УДК: 616.36-008.5-053.3

ГЕННИЙ ПОЛІМОРФІЗМ G211A ГЕНУ UGT1A1 ТА ПРОЛОНГОВАНА НЕОНАТАЛЬНА ЖОВТЯНИЦЯ

О.С. Яблонь, О. Г. Мазур

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України (м. Вінниця, Україна)

Резюме. *Неонатальна гіпербілірубінемія є поширеною проблемою серед новонароджених дітей в усьому світі. В останні роки з'явилися повідомлення про роль генного поліморфізму в розвитку неонатальних жовтяниць. У статті наведені клініко-анамнестичні дані доношених новонароджених дітей із пролонгованою неонатальною жовтяницею. Метою роботи було вивчення поліморфізму гену уридиндифосфатглюкуронілтрансферази (UGT1A1) G211A у дітей Вінницької області із пролонгованою неонатальною жовтяницею. Було обстежено 15 доношених дітей віком 14-30 діб, які знаходилися на лікуванні у відділенні патології новонароджених Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні. Більшість дітей із пролонгованою неонатальною жовтяницею народилися від матерів із різноманітною екстрагенітальною та акушерською патологією. Тривалість жовтяничного забарвлення в середньому склала 32±2,07 дні. У біохімічному аналізі крові у всіх дітей досліджуваної групи відмічалося підвищення рівня загального білірубіну сироватки крові за рахунок його непрямої фракції (265±17,09 мкмоль/л). Показники трансаміназ знаходилися в межах норми. Аналіз поліморфізму гену UGT1A1 показав, що у досліджуваної групи дітей був визначений кодуючий регіон G211A, генотип GG. Дослідження не виявило достовірного впливу поліморфізму G211A гену UGT1A1 на розвиток пролонгованої неонатальної жовтяниці у дітей Вінницької області.*

Ключові слова: *пролонгована неонатальна жовтяниця; новонароджені; генний поліморфізм; 1A1 уридинфосфатглюкуронілтрансфераза.*

Вступ

Неонатальна гіпербілірубінемія є поширеною проблемою серед новонароджених дітей в усьому світі. Особлива увага приділяється пролонгованим жовтяницям, які можуть мати як доброякісний перебіг, так і бути проявом важкого патологічного стану з несприятливими наслідками. За даними літератури, пролонгований перебіг жовтяниці спостерігається у 10-45% дітей раннього віку і характеризується тривалістю жовтяничного забарвлення довше 14-го дня життя у доношеної дитини та після 21-го дня у недоношеної дитини [1]. Також спостерігається тенденція до збільшення пролонгованої неонатальної жовтяниці у «практично здорових» дітей. Це пов'язують із загальним погіршенням стану здоров'я вагітних жінок, негативною екологічною ситуацією, шкідливими звичками та іншими чинниками, які порушують дозрівання гепатоцитів [2].

На думку вчених, частота неонатальних жовтяниць, у тому числі пролонгованих неонатальних жовтяниць, залежить від генетичних порушень метаболізму білірубіну. Чисельні гени, які приймають участь в контролі концентрації білірубіну, класифікуються на ті, що модулюють продукцію гема (ті, що призводять до гемолізу і/або зменшення терміну життя еритроцитів); забезпечують катаболізм гема в білірубін (гемоксигеназа, білівердин редуктаза); ті, що забезпечують печінкове поглинання білірубіну (SLCO1B1); ті, що допомагають кон'югувати білірубін (глутатіон S-трансфераза); ті, що забезпечують печінковий кліренс білірубіну (UGT1A1) [3,4].

Уридиндифосфатглюкуронілтрансфераза 1A1 (UGT1A1) - ключовий фермент кон'югації білірубіну. Так, ген 1A1 (UGT1A1) контролює кон'югацію білірубіну шляхом визначення структури глюкуронілтрансферази, яка синтезується гепатоцитами. Відомим є те, що поліморфізм гену 1A1 (UGT1A1) пов'язаний із виникненням пролонгованої неонатальної гіпербілірубінемії [5-7]. У зарубіжних дослідженнях випадок-контроль вірогідність розвитку неонатальної гіпербілірубінемії в 2,65 рази вище у дітей з алелем A, ніж у дітей з алелем G (95% ДИ, 1.60-4.39) [8, 9].

