

Диагностика клинического полиморфизма дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у больных с гипербилирубинемией

Г.А. Акперова

Бакинский государственный университет, Республика Азербайджан

Diagnosis of the clinical polymorphism of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients with hyperbilirubinemia

G.A. Akperova

Baku State University, Republic of Azerbaijan

С целью определения природы гипербилирубинемии новорожденных исследованы две азербайджанские семьи. Материалом исследований служила кровь новорожденных с желтухой, их сибсов и родителей. Составлены и проанализированы родословные пробандов, определен уровень гемоглобина, эритроцитов, билирубина и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, проведено ДНК-секвенирование гена *G6PD*. У пробандов установлен дефицит фермента и гемизиготность по данному гену. В семьях пробандов у родителей и сибсов также установлены гомозиготное, гетерозиготное и гемизиготное состояние. Установлены два средиземноморских варианта гена *G6PD*: с.563C>T и с.1311C>T, влияющих на клинический полиморфизм дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в обследуемых семьях. Определение уровня общего и конъюгированного билирубина и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у новорожденных может снизить тяжелые последствия гипербилирубинемии и предотвратить риск развития необратимых неврологических нарушений, вызванных ядерной желтухой.

Ключевые слова: дети, гипербилирубинемия, дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ген *G6PD*, мутации с.563C>T, с.1311C>T.

Two Azerbaijani families were examined to determine the nature of neonatal hyperbilirubinemia. Blood samples from neonatal infants with jaundice, their siblings, and parents were an object of this investigation. The pedigrees of the probands were compiled and analyzed. The levels of hemoglobin, red blood cells, and bilirubin and the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*) were determined; DNA sequencing of the *G6PD* gene was carried out. The probands were found to have *G6PD* deficiency and to be hemizygous for this gene. In probands' families, the parents and siblings were also established to be homozygous, heterozygous, and hemizygous. The examined families showed two Mediterranean *G6PD* gene variants: с.563 C>T and с.1311 C>T, which influenced the clinical polymorphism of *G6PD* deficiency. The determination of total and conjugated bilirubin levels and *G6PD* activity in newborn infants may reduce the severe consequences of hyperbilirubinemia and prevent the risk of irreversible neurological disorders caused by jaundice.

Key words: infants, hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *G6PD* gene, с.563 C>T and с.1311 C>T mutations.

Сегодня в мире около 400 млн человек имеют ферментопатию – дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ОМIM № 300908). Заболевание наследуется рецессивно, сцепленно с хромосомой X, встречается преимущественно в Африке, Азии, Средиземноморье и на Ближнем Востоке [1–4]. Эта распространенная энзимопатия является основной причиной возникновения неонатальной желтухи в эндемичных популяциях. Доминирование аномальных вариантов недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы именно в популяциях тропического пояса объясняется определенной устойчивостью носителей к характерному для этой зоны заболеванию – малярии, вследствие того, что дефицит активности фермента ведет к патологическому изменению эритроцитов [5].

Среди стран СНГ болезнь наиболее распространена в Азербайджане, где в отдельных селах зарегистрировано до 38% гемизиготных мужчин [6]. Энзимопатия широко распространена в Астаринском

и Лерикском районах республики, с частотой встречаемости 28,9 и 36,4% соответственно [7].

При сильной выраженности дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы вызывает гипербилирубинемия, а прием некоторых медикаментов и определенной пищи ведет к усилению желтухи. У новорожденных с энзимопатией может развиться ядерная желтуха с поражением ЦНС, причиной чего является нарушение функции печени и повышенное образование неконъюгированного билирубина. Неонатальная желтуха часто сопровождается низкой массой тела, резус-конфликтом, поэтому требуется проведение дифференциальной диагностики с указанными состояниями [8]. Примахиновая анемия у пациентов с гипербилирубинемией не всегда связана с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что доказывает ее гетерогенность, которая может быть вызвана генетическими факторами [9]. Определение содержания гемоглобина и эритроцитов, уровня непрямого билирубина и активности энзима является значимым методом дифференциальной диагностики при недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Для уточнения диагноза часто требуются молекулярно-генетические исследования.

