

NASLJEDNE NEKONJUGIRANE HIPERBILIRUBINEMIJE

ZVONKO JURČIĆ¹, ORJENA ŽAJA FRANULOVIĆ¹, MARIO ŠTEFANOVIĆ²

Poznata su tri oblika nasljednih nekonjugiranih hiperbilirubinemija u čovjeka. Gilbertov sindrom (GS) je najblaži oblik, a dvije su različiti subtipovi Crigler-Najjar (CN) sindroma, tip 1 i tip 2. Spektar bolesti klinički se razlikuje na osnovu razine bilirubina u serumu, odgovoru na primjenu phenobarbitona, te prisutnosti ili odsustva glukoronida u žuči. Razjašnjenje genske podloge, bilo je moguće tek otkrićem gena koji kodira bilirubin-UDP-glukoronozil transferazu (UGT1A1). Mutacija UGT1A1 gena dovode do potpune ili parcijalne inaktivacije enzima, uzrokujući autosomalno recesivne bolesti CN tip 1 i CN tip 2. Brojne otkrivene mutacije u kodirajućoj regiji nepovoljno se odražavaju na ekspresiju gena. GS je uzrokovan insercijskom mutacijom TATA sloga u homozigotnom stanju. Kombinacije mutacija kodirajuće regije i TATA sloga, reduciraju ekspresiju gena, i dovode do širokog kliničkog spektra nasljednih obiteljskih hiperbilirubinemija.

Deskriptori: NASLJEDNE HIPERBILIRUBINEMIJE, NEKONJUGIRANE, MOLEKULARNA DIJAGNOZA

Uvod

Bilirubin je u visokim koncentracijama potencijalno toksični produkt hema ostarjelih eritrocita (80%), ali i drugih tjelesnih hemoproteina (1). Fagocitnom razgradnjom u slezeni, jetri i koštanoj srži, otpušta se u cirkulaciju gdje je čvrsto ali reverzibilno vezan za albumin. Transport kroz jetru uključuje četiri odvojene ali međuovisne stepenice:

- prihvaćanje iz cirkulacije;
- vezanje i skladištenje u jetri;
- esterska konjugacija uglavnom sa glukuronskom kiselinom;
- izlučivanje u žuč vodotopivih netoksičnih mono i diglukoronida, koji su osuđeni na eliminaciju iz organizma (2).

Glukoroniranje bilirubina u mikrosomima jetre katalizirano je jednim od brojnih izoenzima 5'-uridindifosfat (UDP) glukoronozil transferaze, skraćeno dogovorno kao UGT (3, 4). Biološki radi se o velikoj obitelji enzima koji kataliziraju glukoronidaciju brojnih endogenih i egzogenih supstanci, a koje se na osnovu homologije u slijedu sekvenci aminokiselina klasificiraju u tri obitelji: UGT1, UGT2, UGT8, a ove dalje u podobitelji (4, 5). Sve one kataliziraju dodavanje glikozilnih grupa iz nukleotidnih šećera, bilo iz UDP glukuronske kiseline, UDP galaktoze ili UDP glukoze. UGT1 obitelj uključuje brojne izoforme (izoenzime) koji kataliziraju glukoronidaciju bilirubina, kinola i fenola, ali samo UGT izoforma podobitelji A1, dakle UGT1A1, sudjeluje u konjugaciji bilirubina, dok UGT1A4 akceptira bilirubin kao supstrat in vitro, ali ne i in vivo (3, 6). Nedavnim otkrićem UGT1A1 gena omogućeno je bolje razumijevanje genske heterogenosti i čestog preklapanja kliničkih hiperbilirubinemičkih fenotipova, ali i preciznu molekularnu dijagnostiku koja omogućuje davanje odgovarajućeg genetskog savjeta (4, 7).

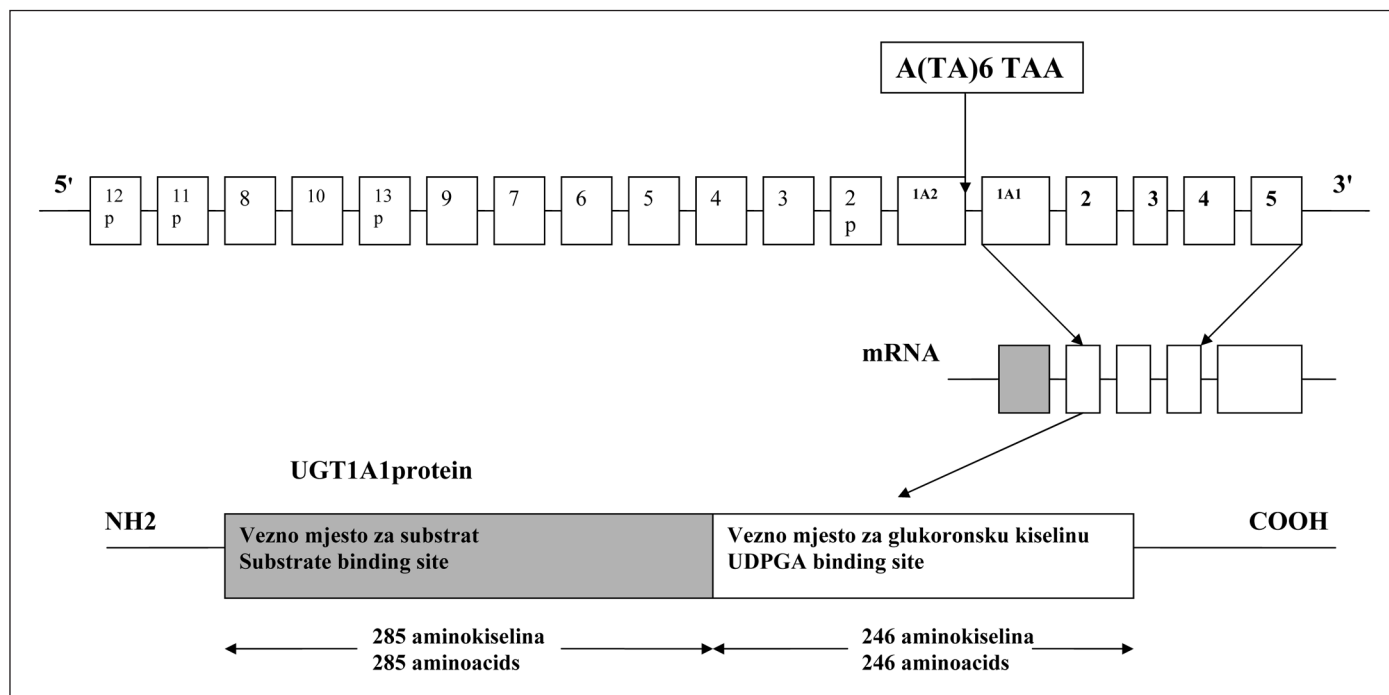
Kvantitativni ili funkcionalan nedostatak aktivnosti UGT1A1 dovesti će do nagomilavanja nekonjugiranog bilirubina, čija će razina u serumu ovisiti i o količini dnevnog stvaranja. Po kliničkoj težini, opisana su tri oblika nasljednih nekonjugiranih hiperbilirubinemija u čovjeka, a koje su neposredna posljedica mutacija u području UGT1A1 gena: Crigler-Najjar tip 1 (CN1), i tip 2 (CN2), te Gilbertov sindrom (GS) (2, 4). Istraživanjem ovih sindroma o kojima će biti riječi u ovom tekstu, dovele su prije svega do boljeg upoznavanja metabolizma bilirubina, preispitivanja ranijih pretpostavki o etiologiji i nasljeđu, što je imalo za posljedicu bolju klasifikaciju bolesti i njihovo liječenje (5, 8).

