

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Karaga

**Molekularna dijagnostika Gilbertova
sindroma**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Karaga

**Molekularna dijagnostika Gilbertova
sindroma**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. sr. sc. Jadranke Sertić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

POPIS KRATICA

ddNTP	dideoksinukleotidi (prema engl. <i>Dideoxynucleotide Triphosphate</i>)
EDTA	etilen diamino tetraacetat
FRET	fluorescentni prijenos rezonancije energije (prema engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance In Man</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom (prema engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phmylimidazol(4,5-b)pyridine
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (prema engl. <i>Real-time PCR</i>)
SN	7-etil-10-hidroksi-kaptotekin
SSCP	jednolančani konformacijski polimorfizam (prema engl. <i>Single-strand conformation polymorphism</i>)
<i>T_m</i>	temperatura taljenja (prema engl. <i>melting temperature</i>)
UDP	uridin difosfat (prema engl. <i>uridine diphosphate</i>)
UGT	uridin difosfat glukuronil transferaza

SADRŽAJ

1. SAŽETAK	7
2. SUMMARY.....	2
3. UVOD	3
3.1. DEFINICIJA	3
3.2. EPIDEMIOLOGIJA	3
3.3. GENETIČKA OSNOVA	4
3.3.1. <i>UGT</i> geni	4
3.3.1.1. <i>UGT1A</i> gen.....	4
3.3.1.2. <i>UGT1A1</i> gen.....	6
3.3.1.3. Etničke razlike <i>UGT1A1</i> promotora.....	8
3.3.1.4. Geografska rasprostranjenost TA7/TA7 genotipa.....	9
3.4. POVEZANOST <i>UGT1A1</i> ALELA S MALIGNIM STANJIMA I KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA	9
3.5. PATOGENEZA	10
3.6. PATOLOGIJA	12
3.7. KLINIČKA SLIKA	13
3.8. POVEZANOST GILBERTOVOG SINDROMA S METABOLIZMOM LJEKOVIMA.....	13
3.9.1. Učinci irinotekana u pacijenata s Gilbertovim sindromom	14
3.10. DIJAGNOZA	15
3.10.1. Laboratorijske pretrage.....	15
3.10.2. Molekularna dijagnostika	16
3.10.2.2. Masena spektrofotometrija	16
3.10.2.3. RT-PCR.....	17
3.10.2.4. Sekvencioniranje gena.....	18
3.10.3. Provocirajući testovi.....	18
3.10.3.1. Test gladovanja.....	19

3.10.3.2. Fenobarbitonski test.....	19
3.10.3.3. Test rifampicinom.....	19
3.11. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA	19
3.12. LIJEČENJE	20
4. CILJ RADA.....	21
5. ISPITANICI I METODE.....	22
5.1. NAČELO POSTUPKA	22
5.2. PRIMARNI UZORAK.....	22
5.3. VRSTA SPREMNIKA	23
5.4. POTREBNA OPREMA I REAGENSI.....	23
5.5. POSTUPAK UMJERAVANJA.....	23
5.6. FAZE POSTUPKA.....	24
5.7. NAČELO POSTUPKA ZA IZRAČUNAVANJE REZULTATA	25
5.8. BIOLOŠKI REFERENTNI INTERVALI.....	25
5.9. INTERVAL IZVJEŠTAVANJA REZULTATA	25
5.10. LABORATORIJSKO TUMAČENJE.....	25
6. REZULTATI	26
7. RASPRAVA.....	28
8. ZAKLJUČAK	29
9. ZAHVALE.....	30
11. ŽIVOTOPIS.....	37

1. SAŽETAK

Molekularna dijagnostika Gilbertovog sindroma

Ana Karaga

Gilbertov sindrom je autosomno-recesivna bolest karakterizirana povećanim vrijednostima nekonjugiranog bilirubina i predstavlja najčešći nasljedni uzrok povišenog bilirubina. Hiperbilirubinemija ovog sindroma je uzrokovana reduciranom aktivnošću enzima glukuronil transferaze koja konjugira bilirubin čineći ga topljivim u vodi. Prevalencija Gilbertovog sindroma je 4-16%. Kliničke se manifestacije uobičajeno javljaju tijekom puberteta kada koncentracija steroidnih hormona povisuje vrijednost bilirubina u krvi. Gilbertov sindrom je češći u muškaraca nego u žena (2-7:1). Klinička slika je karakterizirana intermitentnim epizodama blage žutice koja može biti izazvana dehidracijom, stresom, infekcijama ili gladovanjem. Ostali simptomi su nespecifični i rijetki. Oni uključuju proljev, mučninu, umor i gubitak apetita. Gilbertov sindrom je benigna bolest koja ne zahtijeva specifično liječenje. Važno je upozoriti pacijenta na lijekove koji mogu povisiti vrijednosti bilirubina u krvi i uzrokovati žuticu. Postoje lijekovi koji se metaboliziraju putem enzima glukuronil transferaze, te zbog reducirane aktivnosti enzima, imaju toksičan učinak na tijelo.

Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi frekvenciju umetanja TA dinukleotida u promotorsku regiju *UGT1A1* gena. Pacijenti s Gilbertovim sindromom imaju 7 TA ponavljanja na oba alela regije *UGT1A1* gena (TA7/TA7) dok su zdravi pojedinci homozigoti za TA6 alel (TA6/TA6). Heterozigoti imaju i 6 i 7 TA ponavljanja (TA6/TA7) i u većini slučajeva ne razvijaju hiperbilirubinemiju.

Analiza 1091 krvnih uzoraka je otkrila da su 136 ili 12% ispitanika zdravi pojedinci koji imaju TA6/TA6 genotip, 254 ili 24% su heterozigoti (TA6/TA7) i 701 ili 64% ispitanika su pacijenti sa 7 TA ponavljanja na oba alela (TA7/TA7).

Zaključak: Gilbertov sindrom je benigna bolest koja ne zahtijeva specifično liječenje. Važno je upozoriti oboljele osobe na provocirajuće čimbenike koji dovode do žutice te na lijekove koji mogu dovesti do hiperbilirubinemije.

Ključne riječi: Gilbertov sindrom, TA dinukleotid, UGT1A1

2. SUMMARY

Molecular diagnosis of Gilbert's syndrome

Ana Karaga

Gilbert's syndrome is an autosomal-recessive disease characterized by elevated levels of unconjugated bilirubin. This disease is the most common hereditary cause of increased bilirubin. Hyperbilirubinemia in this syndrome, is caused by the reduced activity of enzyme glucuronyltransferase which conjugates bilirubin making it soluble in water. The prevalence of Gilbert's syndrome is 4-16%. Clinical manifestations usually occur during puberty when the concentration of steroid hormones increases the level of bilirubin in the bloodstream. This syndrome is more common in men than in women (2-7:1). Gilbert's syndrome is characterized by intermittent episodes of mild jaundice that may be caused by dehydration, stress, infections and starvation. Other symptoms are nonspecific and rare. They include diarrhea, nausea, fatigue and loss of appetite. Gilbert's syndrome is a benign disease that doesn't require specific treatment. It is important to warn patients about medicines that may increase the serum concentration of bilirubin in the bloodstream and cause jaundice. There are also some medicines that are metabolized through enzyme glucuronyltransferase and, because of its reduced level, can have toxic effects on the body.

The aim of this study was to review the frequency insertion of the TA dinucleotide in gene region *UGT1A1*. Patients with Gilbert's syndrome have 7 TA repeats on both alleles in *UGT1A1* gene region (TA7/TA7) while healthy individuals are homozygotes for TA6 allele (TA6/TA6). Heterozygotes have both 6 and 7 TA repeats (TA6/TA7) and in most cases they will not have hyperbilirubinemia.

The analysis of 1091 blood samples revealed that 136 or 12% respondents are healthy individuals with TA6/TA6 genotype, 254 or 24% are heterozygotes (TA6/TA7) and 701 or 64% are patients with 7 TA repeats on both alleles (TA7/TA7).

Conclusion: Gilbert's syndrome is a benign disease that doesn't require specific treatment. It is important to warn patients on provocative factors that can lead to jaundice and also on medications that can cause hyperbilirubinemia.

Key words: Gilbert's syndrome, TA dinucleotide, UGT1A1.

3. UVOD

3.1. DEFINICIJA

Gilbertov sindrom ili Meulengrachova bolest je nasljedna bolest jetre koja rezultira porastom vrijednosti nekonjugiranog bilirubina u krvi i predstavlja najčešći nasljedni poremećaj glukuronidacije bilirubina. Gilbertov sindrom nastaje kao posljedica genetskog poremećaja u promotorskoj regiji gena koji kodira enzim uridin difosfat glukuronil transferazu 1A1 (UGT 1A1). Smanjena aktivnost UGT1A1 enzima posljedično dovodi do porasta nekonjugiranog bilirubina u krvi. Osnovni poremećaj metabolizma bilirubina može biti nedovoljna konjugacija bilirubina i/ili smanjenje njegovog jetrenog klirensa zbog smanjenog transporta kroz hepatocite (Sertić et al. 2015).

Augustin Gilbert i Pierre Lereboullet opisali su 1901. sindrom pod nazivom "La cholemie simple familiale", kasnije poznat kao Gilbertov sindrom. U njemačkom govornom području ovaj sindrom je poznat kao Morbus Meulengraht. Glavna značajka Gilbertovog sindroma je intermitentna žutica sa dnevnim i sezonskim varijacijama, te bilirubinom koji može biti normalan, a rijetko prelazi 100 $\mu\text{mol/l}$ (Gilbert i Lereboullet 1901; Okolicsanyi et al. 1988). Intermitentne epizode žutice mogu biti uzrokovane dehidracijom, gladovanjem, interkurentnim bolestima ili menstruacijom. Znaci hemolize, konjugirane bilirubinemije ili funkcionalnog poremećaja jetre su odsutni (Chowdhury 2000; Nowicki 1998; Jensen 1988).

3.2. EPIDEMIOLOGIJA

Gilbertov sindrom je najčešći nasljedni poremećaj glukuronidacije bilirubina. Češće se javlja u nekim obiteljima iako se može pojaviti i u izoliranim slučajevima. Prevalencija u populaciji je između 14 i 16% (Sertić et al. 2015). Sindrom je rasprostranjen u svim rasama i geografskim područjima. Učestalost u bijeloj rasi kreće se između 3-10%. 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. (Chowdhury et al. 2000; Nowicki et al. 1998; Okolicsanyi et al. 1988; Sieg et al. 1987)

Neke zahvaćene osobe imaju oslabljeno prihvaćanje bilirubina iz krvi u jetru, drugi imaju otežanu biotransformaciju bilirubina, dok ostali imaju prisutne obje abnormalnosti. Dakle, za punu kliničku ekspresiju ovog sindroma nije dovoljna samo snižena vrijednost UGT1A1 enzima na oko 30% od normalne aktivnosti, već i neki drugi nepoznati genetički razlozi, upravo zbog toga što nije uvijek nađena korelacija između koncentracija bilirubina i preostale enzimске aktivnosti.