© Г.А. Акперова, 2015

Ros Vestn Perinatol Pediat 2015; 3:67–70

Адрес для корреспонденции: Акперова Поной Афизовна – к.б.н., доц. кафедры генетики и теории эволюции Бакинского государственного университета AZ-1148 Азербайджан, Баку, ул. Халилова, д. 23

С целью определения природы заболевания нами обследованы две азербайджанские семьи, в которых были зарегистрированы случаи рождения детей с тяжелой гипербилирубинемией.

Материал и методы

Материалом исследований служила кровь пробандов с неонатальной желтухой, их сибсов и родителей. Полный анализ крови проведен на гематологическом анализаторе Coulter Counter (Sysmex KX-21N, Sysmex Corporation). Уровень общего и конъюгированного сывороточного билирубина в крови определяли на аппарате Cobas integra 400 plus (Roche, Швейцария). Определение активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы осуществлялось качественным методом флуоресцирующих пятен по методу Beutler–Baluda [10] и количественным анализом с применением Pointe Scientific, Inc., Бельгия, согласно протоколу [11]. Тельца Гейнца определяли по методике Дейчи [12].

При клиническом обследовании пробандов составляли и анализировали родословные [13]. В числе общих причин патологической гипербилирубинемии у новорожденных исключались несовместимость по АВО-группе и резус-показателям, сепсис, гематомы и недоношенность [14].

Для проведения молекулярно-генетического анализа ДНК экстрагировали с помощью комплекта PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies, США) согласно протоколу [15]. Проверку качества/концентрации ДНК, экстрагированной из крови, проводили при помощи NanoDrop 1000 Spectrophotometer, $\lambda=260/230$ нм, $\lambda=260/280$ нм (Thermo Fisher Scientific, США) соответственно протоколу [16]. Результаты полимеразной цепной реакции проверялись на 2% агарозном геле.

ДНК-секвенирование проведено с использованием Terminator Ready Reaction Mix of ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v 2.0 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, США) на ABI PRISM™ 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) и ABI PRISM™ 3500xL

Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi). Анализ результатов секвенирования проведен с применением программы Sequencing Analysis, v. 1.1/3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, США).

С целью определения значимости различий сопоставляемых величин применялся критерий *t* Стьюдента [17].

Результаты и обсуждение

Проведены исследования в двух многолетних семьях, где новорожденные мальчики в возрасте 5 дней (А.) и 7 дней (К.) имели выраженную желтуху.

Установлено, что у пробанда А. активность энзима составляла <10% от нормы (см. таблицу). Однако у него не наблюдались тяжелые гемолитические кризы, что, вероятно, связано со свойствами мутантного фермента, а также с другими генетическими факторами.

Каждодневное наблюдение показало, что на 2-й день жизни уровень общего билирубина повышался почти до 11 мг/дл и впоследствии постепенно возрастал, что свидетельствовало о патологической желтухе. Как правило, этот показатель повышается до 12 мг/дл у доношенных детей на 5-й день жизни, при отсутствии аномалий метаболизма билирубина дальнейшее увеличение происходит максимум до 15 мг/дл. Повышение уровня общего билирубина выше 17 мг/дл и пропорциональное снижение содержания конъюгированного билирубина ниже 0,1 мг/дл свидетельствуют о гипербилирубинемии новорожденных. Это заболевание может быть последствием тяжелой формы дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ведущего к патологическому ограничению поглощения билирубина печенью вследствие мутации гена *G6PD*.

Пробанд А. родился в многодетной (семеро детей) семье, в которой супруги – двоюродные сибсы. Установлено, что А. и его отец являются гемизиготами по дефициту глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, мать и две сестры – гетерозиготы, три другие сестры – гомозиготы, у брата определяется нормальная активность фермента.