ORGANIZACIJA UGT1A1 GENA

Od nedavno je poznata cjelovita struktura UGT1A gena, koji je smješten u području q37 drugog kromosoma (Slika 1) (7). Njegova dužina iznosi 218 kilo-baza (kb), a sastoji se od slijeda četiri zajednička karboksiterminalna eksona, i najmanje 13 jedinstvenih, aminoterminalnih eksona (2-5). Slijedom dogovora, geni koji pripadaju ovom kompleksu nazvani su sukladno eksonu koji je ispoljen u glasnicičkoj ribonukleinskoj kiselini (mRNA,

¹Klinika za pedijatriju
KB "Sestre milosrdnice"
²Zavod za kliničku kemiju
KB "Sestre milosrdnice"

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Zvonko Jurčić
KB "Sestre milosrdnice"
Klinika za pedijatriju
10000 Zagreb, Vinogradska cesta 29



Slika 1.

Organizacija UGT1A1 gena. Genski lokus omogućuje transkripciju pojedinačnog genskog produkta strategijom združenosti eksona, tj. kombinirajući zasebni ekson 1 i zajedničke 2-5 sekvence, za svaki pojedinačni zapis. Svakom eksonu prethodi zaseban promotor koji sadrži TATA slog važan za prepisivanje posredstvom RNA polimeraze II. Mutacije su otkrivene uzduž svih 5 eksona i u promotorskoj regiji.

Figure 1

The human UGT1A1 locus. Gene locus enable the transcription of individual gene product utilising a strategy of exon sharing, i.e. combines unique exon 1 and common exon (2-5) sequences to form individual transcripts. All exon have their own promoters, that contain a TATA box, important for transcription by RNA polymerase II. Mutation have been identified in all 5 exons and promoter sequence.

engl. messenger ribonucleid acid), dakle 1A1-1A13 (3). Četiri od njih su tzv. pseudogeni, a preostalih devet smatraju se zasebnim genima, koji kodiraju sasvim specifičnu UGT obzirom na supstrat koji konjugiraju glukuronskom kiselinom (2, 8). Zajednički 2, 3, 4 i 5 eksoni, smješteni su na 3' kraju genskog kompleksa, i kodiraju slijed od 246 aminokiselina na karboksiterminalnom završetku enzima, koji je mjesto vezivanja glukuronske kiseline i identičan je svim oblicima UGT (5, 9).

Aminoterminalni završetak enzima sastoji se od 285 aminokiselina i specifičan je za svaku pojedinu izoformu enzima, jer je kodiran od jedinstvenih zasebnih gena (A1-A13) na 5' završetku, što je razlog posebnosti pojedinih enzima u okviru obitelji UGT (5). Prema tome, u mRNA nalazi se zapis (transkript) identičan eksonu u DNA (engl. deoxyribonucleic acid) molekuli, osim što su izrezani (splicing) introni, a rezultat je sprege djelovanja gena (eksona) 1A i zajedničkih eksona 2-5. Gledajući na molekularnom

nivou, bilirubinska UGT rezultat je udruženog djelovanja eksona 1A1 i eksona u zajedničkoj regiji (2-5) i dogovorno se bilježi kao UGT1A1, a gen koji je u stvari kombinacija eksona 1 aminoterminalne regije i zajedničkih eksona kao UGT1A1 (3). UDP-glukuronska kiselina veže se u C-domeni terminalnog dijela UGT, a domena vezivanja kada je u pitanju UGT1A1 kodirana je od eksona 3 i 4 (7, 8). Specifična mjesta vezivanja za aglikome poput bilirubina samog, nalaze se na N-terminalnom kraju, i kodirana su obzirom na specifičnost supstrata od pojedinačnih eksona 1 (3, 7).

Svakom od jedinstvenih eksona aminoterminalne regije, prethodi vlastita promotorska regija (osim 12p i 13p), koja u svom proksimalnom dijelu ima osobit TATA element, koji je smješten 37 nukleotida uzvodno od "cap site", mjesta početka prepisivanja posredstvom RNA polimeraze (3, 7, 8). Sam TATA element ili preciznije A(TA)6TAA sastoji se od 6 tandemata TA (timin-adenin) i važno je mjesto za vezivanja faktora prepisivanja

IID, što omogućuje nezavisnu regulaciju genske ekspresije pojedinih izoformi UGT (2, 5, 9). Varijacije u broju TA sekvenci (mutacije) mogu imati za rezultat promijenjenu učinkovitost i preciznost procesa prepisivanja (10).

CRIGLER-NAJJAR SINDROMI

Klinička slika teške, nehemolitičke, obiteljske žutice sa kernikterusom, nazvane kasnije CN1, opisana je od spomenutih autora 1952. godine (11). Originalni izvještaj odnosi se na sedmero pacijenata iz tri obitelji koje su bile u krvnom srodstvu, od kojih je petero umrlo u životnoj dobi do 15 mjeseci, pod slikom kernikterusa. Jedno je dijete, iako ikterično, preživjelo do 15. godine, a daljnje je razvilo neurološke simptome sa 18 godina i umrlo šest godina kasnije. Vrijednosti indirektnog bilirubina nerijetko su premašivale razinu od 800 $\mu\text{mol/l}$. Slijede zatim u literaturi pojedinačni opisi bilo izolirani ili kao zahvaćeni članovi šire obitelji, a u većine njih dokazana je nemogućnost konjugacije bilirubina zbog

Tablica 1.
Osnovne razlike Crigler Najjar i Gilbertovog sindroma

Table 1
Crigler Najjar and Gilbert syndrome differences

	CRIGLER NAJJAR		GILBERT
	TIP I	TIP II	
bilirubin ukupni total bilirubin	307,8-769,5 mmol/l (pretežito >342) almost all >342	102,6-427,5 mmol/l (pretežito <342) almost all <342	34,3-68,4 mmol/l
testovi jetrene funkcije hepatic function tests	Normalni normal	Normalni normal	Normalni normal
odgovor na fenobarbiton phenobarbiton response	Izostaje negative	sniženje bilirubina >25%	normalizacija bilirubina bilirubine normalization
Kernikterus kernicterus	Čest common	Rijedak rare	Izostaje no kernicterus
bilirubinske frakcije u žuči bile bilirubin fraction	>90% konjugirani >90% conjugated	oko 57% nekonjugirani 57% conjugated	pretežito nekonjugirani almost all nonconjugated
aktivnost bilirubin UGT1A1 bilirubin UGT1A enzyme activity	Odsutna no activity	značajno snižena significantly low	snižena za 33% od normale reduced 33% for normal
Naslijede inheritance	Recesivno recessive	Recesivno recessive	recesivno recessive

odsutne aktivnosti UGT1A1 (2, 4, 8). Za slugom Ariasa i sur. prikupljeno je 1969. godine 16 bolesnika sa teškom hiperbilirubinemijom iz 11 obitelji, i na temelju iscrpne obrade dokazali, kako se kronična nekonjugirana hiperbilirubinemija zbog manjka UGT1A1, iako fenotipski donekle homogena genotipski razlikuje (12).

Obzirom na sačuvanu sposobnost konjugacije i izlučivanja bilirubina u žuč, te odgovora na phenobarbiton, zaključili su zapravo da postoje dva klinička oblika. Jedan je težak sa visokim razinama nekonjugiranog bilirubina u serumu i čestim razvojem kernikterusa (5 bolesnika) i po svemu je sličan bolesnicima opisanim od Criglera i Najjara, a u literaturi je od tada poznat kao CN1. Drugi oblik je manje težak, u pravilu bez kernikterusa, sa nižim razinama hiperbilirubinemije i pigmentiranom žuči koja sadrži glukoronide, poznat je kao CN2 ili Arias sindrom. Ova povijesna podjela aktualna je i danas, mada postaje sve očitije kako ne postoji jasna linija razgraničenja dva oblika CN, čak niti na molekularnom nivou (12, 14). Dijagnostičke nedoumice kod djeteta sa ugrožavajućom hiperbilirubinemijom ne smiju biti razlog odgode promptnog i svrsishodnog liječenja.