Результати аналізу за ознакою етнічної приналежності свідчать, що поліморфізм 211G>A гену UGT1A1 пов'язаний зі значним ризиком розвитку неонатальної гіпербілірубінемії серед азіатської популяції: японських, корейських чи китайських новонароджених, особливо у дітей, які були на грудному вигодовуванні [10, 11]. Але інформації відносно мутації даного гену в кавказькій чи африканській популяціях недостатньо, щоб робити остаточні висновки [12, 13].

Мета дослідження

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було вивчення поліморфізму гену уридиндифосфатглюкуронілтрансферази (UGT1A1) G211A у дітей Вінницької області із пролонгованою неонатальною жовтяницею.

Матеріали та методи дослідження

Для реалізації поставленої мети було обстежено 15 дітей віком 14-30 діб, які знаходилися

на лікуванні у відділенні патології новонароджених Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні. Критеріями включення в дослідження були: гестаційний вік 37-40 тижнів, вага при народженні >2500г, тривалість неонатальної жовтяниці довше 14 діб. Критеріями виключення були гемолітична хвороба новонароджених, вроджені вади розвитку гепатобіліарної системи, вроджені і набуті інфекційні захворювання.

Комплекс досліджень включав в себе клінічний огляд, аналіз анамнестичних даних, лабораторні загально-клінічні та біохімічні показники крові (рівень сироваткового білірубіну і його фракції, трансамінази).

Для проведення молекулярно-генетичного дослідження використовувся біологічний матеріал – венозна кров, яка забиралася в закриті системи з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти як антикоагулянту (ЕДТА) (Sarstedt, Німеччина) та зберігалася при температурі -20°С. Транспортування матеріалу здійснювали в молекулярно-генетичну лабораторію Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України».

Дослідження поліморфізму G211A гену UGT1A1 проводилось у декілька етапів.

На першому етапі здійснювалось виділення геномної ДНК з замороженої крові комерційним набором «ДНК-сорб-В» (ЦНДІ Епідеміології Міністерства охорони здоров'я РФ). Об'єм біологічного матеріалу для виділення ДНК- 0,1 мл.

На другому етапі проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). В основі ПЛР лежить багатократне примноження певного фрагменту ДНК з використанням специфічних праймерів та термостабільної ДНК-полімерази, суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), ПЛР-буферу та MgSO4. Реакція ампліфікації відбувається за рахунок періодичних змін температурних циклів, що забезпечуються автоматичним термоциклером-ампліфікатором.

Після проведення ампліфікації, дослідження поліморфних варіантів гена UGT1A1 проводили за допомогою методу ПДРФ. Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гена UGT1A1 підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції AvaII (Fermentas). Детекцію продуктів ампліфікації та ПДРФ проводили методом горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі. Візуалізацію результатів здійснювали в УФ світлі за допомогою автоматичної системи відеозчитування Vi-Tran в трансілюминаторі «Біоком». Довжини отриманих при ампліфікакції та рестрикційному аналізі фрагментів аналізували щляхом порівняння з маркерною ДНК.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel, Windows XP. Для обробки результатів дослідження використовували стандартні методи математичної статистики із визначенням середньоарифметичних величин (M), стандартного відхилення (ð) і похибку середньої величини (m).