Poremećaj se uobičajeno otkriva u vrijeme oko puberteta, bilo pojavom ikteričnih sklera ili slučajnim nalazom povišenog bilirubina u okviru laboratorijske obrade zbog najčešće interkurentnog infekta. (Schmid 1995; Burchell i Hume 1999)

3.3. GENETIČKA OSNOVA

3.3.1. *UGT* geni

Geni u *UGT* obitelji pružaju upute za izradu enzima uridin difosfat glukuronil transferaza koje kataliziraju kemijsku reakciju zvanu glukuronidacija (Genetics Home References). Glukuronidacijom se prenosi glikozilna skupina iz UDP glukuronske kiseline, UDP galaktoze ili UDP glukoze na akceptorski spoj (aglikon) u nukleofilnim funkcionalnim skupinama kisika (npr. hidroksilne skupine ili skupine karboksilne kiseline), dušika (npr. amini), sumpora (npr. tioli) i ugljika, uz formiranje glukuronid proizvoda (Current Drug Metabolism). Navedena reakcija predstavlja glavni put eliminacije lipofilnih ksenobiotika i endobiotika čineći ih topljivima u vodi (Ritter et al. 1992) Eliminacija se može odvijati putem žuči ili urina (Strasburg et al. 1998).

Stotine različitih tvari su glukuronizirane sa strane *UGT* enzima, uključujući bilirubin, toksične tvari proizvedene od strane raspadnutih eritrocita, serotonin i steroide (testosteron i estrogen). *UGT* enzimi također kataliziraju reakciju glukuronidacije određenih lijekova poput morfija i acetaminofena. Normalne genetske varijacije u *UGT* genu mogu igrati ulogu u odgovoru ljudi na spomenute lijekove (Genetics Home References).

Danas je poznato više od 35 različitih *UGT* genskih produkta opisano u više različitih vrsta. *UGT* geni su podijeljeni u dvije različite obitelji na temelju slijeda identiteta, *UGT1* i *UGT2* (Current Drug metabolism). Većina članova *UGT* obitelji je izražena u jetri, no također ih možemo naći i u ostalim tkivima poput tkiva želuca, dojke i crijeva. Samo je manji dio članova nađen isključivo izvan jetre a obuhvaća *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A10* i *UGT2A1* (Dessai et al. 2003).

Potporodica *UGT1* se sastoji od različitih gena koji proizlaze iz alternativnog izrezivanja prvih eksona i dijele zajedničke eksone 2-5. *UGT2* obitelj se razlikuje po tome što je njihova mRNA prepisivana iz pojedinih gena te sadrži brojne enzime koji kataliziraju glukuronidaciju različitih kemijskih baza uključujući steroide, žučne kiseline i opioide (Current Drug Metabolism).

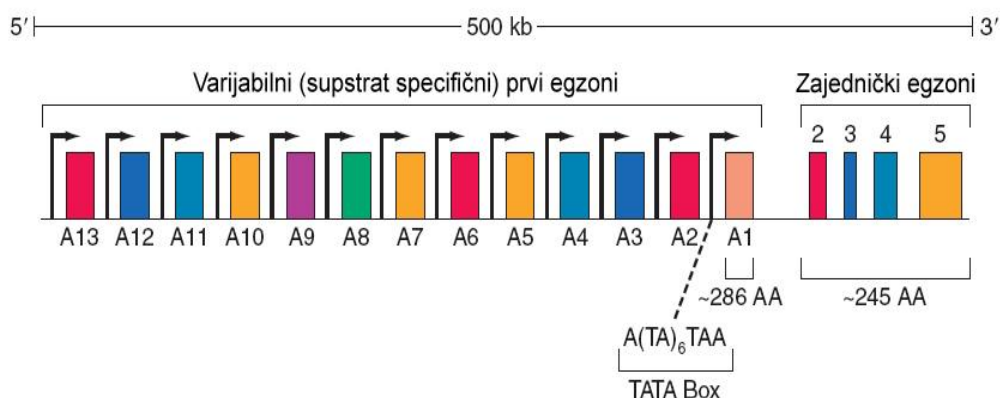
3.3.1.1. *UGT1A* gen

Obitelj *UGT1* gena uključuje brojne izoforme (izoenzime) koji kataliziraju reakciju bilirubina, kinola i fenola, ali samo *UGT* forma podobitelji A, odnosno *UGT1A1*, sudjeluje u konjugaciji bilirubina (Mackenzie et al. 1997; Bosma et al. 1994).

Zbog alternativnog prekrajanja na 3' kraju gena mogu nastati tri mRNA transkripta za svaki UGT1A gen. Svaka takva transkripcija dat će UGT protein, no neće svaki biti enzimski aktivan (Sertić et al. 2015).

Gen UGT1A je smješten u području 2q37 d kromosoma. Dužina UGT1A gena iznosi 218 kilo-baza (kb), a sastoji se od slijeda četiri zajednička karboksiterminalna egzona koji su povezani s najmanje trinaest jedinstvenih, aminoterminalnih egzona (2-5) (Slika 1). Geni koji pripadaju ovom kompleksu se, po dogovoru, nazivaju sukladno egzonu koji je ispoljen u glasničkoj ribonukleinskoj kiselini (mRNA), odnosno 1A1-1A13. Trinaest aminoterminalnih egzona obuhvaća devet pojedinačnih gena i četiri pseudogena (Chowdhury et al. 2000). Četiri pseudogena su označena kao UGT1A2P, UGT1A11P, UGT1A12P i UGT1A13P (Gong et al. 2011; Innocenti et al. 2004). Lokus UGT1A omogućuje transkripciju devet jedinstvenih gena koja je omogućena kroz dijeljenje eksona gdje je jedan od devet jedinstvenih egzona na 5' kraju gena kombiniran sa uobičajenim 2-4 i 5a egzonom na 3' kraju gena (Mackenzie et al. 1997; Riedmaier et al. 2010). Tako je stvoreno devet UGT1A transkripata sa jedinstvenim 5' krajem gena i identičnim 3' krajem gena (Gong et al. 2001). Svaki prvi egzon kodira mjesto vezivanja supstrata koje je regulirano njegovim vlastitim promotorom. Zajednički egzoni na 3' kraju genskog kompleksa kodiraju slijed od 246 aminokiselina na karboksiterminalnom završetku enzima. Upravo je to mjesto vezivanja glukuronske kiseline koje je identično u svim oblicima UGT gena (Tukey et al. 2000; Strassburg i Manns 2000; Gong et al. 2001). Dakle, ovih devet gena čine zasebne gene koji kodiraju specifičnu UGT što ovisi o supstratu koji je konjugiran glukuronskom kiselinom (Chowdhury et al. 2000; Kadakolet al. 2000). Aminoterminalni završetak enzima obuhvaća 285 aminokiselina i specifičan je za svaku pojedinu izoformu enzima te je kodiran od već spomenutih A1-A13 gena na 5' kraju gena. Dakle, aminoterminalna regija određuje specifičnost vezanja supstrata dok karboksiterminalna regija određuje interakciju sa zajedničkim donatorom supstrata, odnosno sa UDP-glukuronskom kiselinom (Gong et al. 2001).

Za svaki UGT1A gen mogu nastati tri mRNA transkripta zbog pojave alternativnog prekrajanja na 3' kraju gena. Rezultat takve transkripcije će uvijek biti UGT protein, no neće svaki biti enzimski aktivan (Sertić et al. 2015). Izoforme UGT1A gena postoje i kada se umjesto egzona 5a ili uz njega koristi egzon 5b iz zajedničkog kompleksa karboksiterminalnih egzona. Ovi alternativni oblici se nazivaju izoforme 2 ili UGT1As_i2 i enzimski su neaktivni (Girard et al. 2007). Uprkos enzimskoj neaktivnosti izoforme 2 su široko koeksprimirane s enzimski aktivnim i klasičnim UGT1A izoformama, odnosno s UGT1As_i1 (Bellemare et al. 2010).



Slika 1. Strukturna organizacija ljudskog UGT1 kompleksa. Prema: Harisson Internal Medicine, pogl.343. str: 2532.

3.3.1.2. *UGT1A1* gen

Jedan od transkripata UGT1A gena je UGT1A1 gen koji se sastoji od pet egzona (Bosma 2003; Clarke et al. 1997). Gen UGT1A1 je eksprimiran primarno u jetri, ali se mogu naći i unutar debelog crijeva i želuca (Strassburg et al. 2000) Od brojnih izoformi (izoenzima) UGT obitelji koji kataliziraju glukuronidaciju bilirubina, kinola i fenola, samo UGT1A1 sudjeluje u konjugaciji bilirubina. UGT1A4 također akceptira bilirubin kao supstrat, ali samo u in vitro uvjetima (Mackenzie et al. 1997; Bosma et al. 1994) Domena vezivanja UDP-glukuronske kiseline je u C-domeni terminalnog dijela UGT, a kodirana je od egzona 3 i 4 (Ritter et al. 1992; Kadakol et al. 2000).

Funkcionalni nedostatak aktivnosti UGT1A1 gena dovest će do nagomilavanja nekonjugiranog bilirubina (Chowdhury et al. 2000). Homozigoti ili složeni heterozigoti za neaktivan UGT1A1 gen ne mogu glukuronidirati bilirubin što dovodi do povećane razine nekonjugiranog bilirubina u serumu. To ozbiljno stanje nazivamo Crigler-Najjar tip 1 sindrom. Crigler Najjar tip II predstavlja blaži fenotip karakteriziran također sa mutacijom UGT1A1 gena, no ovdje je zadržana određena enzimsku aktivnost (Sneitz et al. 2010). Simptomi Gilbertovog sindroma se javljaju kada je glukuronidacijska aktivnost UGT1A1 gena smanjena do 25-50%.

Postoji više od 100 varijanti UGT1A1 gena. Oko 42 varijante imaju smanjenu ili uopće nemaju enzimsku aktivnost (Sertić et al. 2015). Pojedinačne varijante su označene prema UGT nomenklaturnom odboru, sa zvjezdicom praćenom brojem (Barbarino et al. 2014).

Promotorska regija UGT1A1 je 13 kb dugačka genetska distanca između egzona 1 i 2 (Bosma et al. 1994; Ritter et al. 1992; Burcheel et al. 1999). Promotorska regija se nalazi ispred svakog jedinstvenog egzona aminoterminalne regije, izuzev 12p i 13p regije. Proksimalni dio promotorske regije se sastoji od TATA elementa, smještenog 37 nukleotida uzvodno od mjesta početka prepisivanja posredstvom RNA polimeraze. TATA element se sastoji od 6 tandema TA(timin-adenin) i predstavlja važno mjesto za vezivanje faktora prepisivanja, kojim se omogućuje nezavisna regulacija genske ekspresije pojedinih izoformi UGT gena (Chowdhury et al. 2000; Tukey i Strassburg 2000; Gong et al. 2001). Frekvencija javljanja TA segmenta u zdravih osoba je od 33-91% (Mackenzie et al. 1997; Hall et al. 1995).