CRIGLER-NAJJAR TIP I

CN1 je rijetka, autosomalno-recesivna (AR) nasljedna bolest, a do danas je objavljeno tek nekoliko stotina bolesnika (8, 15, 16). Učestalost se procjenjuje na 1:1000000 osoba, a alela 1:1000 (8, 15, 17, 18). Glavno je kliničko obilježje progresivni razvoj ikterusa već od prvih dana života, kao izraz isključivo indirektno hiperbilirubinemije sa vrijednostima bilirubina u serumu između 340-700 $\mu\text{mol/l}$ (2, 4, 19). Uobičajene funkcionalne probe jetre su uredne, stolica je normalno obojana, bilirubinurija je odsutna. Histološki pregled jetre, uključujući i elektronsku mikroskopiju je uredan, mada se zgodimice mogu naći rijetki bilirubinski trombi (2, 4). Ako izostanu odgovarajući postupci, javljaju se vrlo brzo znaci akutne bilirubinske encefalopatije, sa slikom koja se viđa u septičke ili asfiktične djece ili intrakranijalne hemoragije, bez rigiditeta u tim ranim fazama (2, 4, 20).

Kod uspješnih kontrola bilirubinemije, poremećaj može biti reverzibilan, ili ostaju diskretne neurološke abnormalnosti. Iz razloga koji nisu uvijek lako objašnjivi, u neke oboljele djece dolazi do razvoja kroničnog oblika sa trajnim znacima toksičnosti (kernikterus) (20). Bilirubin se odlaze selektivno u neka po-

dručja mozga, poput subtalamičke regije, talamusa, u putamenu i globus palidusu, ali i u cerebelumu i jezgrama kranijalnih živaca (2, 4, 20). Neurotoksičnost bilirubina nije ograničena samo na mladu životnu dob, riziku su izloženi svi oni sa dodatnim ikterogenim činiocem, poput infekcije, stresa, gladovanja ili prekida fototerapije (2, 4, 17, 18).

Klinička dijagnoza CN1 oslanja se na kombinaciji phenobarbitonskog testa, analize žuči, određivanja aktivnosti UGT1A1 u bioptičkom uzorku jetre, te molekularnom analizom (2, 4, 15, 18, 21). Primjena phenobarbitona u uobičajenoj dozi od 4-5 mg/kg nema učinka na razinu bilirubina u serumu mada je opažena zamjetna koncentracija monoglukoronida u plazmi i žuči (2, 4, 19, 21). U mnogim laboratorijima analiza žuči visokotlačnom tekućinskom kromatografijom smatra se definitivnim dokazom CN1, ukoliko se ne uspije dokazati estera (konjugata) bilirubina (15, 19, 21). Jednaku vrijednost ima i dokaz odsustva enzimske aktivnosti UGT1A1 u odnosu na bilirubin u bioptičkom uzorku jetre (2, 4, 15, 21, 22). U diferencijalnoj dijagnozi, nakon što se isključe druge potencijalne etiologije, na prvom mjestu treba isključiti CN2, odnosno Arias sindrom, što neće uvijek biti lako (2, 4, 15, 16, 21). Ako se ne pre-

poznaju i ne liječe na vrijeme, najveći dio umrijeti će od posljedica bilirubinske encefalopatije. Konzervativno liječenje ima za cilj kontrolu hiperbilirubinemije i sprečavanja razvoja encefalopatije, što je prvi korak u pripremi pacijenta za transplantaciju jetre kao konačno rješenje (15, 18, 21, 24).

CRIGLER-NAJJAR TIP 2 (Arias sindrom)

Arias sindrom je jednako rijetka bolest kao CN1, nasljeđuje se AR, iako je bilo i drugih mišljenja, koje nije bilo lako znanstveno fundirati. Općenito uzevši klinička slika je blaža nego u tipu CN1, naprosto iz razloga nižih razina indirektna hiperbilirubinemije (50-500 $\mu\text{mol/l}$), što umanjuje rizik encefalopatije, odnosno kernikterusa. Međutim, te opasnosti nisu pošteđeni niti odrasli sa CN2, ako su zahvaćene osobe nosioci npr. pridružene, inače bezazlene mutacije TATA elementa, karakteristične za GS. Kao i u slučaju CN1 ne postoji jednostavan klinički test za potvrdu dijagnoze (Tablica 1). Bilirubin u serumu je u nekonjugiranom obliku, mada se mogu osjetljivim pretragama ustanoviti tragovi monoglukoronida. U žuči su prisutni monoglukoronidi bilirubina, u znatno višim relativnim postotcima nego u CN1, ali i diglukoronidi (oko 10%) što ukazuje na bar rezidualnu aktivnost UGT1A1.

Nažalost, na osnovu rezultata analize žučnih pigmenata nije uvijek moguće razlikovati dva oblika CN, posebice ne u prvim mjesecima života, kada treba donijeti važne terapijske odluke. Test s Phenobarbitonom čini se pouzdanijim, mada uz stanovite iznimke. Primijenjen u uobičajenim terapijskim dozama, pad bilirubina iznosi između 30-80% od početnih vrijednosti, uz istovremeni porast mono i diglukoronida u žuči. Ovaj učinak Phenobarbitona ne povezuje se sa neposrednim učinkom na UGT1A1, kao što se mislilo ranije, već se djelovanje ostvaruje preko enhancer modula (290 bp) koji stimulira gen UGT1A1 za indukciju sinteze transferaze. Zbog razvojne nezrelosti puna aktivnost UGT1A1 dosiže se nakon trećeg mjeseca života, pa se tek tada može očekivati i učinak phenobarbitona i na rezidualnu aktivnost enzima u Arias sindromu, i vjerodostojnu interpretaciju nalaza.

Opisani su bolesnici sa CN2 koji nisu odgovorili na Phenobarbiton u prvim mjesecima života, ali se uspjeh postigao u drugom polugodištu, što je revidiralo dijagnozu CN1 u CN2, i odbacilo planiranu transplantaciju jetre u pojedinih pacijenata. Po iskustvu Birminghamske grupe, na osnovu analize pigmenata u žuči u djece ispod 3 mjeseca života, dijagnozu je kasnije trebalo revidirati u čak šestero od devetero djece. Petero njih, koja su u prvom dijagnostičkom koraku dijagnosticirana kao CN2, bila su u stvari GS ili sasvim zdrava, a u daljnjem je djeteta postavljena konačna dijagnoza CN2 umjesto radne dijagnoze CN1. U svakom slučaju, za razliku od starije djece i odraslih gdje se analiza žuči pokazala pouzdanom u razlikovanju između dva oblika bolesti, u malene dojenčadi ona zapravo samo potvrđuje dijagnozu CN sindroma, ali ne i njegova oblika.

U današnje vrijeme, perkutana biopsija jetre i analiza aktivnosti UGT1A1 ima povijesno značenje. Aktivnost iznosi oko 10% u odnosu na zdrave osobe, ali nerijetko postoji preklapanje rezultata s onima u GS, pa se jedno vrijeme uzimalo da su oboljeli od Arias sindroma, zapravo homozigoti za GS, dok se pogrešno vjerovalo kako se GS nasljeđuje autosomalno dominantno. Ta ideja nije bila dugog vijeka, jednako kao niti pretpostavka o postojanju sindroma Arias tip III, za pacijente koje se klinički nije moglo klasificirati u dva izvorna oblika. Najveći broj pacijenata ima normalan tjelesni i intelektualni razvoj, mada je rizik encefalopatije stalna prijetnja, kako u neonatalnoj dobi tako i u kasnijim životnim razdobljima.

LJEČENJE CN SINDROMA

U neonatalnoj dobi kontrola hiperbilirubinemije ostvaruje se uobičajenim mjerama, kako nalažu klinička zbivanja, a uključuje primjenu phenobarbitona, fototerapiju i eksangvinotransfuziju (2, 4, 14, 18). Učinak fototerapije može se poboljšati oralnim unosom agara, kolestiramina, i u zadnje vrijeme kalcijevih soli, prekidajući enterohepatičku cirkulaciju bilirubina (25). Ako primijenjene mjere ne daju uspjeha, može se pokušati primjenom inhibitora hem-oksigenaze, poput sn-protoporfirina ili zn-mezoporfirina (26).

