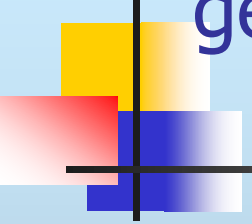
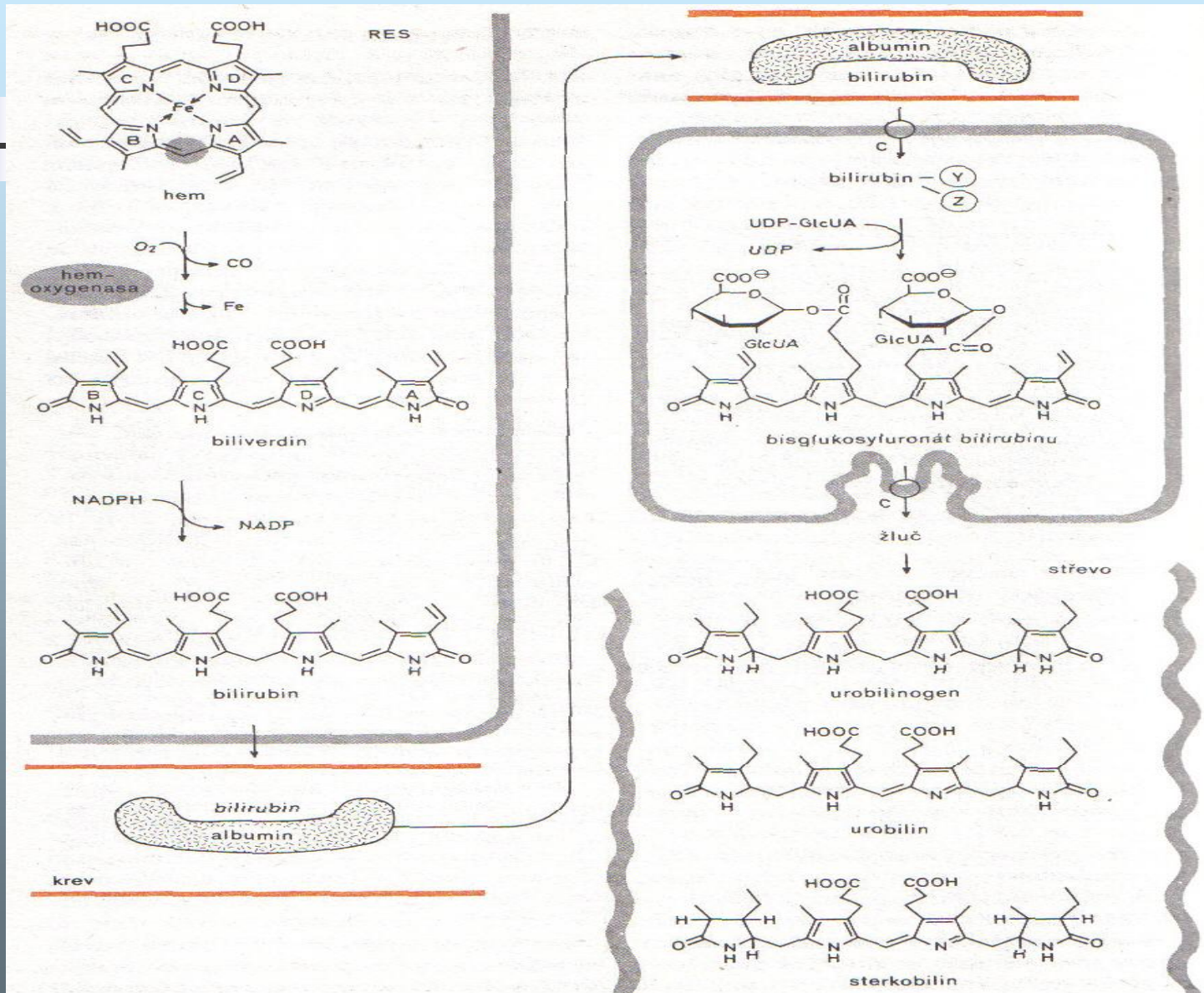


Gilbertov syndróm (GS) – molekulárno-genetické, biochemické aspekty a výskyt v SR