U 80-100% osoba s Gilbertovim sindromom otkrivena je insercija dinukleotida TA u regiji gena *UGT1A1* (Sertić et al. 2015). Polimorfizam promotorskog dijela *UGT1A1* gena, odnosno varijacije u broju TA tandema, snažno utječu na preciznost i učinkovitost procesa prepisivanja, na metabolizam bilirubina i klirens. Divlji tip promotora sadrži 6 TA ponavljanja (TA6). U rjeđim slučajevima alel može biti sačinjen od 7 TA sekvenci (TA7) unutar promotorske regije i nazivamo ga *UGT1A1**28 alel. Istraživanja su pokazala da dodatna insercija TA dinukleotida reducira transkripciju *UGT1A1* gena za 67-82%, a posljedično tome dolazi do smanjenja aktivnosti jetrene transferaze za 20-30% (Bosma et al. 1995; Monaghan et al. 1999). Ostale varijante alela obuhvaćaju *UGT1A1**36 alel koji je karakteriziran sa pet ponavljanja, velikom promotorskom aktivnošću i smanjenim rizikom za neonatalnu žuticu, te *UGT1A1**6 alel koji rezultira iz promjene glicina i arginina na položaju 71 (Beutler et al. 1998; Monaghan et al. 1999; Boyd et al. 2006) *UGT1A1**36 je najčešći u populacijama afričkog podrijetla dok je u azijskim populacijama *UGT1A1**6 češći i može se prezentirati Gilbertovim sindromom ili neonatalnom žuticom. Enzimaska aktivnost kod ovog alela je na 30% od normalnog (Yamamoto et al. 1998; Maruo et al. 1999; Akaba et al. 1998).

Homozigoti za polimorfizam *UGT1A1**28, odnosno osobe koje imaju 7 TA ponavljajućih sekvenci na oba alela, imaju povećanu razinu bilirubina u krvi, povećanu učestalost žučnih kamenaca i bolesti žučnog mjehura (Bosma et al. 1994) Budući da se Gilbertov sindrom nasljeđuje autosomno-recesivno, heterozigotni genotip (TA6/TA7) u većini slučajeva neće dovesti do povišenih razina bilirubina u krvi. Zdrave osobe imaju genotip TA6 na oba alela. Besmislene mutacije u *UGT1A1* genu predstavljaju mutacije u kojima dolazi do zamjene kodona između dvije aminokiseline. One se mogu naslijeđivati autosomno-dominantno.

Dakle, potvrda za Gilbertov sindrom je nalaz genotipa TA7 na oba alela *UGT1A1* gena. (Sertić et al. 2015) Iako je postojanje *UGT1A1**28 alela uvjet to nije dovoljan razlog za punu ekspresiju Gilbertovog sindroma (Bosma et al. 1994). Velika je razlika između klinički dijagnosticiranih Gilbertovih sindroma i onih dokazanih na molekularnom nivou (Kadacol et al. 2000; Sampietro i Iolascon 1999; Borlak et al. 2000). Zbog nepoklapanja kliničke i molekularne dijagnoze traga se, osim okolišnih čimbenika, i za drugim genetskim čimbenicima koji utječu na fenotipsku ekspresiju sindroma (Sugatani et al. 2002).

3.3.1.3. Etničke razlike *UGT1A1* promotora

Postoji velik broj populacijskih studija kojima je predmet istraživanja bila usporedba vrijednosti serumskih bilirubina u crnim i bijelim populacijama. Pokazano je da crni muškarci i žene imaju 15-20% niže razine od odgovarajućih bijelaca (Manolio et al. 1992; Madhavan et al. 1997). Također, crna djeca sa žuticom imaju manje razine bilirubina od bijele djece sa žuticom (Brown et al. 1985). Azijska dojenčad su pokazala više vrijednosti bilirubina od bijelih dojenčadi (Horiguchi i Bauer 1975; Fischer et al. 1988; Yamauchi i Yamanouchi 1989) Iako bi prema navedenim nalazima mogli pretpostaviti da osobe afričkog podrijetla imaju nisku prevalenciju (TA)7 mutacije, na temelju daljnjih istraživanja dokazano je upravo suprotno. Dodatno ponavljanje TA dinukleotida je češće u osoba afričkog podrijetla nego u bijelaca, dok se u osoba azijskog podrijetla pokazala manja tendencija pojavljivanja (TA)7 mutacije. Nalazi osoba afričkog porijekla su pokazali da se u nekim promotorima nalaze regije s 5 TA ponavljanja(TA5) ili s 8 TA ponavljanja(TA8).

Najčešći varijantni alel u bjelačkoj i afroameričkoj populaciji je *UGT1A1**28 sa učestalošću od 0,26-0,31 u bijelaca, 0,42-0,56 u afroamerikanaca te 0,09-0,16 u azijskim populacijama (Beutler et al. 1998). Usporedba etničkih grupa prikazana je u tablici 1 i 2.

Tablica 1. Genotipovi *UGT1A1* promotora u tri različite etničke grupe prema bazi podataka PNAS (Beutler et al. 1998)

Genotip	Europljani	Azijci	Afrikanci
6/6	24	33	26
6/7	39	13	37
7/7	8	1	19
7/8	0	0	6
8/8	0	0	2
6/8	0	0	4
7/5	0	0	5
6/5	0	0	2
UKUPNO	71	47	101

Tablica 2. Frekvencije promotora *UGT1A1* gena u tri različite etničke skupine prema bazi podataka PNAS (Beutler et al. 1998)

Alel	Europljani	Azijci	Afrikanci
5	0(0)	0(0)	0,035(7)
6	0,613(87)	0,840(79)	0,470(95)
7	0,387(55)	0,160(15)	0,426(86)
8	0(0)	0(0)	0,069(14)

3.3.1.4. Geografska rasprostranjenost TA7/TA7 genotipa

Prema reprezentativnoj njemačkoj studiji, učestalost homozigotnog (TA7/TA7) genotipa iznosi 12,4%, heterozigotnog genotipa (TA6/TA7) 45%, a divljeg genotipa (TA6/TA6) 43% (Borlak et al. 2000).

U Nizozemskoj je slična distribucija genotipova, sa učestalošću homozigotnog genotipa od 11,9%. Francuska i Italija imaju više vrijednosti homozigotnog genotipa od Nizozemske, koji čini 17% u Francuskoj, odnosno 16,3% u Italiji. Najviša učestalost TA7/TA7 genotipa od 18,6% zabilježena je u Grčkoj, a najniža, samo 9%, u Španjolskoj (Te Morche et al. 2001; Le Bihan-Levaufre 2001; Biondi et al. 1999; Tzetis et al. 2000; Salazar et al. 2000). Istraživanja polimorfnosti TATA sloga u Hrvatskoj pokazuju da je čestalost TA7/TA7 genotipa 15,3%. (Jurčić 2002)

3.4. POVEZANOST UGT1A1 ALELA S MALIGNIM STANJIMA I KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA

Aleli *UGT1A1* su povezani s razvojem različitih karcinoma. Osim bilirubina i lijekova, UGT1A1 enzimi glukuronidiraju bezo-(α)-piren-trans-7,8-dihidrodiol, prekursor jakom karcinogenu benzo(α)-piren-trans-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksidu koji se nalazi u hrani, katranu i dimu cigareta (Fang et al. 2002). Koncentracija hormona estradiola, čije su razine povezane s razvojem raka dojke, se također mijenja zbog njegove glukuronidacije posredovane UGT1A1 enzimima (Williams et al., 2002; James RE et al. 2011). Heterociklički amin, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridin (PhIP), je još jedan karcinogen u kuhanom mesu koji se biotransformira pomoću UGT enzima. Jetrene UGT transferaze biotransformacijom PhIP-a pokazuju zaštitni učinak protiv, PhIP-om posredovane, kancerogenosti (Girard H. et al., 2005). Više studija na kineskom i bijelom stanovništvu su pokazala da prisutnost UGT1A1 alela povećava rizik od karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma (Adegoke et al. 2004; Guillemette et al. 2000; Bajro et al. 2012).

Bilirubin je poznati antioksidans koji može spriječiti stvaranje plakova koji vode do ateroskleroze. Zbog poznatog djelovanja bilirubina, postoje brojni dokazi da *UGT1A1* alel djeluje kao protektivni čimbenik koji pruža zaštitu od nastanka kardiovaskularnih bolesti (Lin et al. 2010). On narušava transkripciju *UGT* gena te posljedično povisuje razinu bilirubina u krvi. Stoga bi *UGT1A1* alel mogao služiti kao važan biomarker za predviđanje osoba sa smanjenim rizikom za kardiovaskularnu bolest (Chen et al. 2011).

3.5. PATOGENEZA

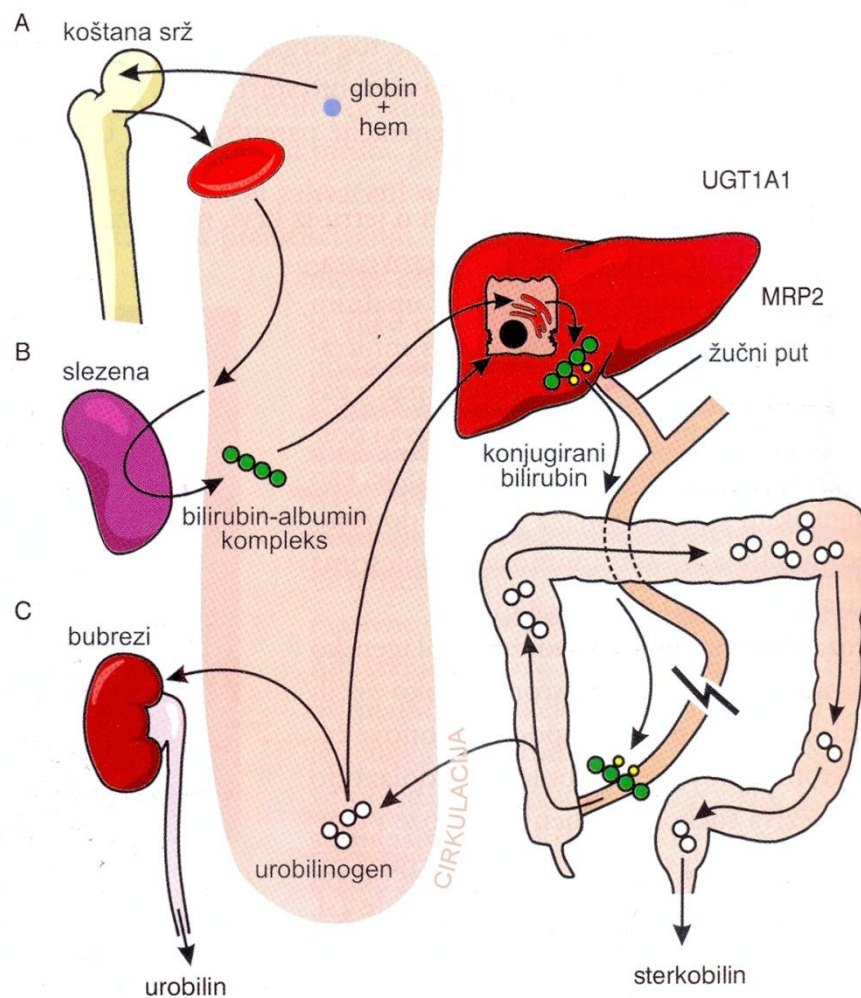
Bilirubin je tetrapiroolski ravni lanac zeleno žute boje. Nastaje kao produkt katabolizma prstena hema koji se najvećim dijelom nalazi vezan s globinom čineći hemoglobin. Hem se manjim dijelom može naći kao dio hemoproteina u svim stanicama organizma (Tribelli 2002). Izgrađen je od četiri pirolska prstena koja tvore protoporfirinski spoj. Molekula hema nastaje vezanjem željeza za protoporfirinski spoj. Četiri takve molekule zajedno sa molekulom globina čine hemoglobin.