U tjednima dok još traje postupak kliničke ili eventualno molekularne dijagnoze, nastavlja se phenobarbitonom i fototerapijom, u trajanju koju nalažu razine bilirubina. Ako se hiperbilirubinemija klasificira kao CN2 fenotip, najčešće će biti potrebna samo terapija Phenobarbitonom, što ima prije svega svoje socijalne i kozmetičke razloge u odraslih bolesnika. Ipak, na rizik iznenadne i neočekivane encefalopatije ne treba nikad zaboraviti, kako to svjedoče pojedinačni opisi u literaturi (27). Takve se epizode mogu uspješno kontrolirati plazmaferezom ili primjenom inhibitora hem-oksigenaze (15).

U slučaju CN1 dijagnoze, nestaje potreba za davanjem phenobarbitona, i nastavlja svakodnevnom fototerapijom tijekom 10-12 noćnih sati (2, 4, 8, 14). Čekajući na transplantaciju jetre, svakako treba izbjegavati lijekove koji disociraju bilirubin iz sveze s albuminom (penicilin, salicilati, sulfo spojevi), i zaštititi dijete od interkurentnih infekcija i dužeg posta (2, 4). Koliko god učinkovita u održavanju razine bilirubina ispod rizičnih granica, približavanjem pubertetu učinak fototerapije slabi, zbog deblje, pigmentirane kože, i smanjenja površine kože u odnosu na težinu tijela. Kako bi se svakidašnjica bolesnika učinila kvalitetnijom i sadržajnijom, nedavno je konstruirana naprava za dnevnu fototerapiju, a koja ne fiksira dijete za krevetić (28).

Prije ili kasnije, transplantacija jetre je kao akt izlječenja, neizbježna. Jedan nedavni pregled pokazao je da prosječna dob operiranih iznosi devet godina, ali je njih 26% već imalo znakove kernikterusa (24). Kod rizičnih pacijenata za razvoj encefalopatije treba razmotriti mogućnost profilaktičke transplantacije već u prvim godinama života. Ovisno o okolnostima to može biti ortotopička ili tzv. pomoćnički transplantat jetre, koji je rizičniji nego presađak jetre (2, 4, 15).

Temeljeći se na bogatim iskustvima kod Gunn miševa, po svemu sudeći na pragu smo ere transplantacije hepatocita. Akt je uspješno izveden prvi puta kod 11-godišnje djevojčice sa CN1 1998. godine, a zatim u još tri pacijenta (Padova, London). Iako još brojna pitanja ostaju otvorena, implantirani hepatociti doveli su do

značajnog sniženja bilirubina i znatno smanjili potrebu za fototerapijom. Genska terapija i transplantacija matičnih stanica u današnjici, još su samo veliki eksperimentalni izazov (29-31).

GILBERTOV SINDROM

Augustin Gilbert i Pierre Lereboullet opisali su 1901. godine sindrom pod imenom "La cholemie simple familiale", kasnije poznat kao GS (32). Postoji više sinonima za ovu najčešću, nasljednu, nekonjugiranu hiperbilirubinemiju, primjerice u njemačkom govornom području poznate kao Morbus Meulengraht (33). Glavna je značajka sindroma intermitentna žutica, sa dnevnim i sezonskim varijacijama, sa bilirubinom koji može biti normalan, a rijetko prelazi 100 $\mu\text{mol/l}$ (34). Temeljem definicije, znaci jasne hemolize su odsutni, kao i bilo koji oblik pridružene bolesti jetre (2, 4, 35).

Sindrom je rasprostranjen u svim rasama i geografskim područjima, a učestalost u bijeloj rasi kreće se između 3-10% (2, 4, 34, 36). Češće je zahvaćen muški spol (12,4%), nego ženski (4,8%), vjerojatno zbog otežanog klirensa bilirubina u muškaraca, što je i razlogom viših vrijednosti bilirubina (4, 36). Obzirom na sposobnost klirensa drugih organskih aniona (BSP, ICG), sindrom je heterogen, i nekad su se razlikovala tri oblika (15,21, 35). Ukratko, neke zahvaćene osobe imaju oslabljen uptake bilirubina u jetru, neki njegovu otežanu biotransformaciju, a u nekih su opet prisutne obje abnormalnosti. Po svemu, za punu kliničku ekspresiju sindroma (skleralni ikterus, hiperbilirubinemija) izgleda da nije dovoljno samo dokazano sniženje UGT1A1 na oko 30% od normalnog, već i neki drugi nepoznati genetički razlozi, tim više što nije uvijek nađena korelacija između koncentracija bilirubina i preostale enzimske aktivnosti (37, 38). U svakom slučaju, u djelu pacijenata nađeno je skraćanje života eritrocita, kao i otežano prihvaćanje bilirubina iz sinusoidalne krvi (39).

Poremećaj se uobičajeno otkriva u vrijeme oko puberteta, bilo pojavom ikteričnih sklera ili slučajnim nalazom povišenog bilirubina u okviru laboratorijske obrade zbog najčešće, interkuren-

tnog infekta. Pojavu hiperbilirubinemije uz infekst, obično provocira gladovanje, pretjerani napor ili menstrualno krvarenje (4, 21). Neki pacijenti imaju zgodimice nekarakteristične abdominalne simptome, tuže se na umor, ili su naprosto anksiozni, iz spoznaje da pojava ikterusa ima i ozbiljnih implikacija. Osim izolirane hiperbilirubinemije, osnovni hematološki nalazi, kao i rutinske pretrage jetre su uredni. Danas biopsija jetre nije indicirana, jer je histološki nalaz uredan, osim ponekad rijetkog nalaza lipofuscina (2, 4, 21). Neki su negirali postojanje sindroma, uzimajući da je umjerena hiperbilirubinemija zapravo ekstremna ekspresija normalnog (40).

Prije nego što je od nedavno dostupna molekularna analiza, nerijetko su pacijenti bili podvrgavani opsežnim istraživanjima, obzirom da je diferencijalna dijagnoza nekonjugirane hiperbilirubinemije vrlo široka (15, 21). Nije postojao potvrdni dijagnostički test, pa se ona postavljala isključivanjem. Dijagnozu podupire podatak o zahvaćenim članovima obitelji, te provocirajući testovi, poput onog hipokalorijskog, iv. testom nikotinske kiseline i u novije vrijeme jednodokratnim davanjem rifampicina u dozi od 600 mg, uz određivanje bazalnog bilirubina i nakon četiri sata (2, 4, 15, 21, 41). Kako je dio enzimske aktivnosti sačuvan, davanjem phenobarbitona dolazi do pada ili normalizacije bilirubina. Sličan učinak ima clofibrat i iz razloga koji nisu poznati, rifampicin (2, 15, 21, 42). Jedini je cilj liječenja, uvjeriti roditelje i pacijenta u bezazlenost poremećaja, osim u rijetkim okolnostima, koje nose stanoviti zdravstveni rizik, o čemu će biti riječi kasnije.

GENETSKE GREŠKE KONJUGACIJE BILIRUBINA U CRIGLER-NAJJAR SINDROMU

Nakon otkrića i razjašnjenja strukture UGT1A1 gena već više od desetljeća, moguća je interpretacija CN sindroma i GS na molekularnom nivou, ne mijenjajući pritom vrijednost kliničkih kriterija (2, 3, 13, 15, 43). Prva mutacija u CN1 opisana je 1992. godine, a godinu dana kasnije i ona u CN2 (44, 45). Sa genske točke gledišta, CN1 i GS krajnje su točke kliničkog spektra, oslikavajući učinak

brojnih, često kombiniranih mutacija na istom lokusu (8, 13, 14, 46). U sasvim recentnom istraživanju iz Italije, koje se odnosi na 31 pacijenta, uključujući dvoje iz Hrvatske, nađene su 22 različite mutacije, a dvanaest njih opisano je prvi puta (16). U pravilu, kako je već spomenuto, sindromi se nasljeđuju AR, što znači da su zahvaćene osobe homozigoti ili složeni heterozigoti. Glavnina mutacija smještena je u kodirajućim regijama, mada su opisane i one u području introna "splice site", i naročito u području promotora UGT1A1 gena (14, 46).

