level reveals significant association with a polymorphic marker near a gene of the nucleoporin family. *Ann Hum Genet*. 2012;76(1):33–41. doi: 10.1111/j.1469-1809.2011.00688.x.
11. Kringen MK, Piehler AP, Grimholt RM, Opdal MS, Haug KB, Urdal P. Serum bilirubin concentration in healthy adult North-Europeans is strictly controlled by the UGT1A1 TA-repeat variants. *PLoS One*. 2014;9(2):e90248. doi: 10.1371/journal.pone.0090248.
12. Johnson AD, Kavousi M, Smith AV, Chen MH, Dehghan A, Aspelund T, Lin JP, van Duijn CM, Harris TB, Cupples LA, Uitterlinden AG, Launer L, Hofman A, Rivadeneira F, Stricker B, Yang Q, O'Donnell CJ, Gudnason V, Witteman JC. Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels. *Hum Mol Genet*. 2009;18(14):2700–2710. doi: 10.1093/hmg/ddp202.
13. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:428. doi: 10.1186/1471-2105-8-428.
14. Shin HJ, Kim JY, Cheong HS, Na HS, Shin HD, Chung MW. Functional study of haplotypes in UGT1A1 promoter to find a novel genetic variant leading to reduced gene expression. *Ther Drug Monit*. 2015;37(3):369–374. doi: 10.1097/FTD.0000000000000154.
15. Naidoo A, Ramsuran V, Chirehwa M, Denti P, McIleron H, Naidoo K, Yende-Zuma N, Singh R, Ngcapu S, Chaudhry M, Pepper MS, Padayatchi N. Effect of genetic variation in UGT1A and ABCB1 on moxifloxacin pharmacokinetics in South African patients with tuberculosis. *Pharmacogenomics*. 2018;19(1):17–29. doi: 10.2217/pgs-2017-0144.
16. Yu Q, Zhang T, Xie C, Qiu H, Liu B, Huang L, Peng P, Feng J, Chen J, Zang A, Yuan X. UGT1A polymorphisms associated with worse outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82(1):87–98. doi: 10.1007/s00280-018-3595-7.
17. Milton JN, Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Bhatnagar P, Arking DE, Dworkis DA, Casella JF, Barron-Casella E, Bean CJ, Hooper WC, DeBaun MR, Garrett ME, Soldano K, Telen MJ, Ashley-Koch A, Gladwin MT, Baldwin CT, Steinberg MH, Klings ES. A genome-wide association study of total bilirubin and cholelithiasis risk in sickle cell anemia. *PLoS One*. 2012;7(4):e34741. doi: 10.1371/journal.pone.0034741.
18. Xie D, Pan Y, Chen J, Mao C, Li Z, Qiu F, Yang L, Deng Y, Lu J. Association of genetic variants in soy isoflavones metabolism-related genes with decreased lung cancer risk. *Gene*. 2024; 927:148732. doi: 10.1016/j.gene.2024.148732.

Funding

The study was performed under the grant from the Russian Research Foundation No. 23-25-00062.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

A.A. Ivanova, the study concept and design, molecular genetic analysis, analysis and interpretation of the study results, text writing; N.E. Apartseva, recruitment of the study groups; A.P. Kashirina, molecular genetic analysis, analysis and interpretation of the study results; E.G. Nemcova, M.V. Kruchinina, S.A. Kurilovich, design of the clinical part of the study, recruitment of the group with Gilbert's syndrome; J.V. Ivanova, molecular genetic analysis, analysis and interpretation of the study results; V.N. Maksimov, control of the essential intellectual content, text editing, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the internists and gastroenterologists of Novosibirsk for their assistance in the recruitment of the study subjects with Gilbert's syndrome, as well as to S.K. Malyutina, MD, PhD, D.V. Denisova, MD, PhD, for giving them the opportunity to use the DNA bank from the MONICA project, the schoolchildren and young people screening project.

Anastasiya A. Ivanova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetic Studies of Therapeutic Diseases¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9460-6294>
✉ Ul. Borisa Bogatkova 175/1, Novosibirsk, 630089, Russian Federation. E-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Natalia E. Apartseva – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Genetic and Environmental Determinants of the Human Life Cycle¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3772-1058>. E-mail: tusya_evdokimova@mail.ru

Anastasiia P. Kashirina – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Genetic and Environmental Determinants of the Human Life Cycle¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1968-9712>. E-mail: kashirina_a_p_91@mail.ru

Elena G. Nemcova – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Propaedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics named after S.M. Ryss, Faculty of Medicine²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1501-6796>. E-mail: neg-85@yandex.ru

Julija V. Ivanova – Resident Physician, Junior Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetic Studies of Therapeutic Diseases¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1251-4610>. E-mail: juliaivanovvaa@yandex.ru

Margarita V. Kruchinina – MD, PhD, Associate Professor, Leading Research Fellow, Laboratory of Gastroenterology¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0077-3823>. E-mail: kruchmargo@yandex.ru

Svetlana A. Kurilovich – MD, PhD, Professor, Head of Laboratory of Gastroenterology¹; ORCID: <http://orcid.org/0009-0000-7764-7513>. E-mail: kurilovich@yandex.ru

Vladimir N. Maksimov – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetic Studies of Therapeutic Diseases¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7165-4496>. E-mail: medik11@mail.ru

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; ul. Borisa Bogatkova 175/1, Novosibirsk, 630089, Russian Federation

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ul. Kirochnaya 41, Saint Petersburg, 191015, Russian Federation