Najveći dio bilirubina, 70-90%, se dobiva razgradnjom hemoglobina. (medscape) Hemoglobin iz raspadnutih eritrocita fagocitiraju makrofagi u Kupfferovim stanicama jetre, slezene i koštane srži (Kotel P et al. 1996). Nakon hemolize eritrocita hem se odvoji od globina i zatim razgradi u željezo i protoporfirinski prsten. Slobodni hem, koji je toksičan, razgrađuje se pomoću enzima hem oksidaze. One cijepaju tetrapiroolski prsten hema. Postoje dvije vrste hem oksidaza. Hem oksidaza 1 je koncentrirana u slezeni gdje se aktivira pomoću hema iz raspadnutih eritrocita. Brzo se inducira različitim citotoksičnim podražajima te se smatra jednim od proteina toplinskog šoka. Hem oksidaza 2 se nalazi u mozgu i testisima. Njena aktivacija teče preko ugljičnog monoksida nastalog cijepanjem tetrapiroolskog prstena. Depolarizacijom neurona dolazi do ulaska kalcija i njegovog vezanja s kalmodulinom te aktivacije hem oksidaze 2 (HO2) (Maines 1997).

Razgradnjom protoporfirinskog dijela, osim ugljičnog monoksida, nastaje linearni tetrapirrol biliverdin. Biliverdin je topljiviji u vodi od bilirubina te se stoga lakše izlučuje. Njegova akumulacija u tkivima je jako mala zbog brze redukcije bilirubina pomoću enzima biliverdin-reduktaze (Sedlak et al. 2009) Slobodni nekonjugirani bilirubin čini 96% ukupnog bilirubina u plazmi i čvrsto se veže za albumine plazme te putem krvi dolazi do jetrenih stanica. Kod novorođenog djeteta nalazimo više slobodnog bilirubina zbog nižeg afiniteta fetalnog albumina za bilirubin te zbog kompeticije s masnim kiselinama i organskim anionima za vezanje s albuminom. Prijelaz bilirubina u hepatocite je posredovan aktivnim prijenosom. U citoplazmi hepatocita bilirubin se veže za ligandin koji ga prenosi do endoplazmatske mrežice, odnosno do mitohondrija na njima. Oko 80% bilirubina se konjugira s glukuronskom kiselinom u bilirubin-monoglukuronid(BMG) i bilirubin-diglukuronid(BDG). Glukuronidacija je omogućena bilirubin UDP-glukuronozil transferazom, a pri samoj reakciji oslobađa se jedna molekula anorganskog fosfata i jedna molekula ADP-a. Samo 10% čini konjugacija sa sulfonskom kiselinom gdje nastaje bilirubin sulfat dok se ostalih 10% se veže za druge tvari. (Tribelli C et al. 1996; Guyton i Hall 2003) Konjugirani bilirubin se izlučuje u žuč, a putem žuči dolazi u crijeva. Prijenos u žučne kanale je posredovan proteinom koji se naziva multispecifični kanalikularni transporter organskih aniona (cMOAT). Konjugirani bilirubin je topiv u vodi i izlučuje se sa žuči u duodenum.

U crijevima se djelomice pretvara u urobilinogen pomoću crijevnih bakterija. Jedan dio urobilinogena se u terminalnom dijelu tankog crijeva apsorbira preko enterocita u krv i natrag u portalnu venu koja ga vraća u jetru. Jetra zatim ponovno izlučuje bilirubin u žuč i crijeva.

Ovo kruženje bilirubina iz jetre u crijeva te natrag u jetru nazivamo enterohepatična cirkulacija. Drugi dio urobilinogena se razgrađuje u sterkobilinogen koji oksidacijom prelazi u smeđi sterkobilin. Sterkobilin se izlučuje putem stolice davajući joj specifičnu boju, a samo 5% urobilinogena se izlučuje bubregom.



Slika 2. Metabolizam bilirubina. Prema: Damjanov I. Pythology for the Health Professions, str. 572.

Za kliničko-laboratorijske svrhe važno je razlikovati nekonjugirani bilirubin od konjugiranog bilirubina. Nekonjugirani ili prehepatični bilirubin se nalazi vezan za albumine plazme, netopljiv je u vodi te se ne može izlučiti putem mokraćé.

Konjugirani ili posthepatični bilirubin se u većini slučajeva nalazi vezan za glukuronsku kiselinu što ga čini topljivim u vodi i omogućuje njegovu eliminaciju putem mokraće. Laboratorijski se konjugirani i nekonjugirani bilirubina mogu razlučiti preko analize krvi, što je važno za klasifikaciju žutice. Manje od 20% konjugiranog bilirubina će pripadati nekonjugiranoj hiperbilirubinemiji dok više od 50% čini konjugiranu hiperbilirubinemiju. Postoji i mješoviti oblik sa 20-50% konjugiranog bilirubina (Damjanov 2011).

Kada bilirubin nije vezan uz albumine plazme, izlazi iz cirkulacije i taloži se u brojnim tkivima. Najviše ga ima u jetri, a zatim u bubrežima, plućima, srcu, nadbubrežnim žlijezdama, mozgu, koži i na sklerama. Visoke koncentracije i/ili dulja izloženost nekonjugiranom bilirubinu pospješuje njegovo prodiranje kroz membranu i uništavanje dvostrukog sloja lipida uzrokujuću staničnu lizu, oštećenje membrane mitohondrija s padom transmembranskog potencijala i permeabilnosti. Djelovanje na permeabilnost se osobito osjeti u neuronima i astrocitima izazivajući kočenje oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima osobito središnjeg živčanog sustava (Reiner i Kovač 2005; Ostrow i Tribelli 2003; Kumral et al. 2005). Toksični učinak nekonjugiranog bilirubina mogu povećati hipoalbuminemija i acidoza koja smanjuje afinitet albumina za bilirubin (Gamulin 2005; Popović i Kovač 2005).

Hiperbilirubinemija označava povišenje serumskog bilirubina iznad 17 $\mu\text{mol/L}$. Žutica ili ikterus nastaje zbog odlaganja bilirubina u kožu i bjeloočnice pri koncentracijama višim od 34 $\mu\text{mol/L}$ i karakterizirana je žutom bojom kože i bjeloočnica te sama po sebi ne označava bolest, već posljedicu patoloških procesa (Vrhovac 2008).

Žutica se prema načinu nastanka može podijeliti na hemolitičku, hepatocelularnu i opstruktivnu žuticu. Hemolitička žutica nastaje kod povećane razgradnje eritrocita i povećane potrebe za ekskrecijom bilirubina (Andreis et al. 2005). Kod hemolize i diseritropoeze nedostatna je konjugacija bilirubina što rezultira povećanom koncentracijom nekonjugiranog bilirubina u krvi. Hepatocelularna žutica je povezana sa bolestima jetre kao što su hepatitis, ciroza jetre te uništenje jetre brojnim lijekovima. Pri raznim bolestima jetre mogu se pronaći i konjugirani i nekonjugirani bilirubin, ovisno o samoj patologiji jetre. Treću skupinu čini opstruktivna žutica koja nastaje pri poremećaju u protoku žuči. Mehaničku prepreku mogu uzrokovati kamenci ili tumori kao što je karcinom pankreasa. U opstruktivnoj žutici predvladava konjugirani bilirubin. Povećana ekskrecija konjugiranog bilirubina mokraćom rezultira tamnom bojom mokraće, dok je stolica, zbog manjka sterkobilina, svijetla i akolična (Vucelić 2005).

3.6. PATOLOGIJA

Biopsija jetre u svrhu dobivanja patohistološkog uzorka u pacijenata s Gilbertovim sindromom, nije indicirana, jer je u većini slučajeva je hitološki nalaz uredan (Chowdhury et al. 2000; Nowicki et al. 1998; Gourley 1994).

U rijetkim se slučajevima na patohistološkom nalazu može pronaći nakupljanje lipofuscina i hipertrofija endoplazmatskog retikuluma (Sertić et al. 2015).

3.7. KLINIČKA SLIKA

Gilbertov sindrom se u većini slučajeva otkrije tijekom puberteta. Najčešće se radi o slučajnom nalazu u okviru laboratorijske pretrage zbog infekta ili o pojavi ikteričnih sklera (Nowicki et al. 1998; Gourley 1994). Klinička slika je karakterizirana recidivirajućim epizodama blage inetrmitentne žutice koja nastaje zbog nekonjugirane hiperbilirubinemije. U samim epizodama vrijednosti bilirubina ne prelaze 103 $\mu\text{mol/L}$, dok između epizoda bolesnici imaju skoro uredne vrijednosti bilirubina. Pojavu hiperbilirubinemije, odnosno pojavu atake bolesti, mogu uzrokovati gladovanje, menstruacija, stres, umor, fizički napor, febrilna stanja ili hemoliza.

Većina bolesnika s Gilbertovim sindromom nema nikakvih simptoma. Manji broj bolesnika se može tužiti na nekarakteristične abdominalne simptome poput mučnine, proljeva, neugode u abdomenu, osjećaja težine u abdomenu. Ovi simptomi nastaju neovisno o vrijednostima bilirubina u krvi (Sertić et al. 2015).

3.8. POVEZANOST GILBERTOVOG SINDROMA S METABOLIZMOM LIJEKOVIMA

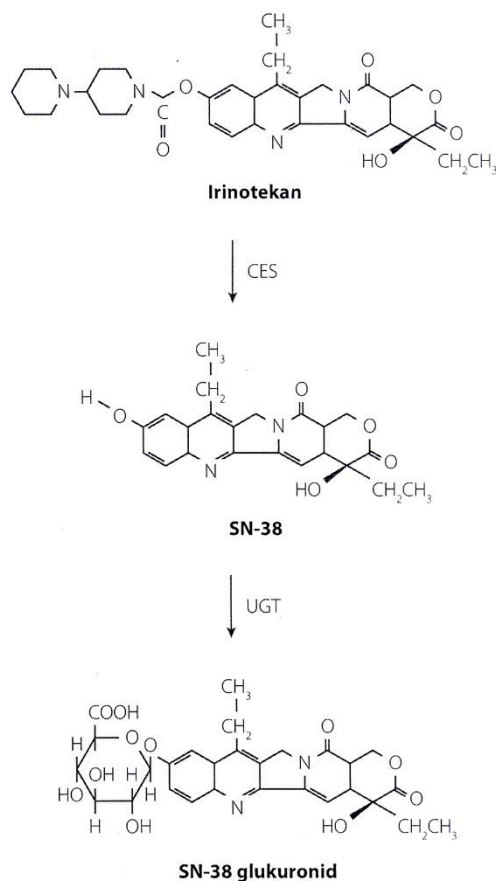
Smanjena aktivnost enzima UDP glukuronil transferaze u Gilbertovom sindromu uzrokovana je poremećajem u promotorskoj regiji gena *UGT1A1*.

UGT enzim glukuronidira bilirubin u topljivi produkt. Osim bilirunina, UGT enzim je uključen u proces glukuronidacije hormona estrogena i brojnih lijekova.

U osoba s Gilbertovim sindromom se mogu javiti toksični učinci lijekova koji se metaboliziraju preko tog enzima. Atazanavir, peginterferon i ribavirin mogu uzrokovati hiperbilirubinemiju. Citostatik irinotekan se metabolizira putem UGT enzima te se pri reduciranoj aktivnosti enzima smanjuje jetreni metabolizam irinotekana i povećavaju se njegovi toksični učinci (Sertić et al. 2015). Osim irinotekana, UGT enzim je odgovaran za glukuronidaciju i ostalih lijekova, poput raloksifena i etopozida (Kemp et al. 2002; Kishi et al. 2004).