Mutacije u bilo kojem od zajedničkih eksona inaktivirati će čitavu obitelj UGT1A, dok će one u području eksona 1, specifično abolirati transferazu bilirubina, UGT1A1 (2, 7, 8). Do 2005. godine opisano je ukupno 77 mutacija, uključujući njih pet intronskih (16). Po svojoj naravi one mogu biti missense, nonsense, delecije ili insercije nukleotida koje dovode do pomaka okvira čitanja i preranog stop kodon signala, te "splice site" mutacije (13-15, 19, 46). Njihov je konačni rezultat u pacijenata sa CN1 trojak: potpuni izostanak ekspresije UGT1A1 od zahvaćenih alela, smanjeno stvaranje inače normalnog enzima, i na koncu sinteza okrnjenog disfunkcionalnog enzima.

Ranija ideja da su mutacije u CN1 smještene u području zajedničkih eksona, a one u CN2 u eksonu 1, nije se pokazala točnom (13, 16). U većine CN1 pacijenata obično postoje dvije različite mutacije (dvostruki heterozigot), dok je homozigotnost za istu mutaciju obično rezultat konsagviniteta (47).

Kako je u više navrata navedeno, mutacije koje dovode do sinteze okrnjenog lanca enzima, ili zahvaćaju kritičnu funkcionalnu domenu enzima, obilježje je pacijenata sa CN1, dok se u pacijenata s CN2 sindromom najčešće radi o zamjeni jedne aminokiseline, kao rezultat misense mutacije (13-16). Ovisno o mjestu substitucije, ove mutacije izazivaju najčešće samo djelomičnu redukciju enzimske aktivnosti, mogu u potpunosti abolirati aktivnost, ili je učinak mutacije bez odjeka. Stoga, da bi se učinila vjerodostojna razlika između dva oblika CN sindroma, nakon što se ustanovi genski

defekt, potrebno je mutirani gen ekspimirati u COS stanicama ili fibroblastima (2, 8, 47).

Japanski autori izvijestili su da je u rijetkih pacijenata s CN sindromom moguće dominantno negativno nasljeđivanje, na osnovu nalaza nonsense mutacije na poziciji 991 (CAG→TAG), koja potpuno anulira ekspresiju zdravog alela (48). Kako kasnije više nisu publicirani pacijenti koji bi u heterozigotnom stanju imali CN2 fenotip, vrlo je vjerojatno da druga mutacija nije pronađena, pogotovo ako se nije analizirala intronska regija i regulatorne regije ekspresije gena (8, 47). Koliko je truda i pažnje potrebno uložiti za egzaktnu molekularnu dijagnozu, primjer je pacijenta s CN2 sindromom, o kojem su nedavno izvijestili Iolascon i suradnici (49). 13-godišnji dječak s hiperbilirubinemijom između 170-284 $\mu\text{mol/l}$, bila je rezultat AG delecije u kodonu 238-240, T→G tranzicije, a usput je bio homozigot za Gilbertov tip promotora. Nadalje, Yamamoto i sur., izvijestili su o šestero japanskih pacijenata s kliničkim fenotipom CN2, koji su bili nosioci, inače karakteristične mutacije za GS u Japanaca (G71R) ali i dodatnu mutaciju u cis položaju Y486D (50).

Ina koncu, nedavno su Servedio i sur. izvijestili o četvero pacijenata s CN2 koji su bili nosioci heterozigotne strukturne mutacije, ali i dodatnu inserciju TA dinukleotida u promotorskoj regiji, karakterističnu za GS (16). Interakciju mutacije u kodirajućoj regiji i one u promotorskoj sekvenci najbolje oslikava iskustvo Kadakola i sur. koji su istraživali odnos fenotipa i genotipa. Najdrastičniji primjer bila su dvoje novorođenih blizanaca, nosioca relativno benignih mutacija u kodirajućoj i promotorskoj regiji gena, a koji su razvili tešku sliku kernikterusa zbog hemolize uslijed ABO inkompatibiliteta (46). To samo podupire gledište koliko je važno u ocjeni korelacije genotipa i fenotipa, ispitati i promotorsku regiju eksona 1, o čemu će upravo biti riječi. Na ovom mjestu potrebno je samo istaći, kako heterozigotni nosioci CN1 i CN2 sindroma imaju veliku vjerojatnost da su nosioci i GS-tip promotora, obzirom na visoku učestalost tog alela u populaciji (46). To objašnjava ranije zablude o načinu nasljeđivanja, zbog intermedijalnih vrijednosti

bilirubina u heterozigota. Šansa za ovu udruženost strukturalnog i TA7 alela je 300 puta veća nego homozigotnost za CN sindrom (46).

GENETSKE GREŠKE UDRUŽENE S GILBERTOVIM SINDROMOM

Promotorska regija UGT1A1 gena jest genetska distanca između eksona 1 i 2 gena, i sadrži po prilici 13 kb (6, 7, 38). U zdravih osoba sekvenca TATA elementa sastoji se od 6 TA dinukleotida, sukladno važećoj terminologiji obilježen kao UGT1A1*1, sa frekvencijom koja se u zdravih osoba kreće od 33-91% (3, 51). Ponavljajuće sekvence su dosta nestabilne i mogu se skraćivati i produžavati zbog, npr. nejednakog crossing-overa u mejozi. Drugi alel A (TA)7TAA ili skraćeno TA7, prisutan je u svim istraživanim populacijama, ali u frekvencijama koje jako variraju. Primjerice, u Azijata ona iznosi 0,16; u Afrikanaca čak 0,49; a u bijelaca 0,387; sa očekivanom frekvencijom TA7 homozigota od 15% (51, 52). Aleli TA5 i TA8 prisutni su isključivo u Afrikanaca, mada se posljednjih godina izvještava i o pojedinačnim prikazima u Europi (8, 53, 54). Istraživanja distribucije genotipova TATA sloga u europskim zemljama dala su donekle ujednačene rezultate.

U reprezentativnoj njemačkoj studiji, učestalost TA7/TA7 genotipa iznosi 12,4%, heterozigota 45% a "divljeg" (sauvage) 43% (55). Slična je distribucija genotipova u Nizozemskoj (11,9%) a nešto je viša učestalost genotipa TA7/TA7 u Francuskoj (17%) i Italiji (16,3%), najviša po svemu sudeći u Grčkoj (18,6%), a relativno niska u Španjolskoj (9%) (54, 56-59). Naša preliminarna istraživanja polimorfnosti TATA promotora ukazuju na učestalost TA7/TA7 genotipa od 15,3% (60). Općenito uzevši, ekspresija UGT1A1 gena, u inverznom je odnosu sa brojem TA, ona pada sa rastućim brojem TA dinukleotida, a postoji proporcionalan odnos u odnosu na koncentracije bilirubina. Raijmakers i sur. su pokazali da postoji čvrsta povezanost između genotipa promotora i ekspresije UGT1A1 u jetri (61). Osobe sa TA7/TA7 genotipom imaju najnižu aktivnost, heterozigoti TA6/TA7 intermedijalne vrijednosti, mada ima preklapanja. Na isti način, kli-

ničke razlike o učestalosti na nivou spola očekivano se gube na molekularnom nivou ali ne i razlike u vrijednostima bilirubina u serumu.

Istraživanja u primata su pokazala kako je broj TA rastao tijekom evolucije, što može izgledati paradoksalno obzirom na rizik hiperbilirubinemije, zbog oslabljene konjugacije bilirubina s rastućim brojem sekvenci (14, 51, 52). Beutler drži kako opisani polimorfizam promotorske regije, predstavlja stanovitu evolucijsku prednost, obzirom na poznata antioksidativna svojstva bilirubina, a koji je uz ovako prošireni promotor još dovoljno nizak da ne izazove kernikterus (52, 62).