Результати та їх обговорення

Всі діти народилися доношеними, середній термін гестації склав 38±0,3дні. Антропометричні показники досліджуваної групи дітей були наступними: середня маса тіла при народженні становила 3422±98г, довжина тіла в середньому становила 51±0,6см. Оцінку за шкалою Апгар 8-9 балів на 1-й і 5-й хвилинах життя мали 9 дітей (60%), 7-8 балів 5дітей (33%), 6-7балів 1дитина (6%). Ранній неонатальний період у всіх дітей мав фізіологічний перебіг, всі діти були здоровими. Поява жовтяниці на 3 добу життя розцінювалася як фізіологічна, тому це не було перешкодою до виписки з пологового будинку згідно Наказу МОЗ України №152 від 14.04.2005 «Про затвердження Протоколу медичного догляду за здоровою новонародженою дитиною».

Встановлено, що більшість дітей (53%), які мали пролонговану неонатальну жовтяницю, народилися від матерів на фоні екстрагенітальної патології та ускладненого акушерського анамнезу, а саме гестоз спостерігався у 6,6% жінок, анемія вагітних у 6,6%, загроза переривання вагітності у 13%, ГРВІ- 16% жінок.

У зв'язку з тривалістю жовтяниці й відсутністю тенденції до її регресії всі діти були направлені для обстеження та проведення диференціальної діагностики у стаціонар, переважно у віці 22±1,4 днів. При поступленні діти мали жовтяничне забарвлення шкіри і видимих слизових оболонок. Колір шкіри за шкалою Крамера при поступленні у 12 дітей (80%) відповідав II-III, а у 8 дітей (20%) іктеричність сягала IV-V зони. Тривалість жовтяничного забарвлення в середньому склала 32±2,07 дні.

При біохімічному дослідженні крові у всіх дітей із пролонгованою неонатальною жовтяницею відмічалося підвищення рівня загального білірубіну сироватки крові за рахунок його непрямої фракції; середнє значення загального білірубіну сироватки крові становило 265±17,09 мкмоль/л, прямий білірубін – 12,4±1,4 мкмоль/л, непрямий білірубін – 253,9±16,6 мкмоль/л. Нормалізація загального білірубіну сироватки крові відбулася, в середньому, на 28,2±1,4 добу життя.

Показники трансаміназ знаходилися в межах норми: середнє значення АлАТ становило 31,3± 6,36 МО/л; АсАТ - 31,3± 9,7 МО/л.

Аналіз поліморфізму гену UGT1A1 показав, що у досліджуваної групи дітей був визначений кодуючий регіон G211A, генотип GG.

Електорофореграма продуктів ампліфікації гену UGT1A1 представлена на рис.1.

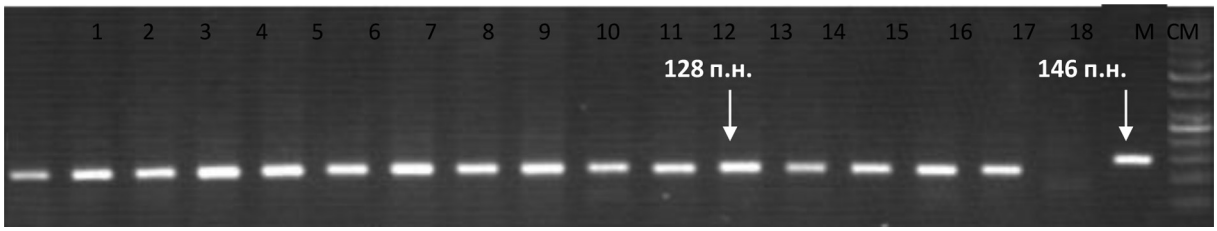

Рис. 3. Електорофореграма продуктів ампліфікації гена UGT1A1

Таким чином, пошук генетичних чинників, які би сприяли розвитку неонатальної гіпербілірубінемії, свідчить про зв'язок між поліморфізмом гену UGT1A1 та виникненням неонатальної жовтяниці у китайського та японського населення Східної Азії внаслідок гетерозиготної мутації [7, 11]. Зокрема, виявлений зв'язок між поліморфізмом гену UGT1A1 та синдромом Кріглера-Найяра обох типів, жовтяницею від материнського молока. Отримані в останні роки зарубіжні дані свідчать про необхідність дослідження гену UGT1A1 у всіх випадках незрозумілої некон'югованої гіпербілірубінемії.