3.9.1. Učinci irinotekana u pacijenata s Gilbertovim sindromom

Irinotekan je polusintetički analog kinolinskom alkaloidu kaptotekinu koji inhibira enzim topoisomerasu 1. Tkivna i serumska karboksil esteraza biotransformira irinotekan u inaktivan metabolit SN-38 (7-etil-10-hidroksikaptotekin), koja ima 100 do 1000 puta veće antitumorsko djelovanje od irinotekana. Inaktivan metabolit irinotekana glukuronidiraju jetreni UGT enzimi (Iyer et al. 1998).



Slika 3. Prikaz metabolizma irinotekana. Prema: Sertić (2015); str. 321.

U Gilbertovom sindromu, zbog smanjene aktivnosti UGT enzima, može doći do povećanog toksičnog učinka irinotekana (Sertić et al. 2015).

Najčešće nuspojave se pojavljuju u okviru neutropenije i proljeva. Navedene komplikacije mogu rezultirati smanjenjem doze ili prekinućem terapije irinotekanom (Lankisch et al. 2008). Oko 7% Pacijenata koji pokazuju znakove teške neutropenije i groznice pod utjecajem irinotekana, umiru od ovih komplikacija (Obradović et al. 2008).

Oba alela (*UGT* *28 i *UGT**6) su pokazala povezanost s razvojem toksičnosti irinotekana (Onoue et al. 2009).

Američka agencija za hranu i lijekove je 2004. godine preporučila da se na lijek irinotekan stavi naljepnica koja upozorava da homozigoti sa *UGT*28* alelom moraju primiti nižu početnu dozu lijeka (Camptosar New York 2012). Smatra se da je rizik za neutropeniju, u bolesnika s homolognim genotipom, veći ako uzimaju srednje (150-250 mg/m²) i visoke doze lijeka (više od 250mg/m²). Oni koji su uzimali niže doze su imali sličan rizik kao i pacijenti s divljim, zdravim genotipom (TA6/TA6) (Hoskinks et al. 2007).

Prospektivna studija je pokazala da pacijenti sa metastatskim kolorektalnim karcinomom pod terapijom irinotekana, imaju višu stopu tumorskog odgovora i smanjen rizik progresije, u usporedbi s TA6/TA6 genotipom, no ovo saznanje nema velikog utjecaja na preživljavanje bolesnika (Toffoli et al. 2006). Nekoliko studija je pokazalo isplativost genotipizacije *UGT*28* alela, prije uvođenja terapije irinotekanom (Obradović et al. 2008; Zlato et al. 2009).

Istraživanja studija unutar azijskih populacija ukazuju da heterozigoti ili homozigoti za *UGT1A1*6* alel imaju veći rizik za razvoj neutropenije, proljeva i povećanu izloženost citotoksičnom SN-38 metabolitu (Onoue M. et al., 2009; O'Reilly i Rowinsky 1998).

3.10. DIJAGNOZA

Dijagnoza Gilbertovog sindroma obuhvaća kvalitetno uzimanje anamneze, kliničku sliku, laboratorijske pretrage, molekularnu dijagnostiku i provocirajuće testove. U anamnezi se posebno treba orijentirati prema obiteljskoj anamnezi, odnosno na zahvaćenje pojedinih članova obitelji. Klinička slika najčešće nije karakteristična pa se više vremena posvećuje molekularnoj analizi. Prije dostupne molekularne analize, pacijenti su često bili podvrgavani opsežnim istraživanjima zbog široke diferencijalne dijagnoze. Dijagnoza se postavlja isključivanjem jer nije pronađen potvrdni dijagnostički test (Jansen 1999; Gourley 1994; Chowdhury et al. 2000; Nowicki et al. 1998; Erdil et al. 2001). Kontinuiranim praćenjem bolesnika i laboratorijskih nalaza kroz 12-18 mjeseci možemo postaviti definitivnu dijagnozu, dok nam potvrdu iste daje molekularna dijagnostika (Sertić et al. 2015).

3.10.1. Laboratorijske pretrage

Laboratorijske pretrage u Gilbertovom sindromu pokazuju povišene vrijednosti nekonjugiranog bilirubina, dok je konjugirani bilirubin gotovo uvijek u normalnim rasponima. U oko 40% bolesnika se može javiti blaga hemoliza bez anemije, te povišene vrijednosti urobilinogena u urinu.

Histološki nalazi jetrenog tkiva su uredni iako se u rijetkim slučajevima može primjetiti nakupljanje lipofuscina u hepatocitima i hipertrofija endoplazmatskog retikuluma (Sertić et al. 2015).

Referentni raspon bilirubina je 3-30 mmol/L. Bilirubin se mjeri u serumu kao direktni ili izravni bilirubin i kao ukupni ili neizravni bilirubin. Direktni ili izravni bilirubin kolerira s vrijednostima konjugiranog bilirubina, ali je sklon precijeniti stvarne vrijednosti jer uključuje i konjugirani bilirubin i bilirubin kovalentno vezan za albumin (delta-bilirubin). Neizravni, ukupni bilirubin kolerira s vrijednostima nekonjugiranog bilirubina.

Ovdje je moguće podcjenjivanje rezultata zbog reagiranja dijela nekonjugiranog bilirubina s diazosulfanilnom kiselinom. Ovom reakcijom nastaje azobilirubin, koji se mjeri kao direktni bilirubin. Referentni raspon ukupnog bilirubina je 0,05-0,3 mmol/L ili 0,2-1,2 mg/dL. Direktni bilirubin ima referentni raspon 0,025-0,1mmol/L ili 0,1-0,4 mg/dL.

3.10.2. Molekularna dijagnostika

Molekularna dijagnostika nam potvrđuje dijagnozu Gilbertova sindroma. Postoji više metoda za utvrđivanje mutacija gena *UGT1A1*. Neke od njih uključuju SSCP metodu, masenu spektrofotometriju, RT-PCR i sekvencioniranje gena.

3.10.2.1. SSCP metoda

SSCP (prema engl. *single-strand conformation polymorphism*) metoda ili metoda konformacije jednog lanca je jednostavna i brza metoda analize polimorfizama konformacije jednolančane DNA. Nakon denaturacije DNA molekule, jednolančana DNA zauzima poseban konformacijski oblik ovisno o DNA slijedu nukleotida. Prisutnost mutacije u jednolančanoj DNA uzrokuje stvaranje posebne strukture jednolančane DNA. Nakon umnožavanja DNA PCR-om i njezinog prebacivanja na poliakrilamidni gel, jednolančana DNA s mutacijom će različito putovati od jednolančane DNA bez mutacije. Bojanje srebrovim nitratom omogućit će detekciju razdvojenih jednolančanih DNA.

3.10.2.2. Masena spektrofotometrija

Masena spektrofotometrija je još jedna metoda koja se može koristiti za određivanje broja TA ponavljanja. DNA se umnožava, a njezin uzorak se analizira MALDI-TOP-MS metodom. Fenotip se određuje imunoreaktivnim proteinom i mjerenjem brzine estradiol-3-glukuronidacije, markera enzimske aktivnosti (Sertić et al. 2015).

3.10.2.3. RT-PCR

RT-PCR ili real time-PCR je najčešće korištena metoda za detekciju broja TA ponavljanja. Za razliku od klasičnog PCR-a, u RT-PCR-u se koristi fluorescentno obilježena hibridizacijska probu. Metoda sadrži kombinaciju analize temperature mekšanje i mjerenje fluorescencije (Sertić et al. 2015).

Spomenuta kombinacija se naziva FRET princip (prema engl. *fluorescence resonance energy transfer*). Princip FRET poboljšava prostornu rezoluciju jer se oslanja na blisku, fizičku interakciju dva fluorofora, koji se nazivaju davaoc i primaoc. Tri uvjeta moraju biti zadovoljena za pravilno izvođenje FRET principa.

Prvi uvjet je da udaljenost između davaoca i primaoca ne smije biti veća od 10 nm. Drugi uvjet obuhvaća spektar oba fluorofora te govori o tome da se spektar emisije donora mora preklapati sa spektrom ekscitacije akceptora. Zadnji uvjet koji mora biti ispunjen je odgovarajuća orijentacija davaoca i akceptora kako bi se omogućio prijenos energije (Bacskaï et al. 2003.). Donori i akceptori dolaze iz klase autofluorescentnih proteina. Pri odabiru pojedinih fluorofora moraju se pažljivo proučiti njihova spektroskopska svojstva. Spektroskopska svojstva uključuju dovoljnu razdvojenost u ekscitacijskom spektru za selektivno poticanje koja dolazi od donora, preklapanje više od 30% između spektra emisije donora i spektra ekscitacije akceptora za dobivanje u svrhu dobivanja učinkovitog prijenosa energije te razumna odvojenost spektara emisije donora i akceptora koja omogućuje samostalno mjerenje fluorescencije pojedinog fluorofora (Pollok i Heim 1999)

Na 3' kraju prve sonde se nalazi donor fluorescencije koji je najčešće obilježen zelenim fluoresceinom, dok se na 5' kraju druge sonde nalazi akceptor fluorescencije. Početak reakcije je obilježen vezivanjem sonde na jednolančanu DNA. One se nalaze vrlo blizu jedna drugoj te zelena fluorescencija donora na prvoj sondi podražuje akceptor fluorescencije na drugoj sondi. Podraženi akceptor apsorbira svu zelenu fluorescenciju i posljedično emitira crvenu boju. Emitiranje se događa samo ako je ispunjen prvi uvjet za pravilno izvođenje, odnosno ako je udaljenost između donora i akceptora jako mala. Na DNA kalupu sinteza lanca počinje od sonde na kojoj se nalazi donor fluorescencije, dakle od 3' kraja kad DNA polimeraza dođe do 5' kraja sonde s akceptorom fluorescencije. Uloga DNA polimeraze je kataliziranje stvaranja komplementarnog lanca. Dolaskom na 5' kraj druge sonde, DNA polimeraza cijepa vezu jednolančane DNA sa sondom oslobađajući akceptor. Udaljavanjem akceptora od donora njegova fluorescencija prestaje i dolazi do pojave zelene fluorescencije fluoresceina na donoru prve sonde. Umnažanje se može pratiti u stvarnom vremenu, jer se boja i količina fluorescentnih molekula mjeri fluorimetrijski nakon svakog PCR ciklusa.

Razlikovanje DNK bez polimorfizama i DNA s polimorfizmom omogućeno je pomoću spomenutih hibridizacijskih sonde. DNA s polimorfizmom, udružena s hibridizacijskom sondom, je nestabilnija je pri temperaturnim promjenama, odnosno ima nižu temperaturu mekšanja, od kompleksa DNA bez polimorfizma i njegove hibridizacijske sonde.

Genotip divljeg tipa (TA7/TA7) se razlikuje od genotipa homozigota (TA6/TA6) ili heterozigota (TA6/TA7) na temelju temperature taljenja (T_m). Razlog za najčešće korištenje ove metode leži u brzini. RT-PCR obuhvaća brze temperaturne cikluse od otprilike 20-ak sekundi što je razlikuje od klasičnog PCR-a.

3.10.2.4. Sekvencioniranje gena

Početak sekvencioniranja gena obilježava klasična PCR reakcija.