У матери и ее дочерей, гетерозиготных по недостаточности фермента, имеются слабовыраженные клинические проявления дефицита глюкозо-6-фос-

Лабораторные показатели пробандов

Параметры	Контроль	Пробанд	
		А.	К.
Гемоглобин, г/дл	16,2±2,1	8,7±2,1	5,4±3,1
Ретикулоциты, %	0,4±0,035	5,7±2,9	6,6±3,4
Эритроциты, 10 ⁶ /мкл	5,7±1,04	2,9±1,2	3,3±1,4
Билирубин, мг/дл	3,6±1,1	17,1±5,3	18,7±5,7
Г6ФД, Е/г Нб	9,8±1,5	0,5±0,09	0,3±0,09
Общий билирубин, мг/дл	0,67±0,29	22,2±5,01	24,0±5,36
Конъюгированный билирубин, мг/дл	0,18±0,09	0,04±0,01	0,03±0,01

Примечание. Г6ФД – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

фатдегидрогеназы с 50% активностью фермента (5,3 Е/г Нб). При этой форме болезни энзимопатия проявляется только при приеме определенных лекарственных препаратов и нивелируется вскоре после прекращения их приема.

В результате опроса установлено, что у девочек, гомозиготных по дефициту энзима (возраст 5, 10, 12 лет), в первые дни после рождения имели место желтушность, увеличение селезенки, выраженная анемия с резким снижением количества эритроцитов, нечастыми гемолитическими кризами. Активность фермента у них составила в среднем $2,7 \pm 1,5$ Е/г Нб.

Активность фермента у отца ($2,1 \pm 1,0$ Е/г Нб) составила 15% от нормы. Этот показатель не соответствовал умеренной тяжести клинических проявлений, что, возможно, связано с отсутствием приема лекарственных средств окислительного действия. При опросе выяснилось, что у родного брата отца после приема некоторых препаратов наблюдались гемолитические кризы, а в семье матери пробанда наблюдались спонтанные выкидыши, что еще раз свидетельствует о наследственном характере заболевания.

В семье К., родители которого не являются кровными родственниками, недостаточность фермента в гемизиготном состоянии наблюдалась только у самого пробанда, гетерозиготность — у двух сестер. Кроме того, в данном браке зарегистрирован случай мертворождения ребенка мужского пола. Мать является гомозиготной по заболеванию с 10% ($1,3$ Е/г Нб) активностью фермента, но не имеет явно выраженных клинических признаков.

У гетерозиготных девочек выявлена 60% активность фермента ($4,5$ Е/г Нб) от нормы. У них наблюдались умеренные проявления болезни, что обусловлено наличием в организме популяции нормальных и мутантных эритроцитов. Незначительные отклонения в лабораторных показателях от нормы объясняются превалированием циркулирования в крови нормальных эритроцитов. Такое явление имеет место у гетерозиготных носителей мутантного гена при неравной инактивации несущей дефект хромосомы X на ранних стадиях эмбриогенеза. В анамнезе у сестер пробанда (возраст 4,5 и 2 года) наблюдались периодические гемолитические кризы во время вирусных инфекционных заболеваний. Кризы сопровождались снижением показателя гемоглобина и повышением уровня билирубина в крови, что, вероятно, являлось следствием подавления вирусом кроветворной функции костного мозга и нарушением функций печени.

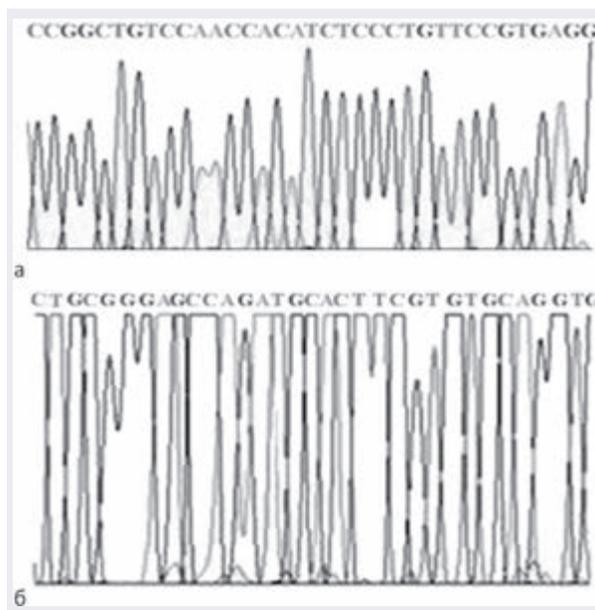
Как следует из предыдущих исследований, клинический полиморфизм дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы зависит от типа и места мутаций гена *G6PD*, состоящего из 13 экзонов и 12 интронов, общей протяженностью более 18 кб. Молекулярный анализ гена *G6PD* выявил около 200 различных мутаций, вызывающих до 400 биохимических вариантов энзимопатии [18].