Отримані нами дані виявили гомозиготний генотип GG у всіх новонароджених з пролонгованими неонатальними некон'югованими гіпербілірубінеміями, що не дозволяє виключити вплив поліморфізму G211A гену UGT1A1 на розвиток пролонгованої неонатальної жовтяниці у дітей не азійської раси. Невелика кількість обстежень не дозволяють робити висновок про відсутність достовірного впливу поліморфізму G211A гену UGT1A1 на розвиток пролонгованої неонатальної жовтяниці. Необхідне продовження наукових досліджень у даному напрямку.

Висновки

Пролонгована неонатальна жовтяниця у доношених новонароджених дітей характеризувалася гіпербілірубінемією (середнє значення загального білірубіну сироватки крові становило 265±17,09 мкмоль/л, переважно за рахунок непрямої фракції) з тривалістю жовтяничного забарвлення, в середньому, 32±2,07 дні.

Дослідження не виявило достовірного впливу поліморфізму G211A гену UGT1A1 на розвиток пролонгованої неонатальної жовтяниці.

Література

1. Амзаракова Т.Ф. Выявление факторов риска затяжного течения неонатальных желтух / Т.Ф. Амзаракова, А. К. Душина // В мире научных открытий.- 2010.- № 4 (10).- Ч. 9.- С. 95-98.

2. Фетисова Т. Г. Неинвазивные подходы к диагностике и лечению отсроченных неонатальных желтух / Т. Г. Фетисова, Л. З. Шакирова, Л. З. Сафина // Вопр. совр. педиатрии. - 2005. - Т. 4, № 3. - С. 71-74.

3. Watchko J. F. Understanding neonatal hyperbilirubinemia in the era of genomics / J. F. Watchko, M. J. Daood, M. Biniwale // Semin Neonatol.- 2002.- № 7.- P. 143–152.

4. Watchko J. F. Exploring the genetic architecture of neonatal hyperbilirubinemia / J. F. Watchko, Z. Lin // Semin Fetal Neonatal Med.- 2010.- № 15.- P. 169–175.

5. Watchko J. F. Identification of neonates at risk for hazardous hyperbilirubinemia: emerging clinical insights / J. F. Watchko // Pediatr Clin North Am.- 2009.- № 56.- P. 671–687.

6. Chang P. F. Risk of hyperbilirubinemia in breast-fed infants / P. F. Chang, Y. C. Lin, K. Liu, S. J. Yeh // J Pediatr.- 2011.- № 159.- P. 561–565.

7. Sun L. L. .Genetic factors in the occurrence of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia / L. L. Sun, Y. S. Chen, Z. Z. Yu // Pediatr Res .- 2012.- Vol. 14.- №4. - P. 256-259.

8. Long Jun Neonatal hyperbilirubinemia and Gly71Arg mutation of UGT1A1 gene: a Chinese case-control study followed by systematic review of existing evidence / Jun Long, Zhang Shaofang, Fang Xiaoyan // Acta Paediatr.-2011.- Vol. 100.- №7. P. 966-971.

9. Hiroko S. Association of breast-fed neonatal hyperbilirubinemia with UGT1A1 polymorphisms: 211G4A (G71R) mutation becomes a risk factor under inadequate feeding / S. Hiroko, U. Toshihiki, T. Kentaro // Journal of Human Genetics.- 2013.- № 58.- P. 7–10.

10. Skierka J. M. UGT1A1 genetic analysis as a diagnostic aid for individuals with unconjugated hyperbilirubinemia / J. M. Skierka, K. E. Kotzer, S. A. Lagerstedt // J Pediatr. – 2013.- № 162.- P. 1146–1152.

11. Watchko J. F. Care of the jaundiced neonate / J. F. Watchko, Z. Lin, D. K. Stevenson // New York: McGraw-Hill.- 2012.- P. 1–27.