PCR smjesu čine pacijentova DNA, pufer smjesa deoksinukleotida, enzim Taq polimerazu, MgC_2 i mješavinu parova PCR početnica. Nakon prve PCR smjese i umnožavanja svih DNK od interesa, slijedi druga PCR smjesa.

Ona se sastoji od svih sastojaka kao i prva, uz dodatak 4 dideoksinukleotida (ddNTP-a) od kojih je svaki obilježen različitom fluorescentnom bojom. Dideoksinukleotidi se nazivaju terminalnim, jer u slijedećoj sekvencijskoj PCR reakciji zaustavljaju elongaciju novog DNA lanca. Nakon početne dvije PCR reakcije slijedi treća sekvencijska PCR reakcija u kojoj se koriste početnice karakteristične za *UGT1A1* gen. Pomoću mikrofilter pločica se pročišćavaju sekvencijski produkti, a zatim se u alikvot pročišćenog produkta dodaje formamid i temperaturno se denaturira. Svaki od ddNTP-a se stavlja na elektroforezu u svrhu njihova odvajanja te fragmenti izlaze jedan za drugim. Budući da su ddNTP obilježeni različitim fluorescentnim bojama, detektor će lako raspoznati o kojem se ddNTP radi. Sekvenca nukleotida je vidljiva na računalu u obliku elektroferograma (Sertić et al. 2015).

3.10.3. Provocirajući testovi

U provocirajuće testove ubrajamo:

1. Test gladovanja
2. Nikotinski test
3. Fenobarbitonski test
4. Test rifampicinom

3.10.3.1. Test gladovanja

Test gladovanja ili hipokalorijski test je test koji obuhvaća dvodnevno gladovanje pacijenta. Dnevno se smije unositi samo 300 kcal, bilirubin se mjeri i prije i poslije gladovanja. Gladovanje smanjuje djelovanje glukuronil transferaze uzrokujući porast vrijednosti bilirubina. Test se smatra pozitivnim ako je došlo do porasta vrijednosti nekonjugiranog bilirubina za 2 do 3 puta u odnosu na njegove vrijednosti prije gladovanja.

Zbog uznapredovale dijagnostike, ovaj test se danas rjeđe koristi (Sertić et al. 2015).

3.10.3.2. Fenobarbitonski test

Fenobarbitonski test započinje određivanjem vrijednosti bilirubina u krvi. Zatim se daje fenobarbiton u dozi 60-100 mg dnevno. Test je pozitivan ako se vrijednosti bilirubina normaliziraju ili smanje za više od 60%.

3.10.3.3. Test rifampicinom

Test rifampicinom se sastoji od jednokratnog davanja rifampicina u dozi od 600mg , uz određivanje bazalnog metabolizma bilirubina i vrijednosti bilirubina nakon 4 sata (Chowdhury et al. 2000; Nowicki et al. 1998; Jansen 1999; Gourley 1994.; Ellis et al. 2001; Erdil et al. 2001).

3.11. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA

U diferencijalnoj dijagnozi Gilbertovog sindroma treba isključiti:

-kolecistitis

-hepatitis

-metastaze u jetri

-primarni karcinom probavnog trakta (Mitrović D. et al. 2013)

3.12. LIJEČENJE

Gilbertov sindrom je benigna bolest koja ne zahtijeva specifično liječenje. Potrebno je upozoriti pacijente na lijekove koji mogu uzrokovati hiperbilirubinemiju (Sertić et al. 2015). U cilju prevencije se savjetuje adekvatna ishrana, izbjegavanje velikog fizičkog napora te ostalih provocirajućih faktora koji mogu utjecati na razvoj žutice (Mardešić et al. 2003).

4. CILJ RADA

Cilj rada bio je utvrditi učestalost TA6/TA6, TA6/TA7 i TA7/TA7 genotipova u pojedinaca sa sumnjom na Gilbertov sindrom. Uzorci krvi pojedinaca su bili testirani na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb u vremenskom periodu od siječnja 2003.godine do srpnja 2012.godine.

5. ISPITANICI I METODE

U ovom radu obuhvaćene muške i ženske osobe sa sumnjom na Gilberov sindrom, testirane na učestalost insercije TA dinukleotida, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Podaci su prikupljeni iz baze podataka retrospektivnom analizom. Ukupno smo izdvojili 1091 analiziranih uzoraka.

Primarni uzorak u analizi je bila periferna venska krv koju smo uzeli u epruvetu s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA (ljubičasti čep). Zatim se DNA izolira iz krvi i amplicira pomoću tehnologije LightCycler, a sama reakcija je nazvana lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu RT-PCR-a (prema engl. *Real time PCR*). Stvarno vrijeme označuje praćenje umnažanja izoliranog odsječka DNA nakon svakog ciklusa umnažanja.

5.1. NAČELO POSTUPKA

Metoda PCR u stvarnom vremenu omogućuje detektiranje promjene u slijedu nukleotida u DNA. Navedenom metodom se može otkriti i promjena u samo jednom nukleotidu. Promijene u nukleotidu se detektiraju kombinacijom analize temperature taljenja (T_m) i mjerenjem fluorescencije navedenih dobivenih produkata. Fluorescenciju mjerimo pomoću hibridizacijskih sonda, pri čemu jedna služi kao donor fluorescencije, a druga kao akceptor fluorescencije. Temperatura taljenja je mjera termičke energije kod koje je polovica helikalne strukture narušena. Hibrid između DNA i hibridizacijske sonde predstavlja heterodupleks. Temperatura taljenja heterodupleksa ovisi o njegovoj duljini, nukleotidnom sastavu i stupnju homologije. Nižu temperaturu mekšanja ima hibrid između DNA i hibridizacijske sonde u kojemu nema potpune homologije od hibrida s punom homologijom.

Analizom krivulje temperature taljenja možemo isčitati genotip analiziranog uzorka. Normalni i mutirani alel imaju različite vrijednosti na krivulji koje nam omogućavaju njihovo razlikovanje.

Hibrid između homozigotnog TA7/TA7 i specifične LightCycler-Red označene probe će imati višu temperaturu taljenja sa vrijednostima oko 60°C. Divlji tip TA6/TA6 i specifična LightCycler-Red proba rezultiraju nižom temperaturom taljenja oko 56°C, dok hibrid između heterozigota TA6/TA/ i specifične probe imaju dvije točketaljenja: na 60°C i na 56°C.

5.2. PRIMARNI UZORAK

Venska krv.

5.3. VRSTA SPREMNIKA

Epruveta s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA (ljubičasti čep) za vensku krv.

5.4. POTREBNA OPREMA I REAGENSI

Redni broj	Komercijalni test	Proizvođač	Kataloški broj
1.	LC-Fast Start DNA Master Hyb probe	Roche	03 003 248 001

Početnice i probe		Proizvođač
GIL-1 (100 μM)	F 5'-AAG TGA ACT CCC TGC TAC CTT -3'	TIBMOLBIOL
GIL-2 (100 μM)	R 5'-CCA CTG GGA TCA ACA GTA TCT -3'	TIBMOLBIOL
Probe S (20 μM)	5'-Lc Red640- CCTACTTATATATATATATATATATGGCAAAAACC-PH	TIBMOLBIOL
Probe A (20 μM)	5'-CTTTGCTCCTGCCAGAGGTTTCGCCCT-FL	TIBMOLBIOL

Genski analizator LightCycler

5.5. POSTUPAK UMJERAVANJA

Kao referentni materijal upotrebljava se pozitivna kontrola (u ovom slučaju heterozigot) i negativna (vodena) kontrola. Da bi pretraga bila valjana, pozitivna kontrola mora biti proglašena pozitivnom, a negativna kontrola mora biti bez znakova kontaminacije.

5.6. FAZE POSTUPKA

I. Prednalitička faza

II. Analitička faza

Sastojci reakcijske smjese (20 µl)		
Mix:	Volumen [µl]	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
ddH ₂ O LC- Fast Start DNA Master Hyb probe-H ₂ O	10,0	/
Fast Start DNA Master Hyb probe-MgCl ₂	3,2	3,0 mM
GIL-1 (10 µM)	1,0	0,5 µM
GIL-2 (10 µM)	1,0	0,5 µM
Senzor proba	0,4	0,04 µM
Anhor proba	0,4	0,04 µM
LC-Fast Start DNA Master Hyb probe-MIX ENZIME	2,0	
DNA	2,0	/

Nakon dodavanja DNA uzorka u PCR reakcijsku smjesu, tubice se stavljaju u LightCycler na program koji odgovara navedenoj pretrazi.

LC-program:

Hold		45 ciklusa		Krivulja taljenja	
95°C	600 sec	95°C	10 sec	95°C	30 sec
		54°C	20 sec	48°C	30 sec
		72°C	9 sec	na 95°C	uz 0,1°C

III. Poslijeanalitička faza

Za eventualnu potrebu ponavljanja ispitivanja ili dodatne analize materijala, DNA se pohranjuje u TE puferu na +4 °C ili -20 °C u apsolutnom etanolu. Na taj način se čuva godinama u Hladnoj komori.

5.7. NAČELO POSTUPKA ZA IZRAČUNAVANJE REZULTATA

Analizom krivulje taljenja na instrumentu LightCycler tvrtke Roche Diagnostics, korištenjem fluorescentno obilježenih proba.

5.8. BIOLOŠKI REFERENTNI INTERVALI

Preporučeni genotip: zdravi homozigot- točka taljenja je na 56 °C.

5.9. INTERVAL IZVJEŠTAVANJA REZULTATA

	Točke taljenja
homozigoti	56 °C
heterozigoti	59 °C i 56 °C
bolesni homozigoti	59 °C

5.10. LABORATORIJSKO TUMAČENJE

Gilbertov sindrom (GS) je nasljedna benigna nekonjugirana hiperbilirubinemija. Nasljeđuje se autosomno-recesivno, uz par zabilježenih slučajeva heterozigota. Patogeneza Gilbertovog sindroma je karakterizirana sa 70-80% smanjenom aktivnošću enzima uridin-difosfat-glukuronoziltransferaze izoforme 1A1 (UGT1A1). UGT1A1 je neophodan za konjugaciju bilirubina čime ga čini topljivim u vodi. Smanjena aktivnost UGT1A1 enzima je posljedica mutacije gena UGT1A1 na 2. kromosomu. Većina osoba s Gilbertovim sindromom (80-100%) ima polimorfizam, odnosno inserciju TA dinukleotida u promotorskoj regiji gena *UGT1A1* na oba alela. Alel s insercijom TA dinukleotida se označava UGT1A1*28. I povezan je sa smanjenom ekspresijom gena *UGT1A1* koja dovodi do manjka UGT1A1 enzima.