Методом полного секвенирования ДНК с целью определения варианта мутации гена *G6PD*, ведущей к дефициту глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и установления корреляция типа мутации с тяжестью клинических проявлений, проанализированы образцы ДНК пробандов и членов их семей. В результате установлены две подгруппы дефицита фермента — средиземноморский вариант мутаций с.563C>T и с.1311C>T (см. рисунок).

Мутация с.563C>T характеризуется субституцией серина на фенилаланин в позиции 188 в 6-м экзоне, ведущей к резкому снижению активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (<1 Е/г Нб) [19]. В семье пробанда А. данный вариант мутации гена *G6PD* установлен у пробанда, его гомозиготных сибсов и отца. В семье пробанда К. данный вариант мутации обнаружен у пробанда и его матери.

У матери пробанда А., его гетерозиготных сестер установлен полиморфизм с.1311C>T в 11-м экзоне гена *G6PD*. При указанном полиморфизме цитозин метилируется в 5'-метилцитозин, который, в свою очередь, спонтанно дезаминируется в тимидин. Данная модификация экзона также обнаружена у гетерозиготных сестер пробанда К. и у его матери. В последнем случае полиморфизму с.1311C>T сопутствует мутация с.563C>T. При с.1311C>T варианте аминокислотных изменений не происходит, поэтому данная сайленс-мутация часто сопровождает мутацию с.563C>T в 6-м экзоне. Присутствие двух гаплотипов средиземноморского варианта мутации гена *G6PD* одновременно возможно является следствием как смешения популяций, так и самостоятельного повторения мутаций различными генетическими путями.

У лиц с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и вариантом с.1311C>T без мутации с.563C>T при-



Средиземноморский вариант мутации гена *G6PD* с.563C>T (а) и с.1311C>T (б).

существование полиморфизма объясняется моноцентричным происхождением средиземноморского варианта мутаций гена *G6PD*, а отсутствие данного полиморфизма в остальных случаях является следствием внутривариантной рекомбинации. По активности фермента вариант с.1311C>T показал практически 50%-й уровень. Присутствие кодонов TAC и TAT, согласно Gene Bank, у человека встречается в 15,3 и 12,1% случаев соответственно. Среди вариантов гена *G6PD* дикого типа частота кодона TAC – 14%, TAT – 7%. Таким образом, присутствие полиморфизма с.1311C>T ведет к небольшому снижению активности фермента, вызывая легкий вариант энзимопатии.

Таким образом, определение уровня общего и конъюгированного билирубина и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у новорожденных способствует ранней диагностике наследственной недостаточности фермента, может снизить тяжелые последствия гипербилирубинемии и предотвратить риск развития необратимых неврологических нарушений, вызванных ядерной желтухой.