Razjašnjenje molekularne osnove GS uslijedilo je sredinom zadnjeg desetljeća, 1995. godine, u pionirskim istraživanjima Bosme i sur. i Monaghama i sur. (63, 64). Za razliku od CN sindroma, u oboljelih sa GS sindromom, kodirajuća regija je strukturalno normalna, a ustanovljene promjene u pravilu se sastoje u inserciji dodatnog TA sa novom sekvencom A(TA)7TAA, sukladno aktualnom nazivlju, alel UGT1A1*28 (4). Alel je nađen u svih 22 pacijenata sa kliničkom dijagnozom GS koja su bila uključena u citirana istraživanja, a pokazalo se da reducira transkripciju za 67-82%, i posljedično tome aktivnost jetrene transferaze na 20-30% (63, 64). Uslijedila su ubrzo klinička istraživanja na većim serijama bolesnika, kako kod odraslih tako i kod djece, koja su nedvojbeno pokazala udruženost GS u bijelaca sa mutacijom u promotorskoj, nekodirajućoj regiji eksona UGT1A1 (38, 56, 62, 65, 66). Homozigotna instalacija TA7/TA7 nađena je u preko 90% pacijenata, a preostali su bili heterozigoti ili rijetke mutacije poput dječaka iz Italije i onog iz Portugala koji su bili heterozigoti za TA7/TA8 (53, 67).

Gotovo istovremeno s prvim europskim istraživanjima, objavljeni su rezultati analize UGT1A1 gena u bolesnika s GS iz Japana. Aono i sur. istražili su šestero bolesnika, i našli četiri različite heterozigotne mutacije u kodirajućim regijama eksona 1 i 4, smatrajući ih odgovornim za umjerenu hiperbilirubinemiju (68). Poslije se pokazalo da su dvije od njih, G→A tranzicija u nukleotidu 211,

sa zamjenom glicina argininom u poziciji 71(G71R;UGT1A1*6), 686 C→A (Pro229Gln), i rjeđe 1456 T→G i zamjenom arginina tirozinom (Y486D), najčešće mutacije u osoba s GS na Dalekom istoku, ali i u nekih bolesnika s CN2 (2, 38, 69). Ti rezultati podupri su uvjerenje kako se GS nasljeđuje autosomalno dominantno, i da su ustvari heterozigoti CN sindroma. Takve je stavove bilo lako oboriti, naprosto zbog činjenice da su heterozigoti za CN rijetki, a GS čest poremećaj. S druge strane, ekspresija mutiranih recesivnih alela reducirana je za 40% (G71R), što nije uvijek dovoljno za kliničku ekspresiju GS (8, 70). Stoga je bila logična potraga za ostalim faktorima rizika za hiperbilirubinemiju, poput mutacija u promotorskoj regiji, mada je alel UGT1A1*28 rijedak, a učestalost homozigota u Japanu ne iznosi više od 2-3%, Sato i sur. su u 19 japanskih pacijenata s GS u njih osam našli mutaciju TATA sloga, a u jedanaest heterozigotnu missense mutaciju, uključujući i troje koji su imali simultane mutacije u kodirajućoj regiji i TATA slogu (70).

U južnoj Aziji, molekularna je osnova nešto drugačija nego u Japanaca ili bijelaca. Istraživanje koje je obuhvatilo 20 GS pacijenata iz Tajvana, njih 16 (80%) imalo je TA7 mutaciju, a 10 uobičajenu missense mutaciju u kodirajućoj regiji, bilo G71R ili tranziciju 686 C→A (Pro229Gln) (72). Čak 7 pacijenata imalo je simultanu mutaciju TATA sloga i kodirajuće regije. Autori su mišljenja kako dodatna mutacija TATA sloga više pridonosi visini hiperbilirubinemije nego sama mutacija u kodirajućoj regiji, pogotovo kada je u pitanju Pro229Gln mutacija.

Kako je već istakao Bosma, postojanje UGT1A1*28 alela je uvjet, ali ne i dovoljan razlog za punu ekspresiju GS (63). Istraživače i kliničare intrigirala je činjenica nesklada između genotipa i kliničkog i biokemijskog fenotipa, te nerazmjera koji je očit između klinički dijagnosticiranih GS i onih stvarnih, dokazanih na molekularnom nivou (8, 47, 55). Taj odnos nije linearan, pa su traženi, osim poznatih okolišnih, i drugi genetski razlozi koji utječu na fenotipsku ekspresiju sindroma. Sugatani i sur. nedavno su upozorili da bi polimorfizam u sekvenci fenobarbitonskog "enhancer" modula

(c3576-3209) mogao imati kooperativni učinak na razinu hiperbilirubinemije, obzirom na sniženje transkripcijske aktivnosti mutiranog alela na 62% od normalnog (73).

Autori zaključuju, kako bi bar u japanskih pacijenata mutacije u području promotora UGT1A1 gena i onih u kodirajućoj regiji, pogotovo ako se javljaju kao složeni heterozigoti, mogle objasniti punu genetsku podlogu GS. Nešto kasnije, Maruo i sur. obogatili su recentna saznanja, nalazom udruženosti T-3279G alela i UGT1A1*28 u svih pacijenata sa GS, bilo japanskih (n=12) ili bijelaca (n=11) koji su inače bili homozigoti za UGT1A1*28 (74). Oni smatraju da bi ove dvije zajedničke mutacije promotorske regije, zbog kumulativnog učinka na proces transkripcije, mogle biti esencijalne u ekspresiji sindroma. Sasvim nedavno, istraživanje u Portugalu koje je obuhvatilo 80 pacijenata sa GS pokazalo je da su svi imali pridruženi polimorfizam c-3279T>G, bilo u homozigotnoj (92,5%) ili heterozigotnoj kombinaciji (7,5%) (75). Autori preporučuju rutinski screening polimorfizma "enhancera" u bolesnika u kojih se sumnja na GS, jer opisani polimorfizam snižuje transkripcijsku aktivnost gena za najmanje 30%.

IMPLIKACIJE MUTACIJA UGT1A1 GENA U DRUGIM KLINIČKIM OKOLNOSTIMA

Ovaj tekst izašao bi iz zadanih okvira, ako bi se na ovom mjestu upustili u detaljnije razmatranje rastućih medicinskih izazova vezanih uz GS, koji su posljednjih godina izronili u znanstvenoj literaturi. To se prvenstveno odnosi na interakcije sa poremećajima koji rezultiraju sa povećanom ponudom bilirubina za konjugaciju, najčešće zbog hemolize, u kojima prisustvo GS utječe na razvoj i težinu hiperbilirubinemije (14, 43, 69). Ne manje važne farmakološke implikacije, obzirom da optimalno glukoroniranje predstavlja važnu stepenicu u procesu detoksikacije (2, 4).

Još je Odell 80-ih ukazivao da bi naglašena fiziološka žutica mogla biti učinak GS (76). Ta teza testirana je nedavno, a izazova se prihvatilo Bancroft i sur. (77). Upotrebom transkutanog bilirubinometra za ocjenu hiperbilirubi-

nemije, dokazao je da TA7 homozigoti imaju ubrzani rast bilirubina u prva dva dana života, sa višim vrijednostima u odnosu na TA6/TA7 heterozigote ili "sauvage" tip promotora (TA6/TA6). Maruo i sur. su godinu kasnije, istražujući razloge hiperbilirubinemije u japanske novorođenčadi, a koja nisu imala jasan razlog nefiziološke žutice, našli dvostruko veću učestalost alela G71R, nego u kontroli. Interesantno je da autori smatraju kako nije potreban nijedan drugi dodatni provocirajući razlog za hiperbilirubinemiju, osim karakterističnog recesivnog alela kodirajuće regije.

Izazovi se nastavljaju istraživanjem razloga prolongiranog ikterusa na prsima, i otkrića da je GS dodatni, ali ne isključiv, razlog dugotrajne bilirubinemije. Monaghan je prvi upozorio da je čak 37% djece imalo homozigotnu (TA7/TA7) kombinaciju Gilbertova genotipa, uključujući jednu rijetku TA5/TAQ7 kombinaciju (79). Ti su rezultati sasvim u skladu i sa našim preliminarnim istraživanjima (60). Neizostavni Maruo i sur. su zatim pokazali kako su i kodirajuće mutacije gena (G71R) važan činioc u prolongiranju ikterusa na prsima u japanske djece (80). Takvo mišljenje utemeljeno je na nalazu mutacije u čak 16/17 ispitane djece.