6. REZULTATI

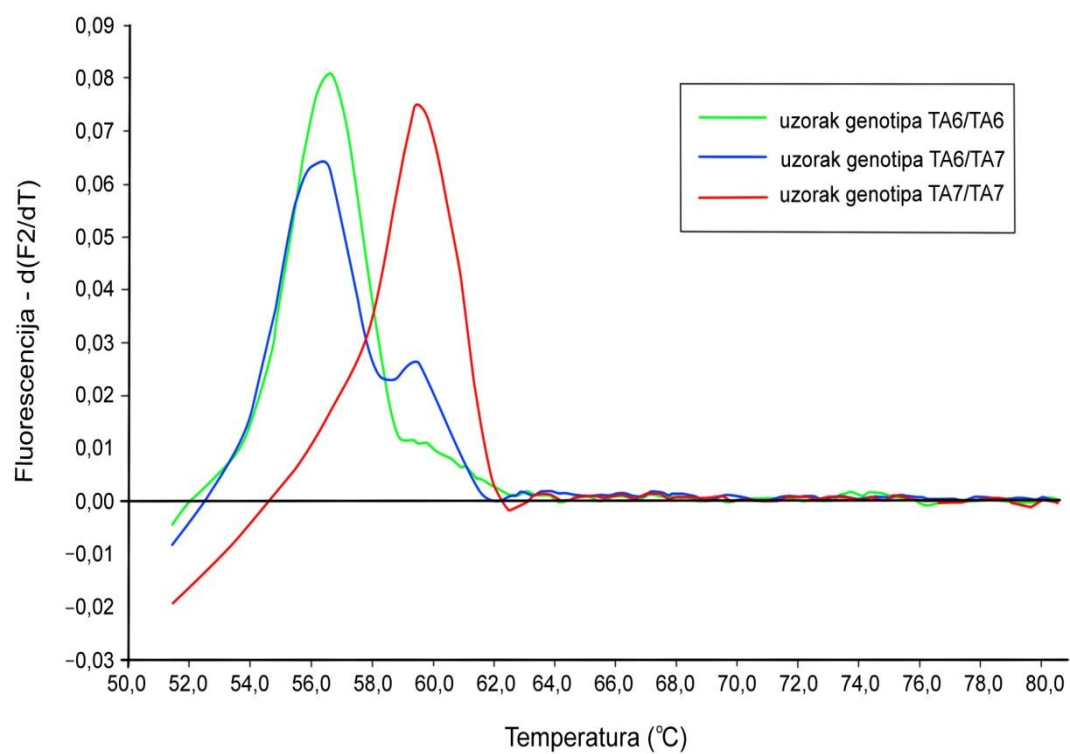
U razdoblju od siječnja 2003.godine do srpnja 2012.godine na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, testirano je 1091 osoba na mutaciju *UGT1A1* gena. Rezultati testiranja su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Apsolutne i relativne frekvencije genotipova *UGT1A1* mutacije u ispitivanom uzorku

Genotip	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija
6/6	136	12%
6/7	254	24%
7/7	701	64%
UKUPNO	1091	100%

Kao što je vidljivo iz tablice, u ukupnom uzorku utvrđena su sva tri genotipa. Divlji tip genotipa predstavlja TA6/TA6 i nađen je u osoba bez insercije TA dinukleotida. Heterozigoti su osobe s TA6/TA7 genotipom i oni u većini slučajeva neće razviti hiperbilirubinemiju. Genotip TA7/TA7 označava inserciju TA dinukleotida u promotorskoj regiji *UGT1A1* gena koju imaju oboljele osobe.

U ispitivanom uzorku relativna frekvencija TA6/TA6 genotipa je 12%. Relativna frekvencija TA6/TA7 genotipa je 24%, a TA7/TA7 genotipa 64%.



Slika 3. Rezultati metode PCR u stvarnom vremenu za genotipizaciju gena *UGT1A1*. (polimorfizam *UGT1A1**28) (genotipizacija provedena u KZLD KBC-a Zagreb)

7. RASPRAVA

Većina pacijenata s Gilbertovim sindromom nema nikakvih kliničkih simptoma, stoga se dijagnoza postavlja na osnovu kontinuiranog praćenja laboratorijskih nalaza u kojima se nalaze povećane vrijednosti nekonjugiranog bilirubina. Molekularnom dijagnostikom potvrđujemo dijagnozu.

Razješnjenje molekularne osnove Gilbertovog sindroma uslijedilo je 1995. godine istraživanjima Bosme i sur. te Monaghama i sur. (Bosma et al. 1995; Monaghan et al. 1996). Kodirajuća regija u osoba s Gilbertovim sindromom, je strukturalno normalna, a ustanovljene promjene se odnose na inserciju TA dinukleotida u promotorsku regiju *UGT1A1* gena (Nowicki i Poley 1998).

Genetskom analizom krvnih uzoraka 1091 osoba, provedenom na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u razdoblju od siječnja 2002. godine do srpnja 2012. godine, utvrdili smo frekvencije genotipa *UGT1A1* gena. Rezultati su pokazali da većina osoba s Gilbertovim sindromom imaju TA7/TA7 genotip.

Oni predstavljaju oboljele osobe s insercijom TA dinukleotida u promotorskoj regiji *UGT1A1* gena. U ovom istraživanju relativna frekvencija oboljelih je činila 64%. Iako je Gilbertov sindrom autosomno-recesivna bolest zabilježeno je nekoliko slučajeva bolesti i kod heterozigota, tj. osoba s TA6/TA7 genotipom. Kod heterozigotnih osoba najčešće ne dolazi do razvoja hiperbilirubinemije. Naše istraživanje je pokazalo da je relativna frekvencija heterozigota 24%. Najmanju relativnu frekvenciju od 12% su imale zdrave osobe sa divljim TA6/TA6 genotipom (Sertić et al. 2015).

Neki autori smatraju kako polimorfizam promotorske regije *UGT1A1* gena predstavlja znatnu evolucijsku prednost. Naime, dokazano je da bilirubin ima antioksidativna svojstva, a u Gilbertovom sindromu se nalazi u dovoljno malim koncentracijama da ne izazove oštećenje mozga (Beutler E. et al., 1998; Strassburg CP. et al. 2000).

8. ZAKLJUČAK

Gilbertov sindrom je autosomno recesivna bolest s gotovo asimptomatskom kliničkom slikom, povišenim vrijednostima nekonjugiranog bilirubina u krvi, te dugotrajnim i benignim tijekomom.

Klinička slika Gilbertova sindroma se razvija tijekom puberteta i karakterizirana je intermitentnim epizodama blage žutice, no većina pacijenata nema nikakvih simptoma.

Molekularna osnova bolesti leži u mutaciji *UGT1A1* gena koja rezultira manjkom enzima uridin difosfat glukuronil transferaze (UGT1A1 enzim), koja konjugira slobodni bilirubin u topljivi produkt. Mutacija UGT1A1 gena je uzrokovana umetanjem TA dinukleotida u njegovu promotorsku regiju. Osobe s mutacijom na oba alela predstavljaju bolesne homozigote za Gilbertov sindrom. Zdrave osobe imaju genotip TA6/TA6 koji se još naziva divlji genotip.

Istraživanje učestalosti frekvencije genotipa za Gilbertov sindrom je pokazalo da osobe s TA7/TA7 genotipom čine najveći udio u ukupnom broju oboljelih pacijenata. U ovom istraživanju njihova relativna frekvencija je iznosila 64%. Postotak homozigota od 64% je puno veći od postotka homozigota u Europi gdje iznosi 12.4%. Heterozigoti s TA6/TA7 genotipom su imali relativnu frekvenciju od 24% što je u usporedbi sa ispitanicima u Europi skoro pola manje. U Europi relativna frekvencija heterozigota iznosi 45%. Osobe s TA6/TA6 genotipom su imale najmanji postotak u ukupnom broju ispitanika, s relativnom frekvencijom od 12%. Ispitanici s divljim genotipom u ovom istraživanju su imale puno manji postotak u usporedbi s ispitanicima u Europi gdje on iznosi 43%.

9. ZAHVALE

Ovim putem se iskreno zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Jadranki Sertić na pristupačnosti, uloženom trudu i vremenu. Ustupila mi je potrebnu literaturu i dokumentaciju iz baze podataka Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, te pružila brojne korisne savjete kao bi ovaj diplomski rad bio što uspješnije napisan. Također joj se zahvaljujem što je posvetila puno vremena odgovarajući na sve moje upite i nejasnoće.

Želim se zahvaliti svima koji su me podupirali tijekom pisanja ovog rada, a pogotovo mojoj obitelji koja mi je oduvijek bila velika podrška.

10. POPIS LITERATURE

- Adegoke OJ, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Breyer J, Smith J et al. (2004) Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 85:239-245.
- Akaba K, Kimura T, Sasaki A, Tanabe S, Ikegami T, Hashimoto M et al. (1998) Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese. *Biochem Mol Biol Int* 46:21-26.
- Andreis I (2005) Eritrociti. *Patofiziologija Zagreb: Medicinska naklada* 772-783.
- Barbarino JM, Haidar EC, Klein TE, Altman RB (2014) PharmGKB Summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. *Pharmacogenet Genomics* 24(3):177-183.
- Bacsikai BJ, Skoch J, Hickey GA, Allen R, Hyman BT (2003) Fluorescence resonance energy transfer determination using multiphoton fluorescence lifetime in microscopy to characterize amyloid-beta plaques. *Journal of Biomedical Optics* 8(3):368-375.
- Jurčić Z (2002) Prolongirani ikterus na prsima i Gilbertov sindrom (GS): uzročna veza. *Pediatr Croat* 46 (Suppl 3):117.
- Bajro MH, Josifovski T, Panovski M, Jankulovski N, Nestorovska AK, Matevska N et al. (2012) Promoter length polymorphism in UGT1A1 and the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet* 205:163-167.
- Bellemare J, Rouleau M, Girard H, Harvey M, Guillemette C. (2010) Modulation of the human glucuronosyltransferase UGT1A pathway by splice isoforms polypeptides is mediated through protein-protein interactions. *J Biol Chem* 285:3600-3607.
- Beutler E, Gelbart T, Demina A (1998) Racial variability in UDP-glucuronosyltransferase 1 in promoter, A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8170-8174.
- Biondi ML, Turri O, Dillillo D, Stival G, Guagnellini E (1999) Contribution of the TATA box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentration in the Italian population *Clin Chem* 45:897-898.
- Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R (2000) Molecular Diagnosis of a Familial Nonhemolytic Hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in Healthy Subjects. *Hepatology* 32:792-795.
- Bosma PJ. Inherited disorder of bilirubin metabolism (2003) *J Hepatol* 38: 107-17
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B et al. (1994) Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-17964.

- Bosma PJ, Chowdhury J, Bakker C et al (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *N Eng J Med* 333:1171-1175.
- Boyd MA, Strasuebku P, Ruxrungtham K, Mackenzie PI, Uchaipichat V, Stek M et al. (2006) Relationship between hyperbilirubinemia and UDP glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism in adult HIV-infected Thai patients treated with indinavir. *Pharmacogenet Genomics* 16:321-329.
- Brown AK, Kim MH, Wu PY, Bryla DA (1985) *Pediatrics* 75:393-400.
- Burchell B, Hume R (1999) Molecular genetic basis of Gilbert syndrome *J Gastroenterol Hepatol* 14:960-6.
- Chen YH, Hung SC, Tarng DC (2011) Serum bilirubin links UGT1A1*28 polymorphism and predict long-term cardiovascular events and mortality in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:567-574.
- Chowdhury RJ, Wolkoff AW, Roy Chowdhury N, Arias IM (2000) Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: *The metabolic bases of inherited disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. Mc Graw Hill, New York St. Louis 3063-111.
- Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Classidy A, Boxer M, Hume R, Burchell B (1997) Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinemias. *Clin Chim Acta* 266:63-74.
- Desai AA, Innocenti F, Ratain Mj (2003) UGT pharmacogenetics: implications for cancer risk and cancer therapeutics. *Pharmacogenetics* 13(8):517:23.
- Ellis E, Wagner M, Lammert F et al. (2006) Successful treatment of severe unconjugated hyperbilirubinemia via induction of UGT1A1 by rifampicin. *J Hepatol* 44:243-245.
- Erdil A, Kadayifci A, Ates Y, Bagci S, Uygun A, Dagalp K (2000) Rifampicin test in the diagnosis of Gilbert's syndrome. *Int J Clin Pract* 55:81-83.
- Fang JL, Beland FA, Doerge DR, Wiener D, Guillemette C, Marques MM et al. (2002) Characterization of benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol glucuronidation by human tissue microsomes and over expressed UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Cancer Res* 62:1978-1986.
- Ficher AF, Nakamura H, Uetani Y, Vreman HJ, Stevenson DK (1988) *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7:27-29.
- Fernandez Salazar MJ, Remacha Sevilla A, Baiget Bastus M (2000) Variability in the UGT-1 gene promoter in Gilbert syndrome *Med Clin* 115:540-544.
- Gamulin S. Poremećaj metabolizma bjelančevina (2005) *Patofiziologija*. Zagreb: Medicinska naklada 197-203.
- Gilbert A, Lereboullet P (1901) La cholemie simple familiale. *Semaine Medicine* 21:241-243.