12. Horsfall L. J. Prevalence of clinically relevant UGT1A alleles and haplotypes in African populations / L. J. Horsfall, D. Zeitlyn, A. Tarekegn // Ann Hum Genet.- 2011.- № 75.- P. 236–246.

13. Chou H. C. 211G to A variation of UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene and neonatal breastfeeding jaundice / H. C. Chou, M. N. Chen, H. I, Yang // Pediatr. Res.- 2011.- № 69.- P. -170-174.

ГЕННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ G211A ГЕНА UGT1A1 И ПРОЛОНГИРОВАННАЯ НЕОНАТАЛЬНАЯ ЖЕЛТУХА

О.С. Яблонь, О. Г. Мазур

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова МОЗ Украины (г. Винница, Украина)

Резюме. Неонатальная гипербилирубинемия является распространенной проблемой среди новорожденных детей во всем мире. В последние годы появились сообщения о роли генного полиморфизма в развитии неонатальных желтух. Известно, что полиморфизм гена 1A1 (UGT1A1) связан с возникновением пролонгированной неонатальной гипербилирубинемии. В статье представлены клинико-анамнестические данные доношенных новорожденных детей с пролонгированной неонатальной желтухой (ПНЖ). Целью работы было изучение полиморфизма гена урид индифосфатглюкуронилтрансферазы (UGT1A1) G211A у детей Винницкой области с ПНЖ. Было обследовано 15 доношенных детей в возрасте 14-30 суток, которые находились на лечении в отделении патологии новорожденных Винницкой областной детской клинической больницы. Большинство детей с ПНЖ родились от матерей с различной экстрагенитальной и акушерской патологией. Продолжительность желтушного окрашивания составила в среднем 32±2,07 дней. При биохимическом исследовании крови у всех детей исследуемой группы отмечалось повышение уровня общего билирубина сыроватки крови за счет непрямой фракции (265±17,09 мкмоль/л). Показатели трансаминаз были в пределах нормы. Анализ полиморфизма гена UGT1A1 показал, что в исследуемой группы детей был определен кодирующий регион G211A, генотип GG. Исследование не выявило достоверного влияния полиморфизма G211A гена UGT1A1 на развитие пролонгированной неонатальной желтухи у детей Винницкой области.

Ключевые слова: пролонгированная неонатальная желтуха; новорожденные; генный полиморфизм; 1A1 уридинфосфатглюкуронилтрансфераза.

G211A POLYMORHISM GENE UGT1A1 AND PROLONGED NEONATAL JAUNDICE

O. Yablon, O. Mazur

Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University (Vinnitsa, Ukraine)

Summary. Neonatal hyperbilirubinemia is a common problem among newborns all over the world. In recent years there have been reports about the role of gene polymorphism in the development of neonatal jaundice. It is known that gene polymorphism 1A1 (UGT1A1) associated with the occurrence of prolonged neonatal hyperbilirubinemia. The article presents clinico-anamnestic data of full-term infants with prolonged neonatal jaundice. The aim of this work was to study the polymorphism of the gene uridine diphosphateglucuronyltransferase (UGT1A1) G211A in children Vinnitsa region with prolonged neonatal jaundice. We examined 15 full-term children at the age of 14-30 days, which was treated in the neonatal pathology department of Vinnytsia oblast children's clinical hospital. The majority of children with prolonged neonatal jaundice were born to mothers with various obstetric and extragenital pathology. The duration of icteric colouring of 32±2,07 days. In the biochemical study of the blood of all the children of the examined groups there was an increase in the level of general bilirubin of serum of blood by its indirect fraction (265±17,09 мкmol/l). The transaminase levels are within normal limits. The analysis of the polymorphism UGT1A1 gene showed that in the studied group of children was defined by the coding region G211A, genotype GG.The study revealed no significant effect of UGT1A1 gene polymorphism G211A on the development of prolonged neonatal jaundice children of Vinnitsya region.

Key words: prolonged neonatal jaundice; newborns; gene polymorphism; UDP-glucuronosyl transferase 1A1.