Klinički može nerijetko biti dramatična slika kod udruženosti GS sa hemolitičkim anemijama (33, 69). Primjerice, u 97% novorođenčadi sa sferocitozom i homozigotnom konstelacijom TATA sloga, zbog visokih vrijednosti bilirubina zahtijevali su fototerapiju (81). U starije djece, GS udružen sa sferocitozom ima veći rizik razvoja kolelitijaze, a razine bilirubina, u krizi ili remisiji, daleko su više nego se to može objasniti stupnjem hemolize (82, 83). U G-6PD deficijentne djece sam nasljedni defekt ne može uvijek objasniti visoke, ugrožavajuće razine bilirubina, a ako je udružen sa GS, slike bolesti mogu biti dramatične (84).

Na ovom mjestu upozoriti ćemo na pojavu ikterusa u djece s pilorostenozom (tzv. ikteropilorični sindrom), koja su nosioci GS alela. Primjerice, u troje dojenčadi s pilorostenozom koja su hranjena na bočicu, čak su dvoje bili homozigoti za GS, a jedno je imalo heterozigotni tip

promotora. Kako UGT1A1 ima važnu ulogu u glukoroniranju mnogih lijekova njihov metabolizam može biti izmijenjen u pacijenata sa GS. Spomenuti ćemo samo ethinylesdradiol, acetaminophen, irinotecan i indinavir (14, 33). Svi oni mogu izazivati veće ili manje nuspojave, uključujući pojavu "nejasne" hiperbilirubinemije. I na samom kraju, da li ipak produženi TATA slog u GS pacijenata, tako čest u populaciji bijelaca, ima stanovite evolucijske prednosti. Pop svemu se čini da umjereno povišene vrijednosti bilirubina u nosioca, mogu zaustaviti oksidativne procese koji igraju ulogu u nastanku koronarne bolesti (14).

LITERATURA

1. Fevery J, Vanstapel F, Blanckaert N. Bile pigment metabolism. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1989; 3: 283-312.
2. Roy Chowdhury J, Wolkoff AW, Roy Chowdhury N, Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: *The metabolic bases of inherited disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds., McGraw Hill, New York, St. Louis, 2000; 3063-111.
3. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 255-69.
4. Nowicki MJ, Poley JR. The hereditary hyperbilirubinemia. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1998; 12: 355-66.
5. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferase: metabolism, expression and disease. *Ann Rev Pharmacol* 2000; 40: 581-616.
6. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994; 269: 17960-64.
7. Ritter JK, Chen F, Sheen YY et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol and others UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992; 267: 3257-61.
8. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N. Genetic lesion of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Human Mutation* 2000; 16: 297-306.
9. Gong QH, Cho JW, Huang T et al. Thirteen UDP-glucuronosyltransferase gene are encoded at the human UGT1 gene locus. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 357-68.
10. Maniatis T, Goodbourn S, Fisher JA. Regulation of inducible and tissue specific gene expression. *Science* 1977; 236: 1237-45.
11. Crigler JF, Najjar VA. Congenital nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 1952; 10: 169-79.
12. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi J. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronil transferase deficiency. *Amer J Med* 1969; 47: 395-409.
13. Jansen PLM. Genetic diseases of bilirubin metabolism: the inherited unconjugated hyperbilirubinaemias. *J Hepatol* 1996; 25: 398-404.
14. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003; 38: 107-17.
15. Jansen PLM. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (Suppl 2): 89-94.
16. Servedio V, Apolito M, Maiorano N et al. Spectrum of UGT1A1 mutation in Crigler-Najjar syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation. *Human Mutation*, Online 2005.
17. Watchko JF, Daood MJ, Biniwale M. Understanding neonatal hyperbilirubinaemia in the era of genomics. *Semin Neonat* 2002; 7: 143-52.
18. Van der Veere CN, Sinaasappel M, Donagh AF et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type 1: report of a world registry. *Hepatology* 1996; 24: 311-5.
19. Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G et al. Genetic defect of the UDP-glucuronosyltransferase-1 gene that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. *Clin Chim Acta* 1997; 266: 63-74.
20. Tiribelli C, Ostrow JD. The molecular basis of bilirubin encephalopathy and toxicity: report of an EASL single topic conference. *J Hepatol* 2005; 43: 156-66.
21. Gourley GR. Disorders of bilirubin metabolism. In: *Suchy FJ. Liver disease in children*, ed. Mosby, St. Louis, 1994; 401-13.
22. Rubaltelli FM, Novello A, Zancan L, Vilei MT, Muraca M. Serum and bile bilirubin pigments in the differential diagnosis of Crigler-Najjar disease. *Pediatrics* 1994; 94: 553-6.
23. Lee WS, McKiernan PJ, Beath SV. Bile bilirubin analysis in disorders of bilirubin metabolism in early infancy. *Arch Dis Child* 2001; 85: 38-42.
24. Sinaasappel M. Crigler-Najjar (CN) disease and liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belgica* 2005; 68: 484.
25. Van der Veere CN. Oral calcium phosphate: a new therapy for Crigler-Najjar disease. *Gastroenterology* 1997; 112: 455-62.
26. Rubaltelli FF, Guerini P, Reddi E, Jori G. Tin-protoporphyrin in the management of children with Crigler-Najjar disease. *Pediatrics* 1989; 84: 728-31.
27. Chalasani N, Roy Chowdhury N, Roy Chowdhury J, Boyer TD. Kernicterus in an adult who is heterozygous for Crigler-Najjar syndrome and homozygous for Gilbert type genetic defect. *Gastroenterology* 1997; 112: 2099-103.
28. Nydegger A, Bednarz A, Hardikar W. Use of daytime phototherapy for Crigler-Najjar disease. *J Pediatr Child Health* 2005; 41: 387-9.
29. Fox IJ, Roy Chowdhury J, Kaufman SS et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type 1 with hepatocyte transplantation. *New Engl J Med* 1998; 338: 1422-6.
30. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 457-60.
31. Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N, Storm SC et al. Human hepatocyte transplantation - gene therapy and more? *Pediatrics*, 1998; 102: 647-8.
32. Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Semaine Medicine* 1901; 21: 241-3.
33. Radu P, Atsmon J. Gilbert syndrome - clinical and pharmacological implication. *Israel Med Acad J* 2001; 3: 593-8.
34. Okolicsanyi L, Nassuato G, Muraca M et al. Epidemiology of unconjugated hyperbilirubinaemia: revised. *Semin Liv Dis* 1988; 8: 179-82.
35. Jansen PML, Ronald PJ, Elferink O. Hereditary hyperbilirubinaemia: a molecular and mechanistic approach *Semin Liv Dis* 1988; 8: 168-78.
36. Sieg A, Arab L, Schlierf G, Stiehl A, Kommerel B. Prevalence of Gilbert syndrome in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 1987; 112: 1206-68.
37. Schmid R. Gilbert syndrome - a legitimate genetic anomaly. *New Engl J Med* 1995; 333: 1217-8.
38. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert syndrome *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 960-6.
39. Perisco M, Perisco E, Conny T et al. Hepatic uptake of organic anions affects the plasma bilirubin levels in subjects with Gilbert syndrome. mutations in UGT1A1 *Hepatology* 2001; 33: 627-32.