Проведенные исследования демонстрируют доминирующий эффект действия вариантов с.563C>T

и с.1311C>T на экспрессию гена *G6PD* у гемизиготных мужчин и гомозиготных женщин. У гетерозиготных женщин обычно экспрессия гена не изменяется, однако в результате искажения X-инактивации ведет к дефициту фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Последнее объясняется возможным наличием мутаций за пределами регионов, охваченных анализом секвенирования, и множественностью мутаций в гене *G6PD* у женщин. Установление гетерозиготных лиц позволяет выявить наследственные аномалии фермента для успешной дифференциальной диагностики гемолитических анемий у новорожденных. Осведомленность гетерозиготных носителей о наличии у них данной патологии поможет избежать излишних диагностических исследований при гемолитических реакциях, возникающих во время инфекционных заболеваний, а также правильно назначить лечение с исключением лекарственных препаратов, являющихся потенциальными гемолитическими агентами.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте азербайджанской республики – Грант № Ei F-Mob-2-2013-4(10)-13/06/3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cappellini M., Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 371: 9606: 64–74.
2. Frank J. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* 2005; 72: 7: 1277–1282.
3. Mason P., Bautista J., Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21: 5: 267–283.
4. Minucci A., Concolino P., Vendittelli F. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Buenos Aires: a novel de novo missense mutation associated with severe enzyme deficiency. *Clin Biochem* 2008; 41: 9: 742–745.
5. Эфендиев А.М., Мусаев М.А., Аскерова Т.А. Вторичное нарушение активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у больных с первичным метгемоглобином. *Аллергол и иммунол* 2006; 3: 7: 357. (Efendiyev A.M., Mუსayev M.A., Askerova T.A. Secondary violation of glucose-6-phosphatdehydrogenase enzyme activity at patients with primary met-hemoglobin. *Allergol i immunol* 2006; 3: 7: 357.)
6. Гречанина Е.Я. Наследственные нарушения метаболизма. *Медицинская газета «Здоров'я України»* 2003; 80–84. (Grechanina E.Ya. Hereditary violations of a metabolism. *Medical newspaper “Zdorov'ya Ukraїni”* 2003; 80–84.)
7. Мухтаров З.Я. Медико-генетические исследования, регистр наследственных заболеваний и генетический груз популяции Астаринского и Лерикского районов Азербайджанской Республики. *Современные достижения медицины и практического здравоохранения в Азербайджане* 2002; 1: 186–192. (Mukhtarov Z.Ya. Medical-genetic researches, the register of hereditary diseases and genetic freight of population of Astara and Lerik regions of Azerbaijan Republic. *Sovremennye dostizheniya meditsiny i prakticheskogo zdravookhraneniya v Azerbajdzhane* 2002; 1: 186–192.)
8. Tikmani S.S., Warrach H.J., Abbasi F. et al. Incidence of neonatal hyperbilirubinemia: a population-based prospective study in Pakistan. *Trop Med Int Health* 2010; 15: 5: 502–507.
9. Minucci A., Moradkhani K., Hwang M.J. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2012; 48: 154–165.
10. Beutler E. G6PD deficiency: a historical perspective. *Blood* 2008; 111: 16–24.
11. Glucose-6-phosphate dehydrogenase reagent set. Pointe Scientific, Inc., USA 2004.
12. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии, 5-е изд. София 1966; 389. (Todorov I. *Clinical laboratory trials in pediatrics, the 5th ed.* Sofia 1966; 389.)
13. Никитин Ю.П., Лисиченко О.В., Коробкова Е.Н. и др. Клинико-генеалогический метод в медицинской генетике. Новосибирск: Наука 1983; 101. (Nikitin Yu.P., Lisichenko O.V., Korobkov E.N. et al. *The Clinical genealogical method in medical genetics.* Novosibirsk: Nauka 1983; 101.)
14. Goldstein B., Giroir B., Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6: 1: 2–8.
15. PureLink Genomic DNA Mini Kit, User Guide, Document Part Number 25-1012.
16. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V 1.0 User Manual, 2009, Thermo Fisher Scientific Inc.
17. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика 1999; 459. (Glants S. *Medical biological statistics.* M: Praktika 1999; 459.)
18. Al-Ali A.K., Al-Mustafa Z.H., Al-Madan M. et al. Molecular Characterization of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 814–816.
19. Al-Musawi B.M., Al-Allawi N., Abdul-Majeed B.A. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants in Baghdad city – Iraq. *BMC Blood Disord* 2012; 12: 4.

Поступила 10.12.14