Girard H, Levesque E, Bellemere J, Jounalt K, Caillier B, Guillemette C (2007) Genetic diversity of UGT1 locus is amplified by a novel 3'alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. *Pharmacogenet Genomics* 17:1077-1089.

Gong QH, Cho JW, Huang T et al. (2011) Thirteen UDP-glucuronosyltransferase are encoded at human UGT1 gene locus. *Pharmacogenetics* 11:357-68.. *Medicinska naklada Zagreb* 797-803.

Gourley GR. (1994) Disorders of bilirubin metabolism. Mosby St.Louis 401-13.

Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE (2000) Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Res* 60:950-956.

Guyton AC, Hall JE (2003) *Jetra kao organ*. *Medicinska fiziologija*

Hall D, Ybazeta G, Destro-Bisol G, Peltzl-Erler ML, Di Rienzo A (1999) Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human population and primates. *Pharmacogenetics* 9:591-599.

Harrison TR i suradnici (1950) *Harrison's Principles of Internal Medicine*

Horiguchi T, Bauer C (1975) *Am J Obstet Gynecol* 121:71-74.

Innocenti F, Udenia SD, Iyer L, Cher PX, Das S, Kocherginsky SM, Karinom T, Janisch L, Ramrez J, Rudin CM, Vokes EE, Rekin MJ (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22:1382-1388.

Iyer L, King, CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, Coffman BL, Ratain MJ (1998) Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11): role of uridin diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 101: 847-854.

James RE, Lukanova A, Dossus L, Becker S, Rinaldi S, Tjonneland A et al. (2011) Postmenopausal serums ex steroids and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a nested case-control study. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:1626-1635.

Jansen PML (1999) Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome type 1. *Eur J Pediatr* 158(Suppl 2):89-94.

Jansen PML, Ronald PJ, Elifernik O (1988) Hereditary hyperbilirubinaemia: a molecular and mechanistic approach. *Semin Liv Dis* 168-178.

Jurčić Z (2002) Prolongirani ikterus na prsima i Gilbertov sindrom (GS): uzročna veza. *Pediatr Croat* 46 (Suppl 3):117.

- Jurčić Z, Žaja Franulić O, Štefanović M (2006) Nasljedne nekonjugirane hiperbilirubinemije. *Pediatric Croat* 50 (Supl 1):112-121..
- Kadacol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR (2000) Genetic lesion of bilirubin uridine.diphosphoglucoronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: coleration of genotypeto phenotype. *Human Mutation* 16: 297-306.
- Kotal P, Vitek L, Fevery J (1996) Fasting-related hyperbilirubinemia in rats: the effect of decreased intestinal motility. *Gastroenterology* 111:217-223.
- Kumral A, Genc S, genc K, Duman N, Tatli M, Sakizli M, Ozkan H.(2005) Hyperbilirubinemic serum is cytotoxic and induces apoptosis in murine astrocytes. *Biol Neonate* 87:99-104.
- Le Bihan-Levaufre B, Francoual J, Labrune J, Chalas L, Chapel A (2001) Mise au point et interet du diagnostic de la maldie de Gilbert par biologie moleculaire. *Ann Biolog Clin* 59:61-66.
- Lin JP, Vitek L, Schwertner HA (2010) Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentracions as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem* 56:1535-1543.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15(10):677-685.
- Madhavan M, Watigney WA, Srinivasan SR, Berenson GS (1997) Atherosclerosis. 131:107-113.
- Maines MD (1997) The heme oxgenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:517-554.
- Manitto P, Monti D, Garbagnati E (1984) pH dependence of the water solubility of bilirubin photo-derivates and its relevance to phototherapy. *Pediatr Res* 18:378-381.
- Manoulio TA, Burke GL,Savage PJ, Jacobs DRJ, Sidney S, Wagenknecht LE, Allman RM, Tracy RP (1992) *Clin Chem* 38:1853-1859.
- Mardešić D (2003) *Pedijatrija*. Sedmo dopunjeno izdanje. Zagreb: Školska knjiga
- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M (1999) Association of neonatal hyperbilirubinemiawith bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 103:1224-1227.
- Mitrović D, Zdravković R, Đorđević J, Ćirić D, Miletić E, Bogoslović M, Mladenović M, Milović N, Živulović A, Zlatković A (2013) Žilbertov sindrom kod pacijenta školskog uzrasta,prikaz slučaja. ISSN 035-2899, 38(2013) br.2 p. 100-103.

- Monaghan G, McLellan A, Gehaan A et al. (1999) Gilbert's syndrome in contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 134:441-446.
- Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B (1996) Genetic variation in bilirubin UDPglucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 347:578-581.
- Nowicki MJ, Poley JR (1998) The hereditary hyperbilirubinemics. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 12: 355-66.
- Okolicsanyi L, Nassuato G, Muracca M et al. (1988) Epidemiology of unconjugated hyperbilirubinaemia: revised. *Semin Liv Dis* 8: 179-82.
- Onoue M, Terada T, Kobayashi M, Katsura T, Matsumoto S, Yanagihara K et al. (2009) UGT1A1*6 polymorphism is the most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. *Int J Clin Oncol* 14(2):136-142.
- Ostaneck B, Furlan D, Mavec T, Lukac-Bajalo J (2006) UGT1A (TA)_n promoter polymorphism- A new case of a (TA)_n allele in Caucasians. *Blood Cells Mol Diseases* doi:10.1016/j.bcmed.2006.10.160
- Ostrow JD, Tiribelli C (2003) Bilirubin, a curse and a boon. *Gut* 52:1668-1670.
- Popović Z, Kovač Z (2005) Poremećaj acidobazne ravnoteže. *Patofiziologija Zagreb: Medicinska naklada*, 2005:322-325.
- Pollock BA, Heim R (1999) Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* 9(2):57-60.
- Reiner Ž, Kovač Z (2005) Poremećaji metaboličke funkcije jetre. *Patofiziologija Zagreb: Medicinska naklada* 997-1005.
- Riedmaier S, Klein K, Hofmann U, Keskitalo JE, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M, Zanger UM (2010) UDP-glucuronosyltransferase (UGT) polymorphisms affect atorvastatin lactonization in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 87(1):65-73.
- Ritter JK, Chen F, Sheen YY et al. (1992) A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol and others UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 267: 3257-61..
- Sampietro M, Iolascon A (1999) Molecular pathology of Crigler-Najjar type 1 and 2 and Gilbert syndromes. *Hematologica* 85:150-157
- Schmid R (1995) Gilbert syndrome – a legitimate genetic anomaly. *New Eng J Med* 333: 1217-8.
- Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH (2009) Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *106(13): 5171-5176.*

- Sertić J i suradnici (2015) Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada Zagreb
- Sieg A, Arab L, Schlierf G, Stichl A, Kommel B (1987) Prevalence of Gilbert syndrome in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 112 (31-32):1206-1268.
- Sneitz N, Bakker CT, de Knegt RJ, Halley DJ, Finel M, Bosma PJ (2010) Crigler-Najjar in the Netherla: identification of four novel lnds UGT1A1 alleles, genotype-phenotype correlation, and functional analysis of 10 missense mutants. *Huma Mutat* 31:52-59.
- Strassburg CP, Manns MP. Jaundice, genes and promoters (2000) *J Hepatol* 33:476-479.
- Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH (1998) Expression of UDP-glucunosltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 273(15): 8719-26.
- Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K et al. (2002) Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem Byophys Res Commun* 292:492-497.
- Te Morche RHM, Zusterzeel PML, Raijmakers MTM et al. (2001) Polymorphism in the promotor region of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (Gilbert syndrome) in healthy Dutch subject. *Hepatology* 33:765.
- Tribelli C, Brites D, Cekić D (2002) Poremećaji metabolizma bilirubina. 1077-1090.
- Tukey RH, Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferase: metabolism, expression and disease. *Ann Rev Pharmacol* 40:581-616.
- Tzetis M, Tsezou A, Tzetis M et al. (2000) Gilbert syndrome: analysis of the promoter region of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1 gene in the Greek population. *Eur J Pediatr* 159:873-874.
- Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B (2008) *Interna medicina*.
- Vucelić B (2005) Poremećaj metabolizma bilirubina i patogeneza žutice. *Patofiziologija Zagreb: Medicinska naklada* 1002-1005.
- Yamamoto K, Sato H, Fijuyama Y, DoidaY, Bamba T (1998) Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of bilirubin UDP-glycosyltransferase (*UGT1A1*) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type 2. *Biochim Biophys Acta* 1406:267-273.
- Yamauchi Y, Yamanouchi I (1989) *Acta Pediatr* 31:65-72.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Campanale K, Jones DR, Hall SD et al. (2002) Differential modulation of the UDP glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*)-catalyzed estradiol 3 glucuronidation by the addition of *UGT1A1* substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metabol Dispos* 30:1266-1273.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 23. ožujka 1991. godine. Prvi i drugi razred osnovne škole sam pohađala u Sesvetama u OŠ Badel. U trećem razredu osnovne škole sam se preselila u Dubravu i nastavila svoje školovanje u OŠ Žuti brijeg. Završila sam srednju školu MIOC, odnosno XV. Gimnaziju. U trećem razredu osnovne škole sam počela trenirati košarku, kojom se i danas aktivno bavim. 2007. godine sam pozvana u košarkašku reprezentaciju Hrvatske u kojoj sam bila do druge godine Medicinskog fakulteta. Osvojila sam brojna košarkaška natjecanja sa srednjom školom, uključujući 1. mjesto u Zagrebu i 2. mjesto u državi.

Medicinski fakultet sam upisala 2009. godine. Tijekom fakulteta sam se pridružila košarkškoj sekciji fakulteta koja je bila jako uspješna, rezultirajući medaljom svake godine. U isto vrijeme sam se pridružila Sveučilisnoj reprezentaciji Hrvatske, čiji sam član i danas. Tijekom srednjoškolskog i fakultetskog obrazovanja pohađala sam tečajeve talijanskog, ruskog, španjolskog, engleskog i francuskog jezika. Prije dvije godine sam završila prvi stupanj znakovnog jezika. Nakon završetka treće godine fakulteta počela sam raditi kao demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, a istu funkciju obavljam i danas. Na četvrtoj godini fakulteta sam upisala standardne plesove, a odnedavno plešem salsu i bachatu.