40. Olsson RF, Bliding A, Jagenburg R et al. Gilbert syndrome - does it exist. *Acta Med Scand* 1988; 224: 485-90.
41. Erdil A, Kadayifci A, Ates Y, Bagci S, Uygun A, Dagalp K. Rifampicin test in the diagnosis of Gilbert's syndrome. *Int J Clin Pract* 2001; 55: 81-3.
42. Ellis E, Wagner M, Lammert F et al. Successful treatment of severe unconjugated hyperbilirubinaemia via induction of UGT1A1 by rifampicin. *J Hepatol* 2006; 44: 243-5.
43. Rossi F, Francese M, Iodice RM et al. Disordini ereditari del metabolismo della bilirubina. *Minerva Pediatr* 2005; 57: 53-63.
44. Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyl transferase in the UGT gene complex of a Crigler-Najjar type 1 patient. *J Clin Invest* 1992; 90: 150-5.
45. Aono S, Yamada Y, Keino H et al. Identification of a defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyl transferase in a patient with Crigler-Najjar type 2 patient. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 1239-44.
46. Kodakol A, Sappal BS, Ghosh SS et al. Interaction of coding region mutation and the Gilbert's-type promor abnormality of the UGT1A1 gene causes moderate degrees of unconjugated hyperbilirubinaemia and may lead to neonatal kernikters. *Med Genet* 2001; 38: 244-9.
47. Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type 1 and 2 and Gilbert syndromes. *Hematologica* 1999; 85: 150-7.
48. Kawai O, Aono S, Adachi Y et al. Crigler-Najjar syndrome type 2 is inherited as a dominant and as a recessive trait. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 645-7.
49. Iolascon A, Melone A, Coppola B, Rosatelli MC. Crigler-Najjar syndrome type 2 resulting from three different mutation in the bilirubin uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT1A1) gene. *J Med Genet* 2000; 37: 712-3.
50. Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, Doida Y, Bamba T. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP-glucosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndrome type 2. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1406: 267-73.
51. Hall D, Ybazeta G, Destro-Bisol G, Peltzl-Erler ML, Di Rienzo A. Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human population and primates. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 591-9.
52. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 promoter, A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8170-4.
53. Iolascon A, Faienza MF, Centra M, Storelli S, Zelante L. TA8 allele in the UGT1A1 gene promoter of a caucasian with Gilbert syndrome. *Hematologica* 1999; 84: 106-9.
54. Te Morche RHM, Zusterzeel PLM, Raijmakers MTM et al. Polymorphism in the promoter region of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (Gilbert syndrome) in healthy Dutch subjects. *Hepatology* 2001; 33: 765.
55. Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinaemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. *Hepatology* 2000; 32: 792-5.
56. Le Bihan-Levaufre B, Francoual J, Labrune J, Chalas L, Capel A. Mise au point et interet du diagnostic de la maldie de Gilbert par biologie moleculaire. *Ann Biol Clin* 2001; 59: 61-6.
57. Biondi ML, Turri O, Dillillo D, Stival G, Guagnellini E. Contribution of the TATA box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentration in the Italian population. *Clin Chem* 1999; 45: 897-8.
58. Tzetis M, Tsezou A, Tzetis M et al. Gilbert syndrome: analysis of the promoter region of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1 gene in the Greek population. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 873-4.
59. Miguel Fernandez Salazar J, Remacha Sevilla A, Del Rio Conde E, Baiget Bastus M. Variability in the UGT-1 gene promoter and Gilbert syndrome. *Med Clin* 2000; 115: 540-4.
60. Jurčić Z. Prolongirani ikterus na prsima i Gilbertov sindrom (GS): uzročna veza. *Pediatr Croat* 2002; 46 (Suppl 3): 117.
61. Raijmakers MTM, Jansen PLM, Steegers EAP, Peters WHM. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity with polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J Hepatol* 2000; 33: 348-51.
62. Strassburg CP, Manns MP. Jaundice, genes and promoters. *J Hepatol* 2000; 33: 476-9.
63. Bosma PJ, Roy Chowdhury J, Bakker C et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1171-5.
64. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996; 347: 578-81.
65. Costa E, Vieira E, Martins M et al. Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert's and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Molec Dis* 2006; 36: 91-7.
66. Štefanović M, Topić E, Šimundić AM, Žajac-Franulović O, Jurčić Z. Genetic variability of UDP glucuronosyl transferaza (UGT1A1) in Croatian pediatric population and its association with Gilbert syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 309.
67. Coelho H, Costa E, Vieira E, Branca R, dos Santos R, Barbot J. A new case of (TA) 8 allele in the UGT1A1 gene promoter in a caucasian girl with Gilbert syndrome. *Pediatr Hematol Oncology* 2004; 21: 371-4.
68. Aono S, Adachi Y, Uyama E et al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert syndrome. *Lancet* 1995; 345: 958-9.
69. Kaplan M, Hammerman C, Maisels MJ. Bilirubin genetics for the nongeneticist: hereditary defect of neonatal bilirubin conjugation. *Pediatrics* 2003; 111: 886-93.
70. Bosma PJ, Roy Chowdhury J, Jansen PHM. Genetic inheritance of Gilbert's syndrome. *Lancet* 1995; 346: 314-5.
71. Sato H, Adachi Y, Koiwai O. The genetic basis of Gilbert syndrome. *Lancet* 1996; 347: 557-8.
72. Hsieh SY, Wu YH, Lin DY, Chu CM, Vu M, Liaw YF. Correlation of mutational analysis to clinical features in Taiwanese patients with Gilbert syndrome. *Amer J Gastroenterol* 2001; 96: 1188-93.
73. Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinaemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 492-7.
74. Maruo Y, D Addario C, Moria A et al. Two linked polymorphic mutation A(TA)7TAA and T-3279G of UGT1A1 as the principal cause of Gilbert's syndrome. *Hum Genet* 2004; 115: 525-6.
75. Costa E, Vieira E, Dos Santos R. The polymorphism c-3279 T>G in the phenobarbital-responsive enhancer module of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene is associated with Gilbert's syndrome. *Clin Chem* 2005; 51: 2204-6.
76. Odell GB. Neonatal hyperbilirubinaemia. New York: Grune and Stratton; 1980; 39-41.
77. Bencroft JD, Kreamer B, Glenn K, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1988; 132: 656-60.
78. Maruo Y, Nishigizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinaemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphis. *Pediatrics* 1999; 103: 1224-7.
79. Monaghan G, McLellan A, Geehan A et al. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinaemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134: 441-6.
80. Maruo Y, Nishigizawa K, Sato H, Sawa H. Prolonged unconjugated hyperbilirubinaemia

- associated with breast milk and mutations fo bilirubin UDP-glucoronosyltransferase gene. Pediatrics 2000; 108: 59.
81. Iolascon A, Faienza FM, Moretti A, Perotta S, Miraglia del Giudice E. UGT1 promotor polymorphism accounts for increased neonatal appearance of hereditary spherocytosis. Blood 1998; 91: 1093.
82. Miraglia del Giudice E, Perotta S, Nobili S, Specchia C, d'Urso G, Iolascon A. Coinheritance of Gilbert's syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. Blood 1999; 94: 2259-62.
83. Jurčić Z, Štefanović M, Hajnčić TF, Persoglia A, Žaja-Franulović O, Mataija M. Istodobna prisutnost sferocitoze i polimorfizma gena glukoronil transferaze (UGT1A1) u dječaka. Paediatr Croat 2004; 48 (Supl 2): 34.
84. Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ et al. Neonatal hyperbilirubinaemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes. Pediatrics 1999; 104: 68-74.
85. Trioche P, Chales J, Francoual J et al. Jaundice with hypertrophic pyloric stenosis as early manifestation of Gilbert syndrome. Arch Dis Child 1999; 81: 301.

Summary

INHERITED UNCONJUGATED HYPERBILIRUBINEMIAS

Z. Jurčić, O. Žaja-Franulović, M. Štefanović

Three grade of inherited unconjugated hyperbilirubinaemia are recognised in man. Gilbert syndrome (GS) is the mildest form and two of these are different subtypes of Crigler-Najjar (CN) disease, type 1 and 2. This spectrum of disease is distinguished clinically primarily on the basis of the plasma bilirubin level, the response to phenobarbital administration, and the presence or absence of bilirubin glucuronide in bile. Classification of their genetic background had await the identification of the gene encoding bilirubin UDP-glucoronosyl transferase (UGT1A1). Mutations of UGT1A1 gene lead to complete or partial inactivation of enzyme causing the rare autosomal recessively inherited condition, CN type 1 and CN type 2. A number of mutation in coding region of the gene affecting expression, have been identified. GS is due to an insertional mutation at the homozygous state of the TATA element. The combination of mutations affecting coding region and of TATA box, wich reduce the expression of the gene, account for the wide clinical sepctrum of unconjugated familial hyperbilirubinaemias.

Descriptors: HEREDITARY HYPERBILIRUBINAEMIA, UNCONJUGATED, MOLECULAR DIAGNOSIS