- Chandoga J; Petrovič R; Futas J; Hlinšťáková S; Boča M.
 1. Centrum lekárske genetiky FNsP BA
 2. II. Interná klinika LF UK, FNsP BA
 3. I. Interná klinika LF UK, FNsP BA

Metabolizmus bilirubínu





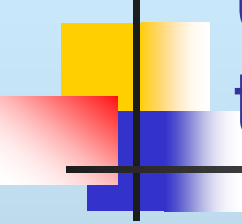
Bilirubín – funkcia a toxický efekt

- - scavenger voľných radikálov
- - významný antioxidant neonatálneho obdobia
- - inhibítor peroxidácie lipidov
- - inhibuje syntézu DNA, RNA, proteínov
- - inhibítor enzýmov – proteínkináz
- - uncoupling faktor OXPOS
- Toxický efekt je blokovaný albumínom s hornou hranicou bezpečnosti TSB-340 $\mu\text{mol/l}$; vyššie hodnoty vedú k encephalopatii - KERNIKTERUS



Superrodina UGT

- skupina nezávisle regulovaných génov s aktivitou UDP-glukuronozyltransferázy (UGT1A; UGT2A)
- UGT1A: lokalizácia 2q37, 500 kb génový lokus s 5 exónmi
- exón 2,3,4,5 kóduje C-terminálnu doménu zodpovednú za väzbu UDP-glukuronátu
- exón 1 kóduje 13 N-terminálnych variabilných domén, z čoho len 9 je funkčných, ktoré zodpovedajú za väzbu aglykonu a substrátovú špecificitu (1A-1,2,3,4,5,6,7,9,10); sú tu lokalizované rozdielne promótory a C-EBP sekvencie ovplyvňujúce génovú exprésiu
- napr. 1-A-1 podmieňuje glukuronidáciu bilirubínu a clofibrát stimuluje REs promótoru; 1-A-6 sa uplatňuje pri metabolizme fenolov



UGT1A1-bilirubín-UDPglukuronozyl-transferáza

- jediný špecifický enzým u ľudí, katalyzujúci glukuronidáciu bilirubínu na mono a diglukuronid (90% Bi-diG; 7% Bi-monoG; 4% Bi-non-conj.)
- promótor UGT1A1 (186bp) obsahuje TATA box s rôznym počtom TA sekvencií – A(TA)_nTAA n=5 až 8
A(TA)₆TAA – wild type; A(TA)₇TAA – Gilbert variant
- prevalencia v %: (TA)₅ < 1,0; (TA)₆ - 65; (TA)₇ - 35
výnimočne (TA)₈ v EU a USA
- nízka frekvencia (TA)₇ vo východnej Ázii – 12 –15 %
- gén obsahuje PBREM(fenobarb.enhancer resp.modul)



Hyperbilirubinémia-ikterus

- sérový celkový bilirubín(TSB) -17 $\mu\text{mol/l}$ – horná hranica referenčného intervalu (OKB FNŠP do 20 $\mu\text{mol/l}$)
- TSB viac ako 50 $\mu\text{mol/l}$ – ikterus

- GENETICKY PODMIENENÝ IKTERUS
- 1.Crigler-Najjar syndróm – I;II
- 2.Gilbertov syndróm
- 3.Neonátalný ikterus
- 4.Dubin-Johnson
- 5.Rotorov syndróm
- deficiencia bilirubín-UDP-glukuronozyltransferázy u 1., 2. a 3. so špecifickým biochemickým nálezom u bilirubínových foriem

Hyperbilirubinémie podmienené absenciou alebo deficienciou aktivít UGT1A1 - dif.dg.

	CN1	CN2	GS
■ TSB(umol/l)	340-850	<340 *	<50**
■ žlč	BNC	BMG	BMG
■ UDPGT enz.	0	↓ ↓	↓
■ Fenobarbitál	0	↓	↓

- *120 až 340; **17 až 100 (fluktujúca HPBi)
- CN1- delécie, inzercie, missense mutácie, predčasné stop kodóny v ktoromkoľvek z 5-tich exónov, mutácie v exóne 2-5 sú mimoriadne závažné – úplné zlyhanie glukuronidačných funkcií
- CN2 - bodové missense mutácie s reziduálnou aktivitou UGT1A1 a indukciou po fenobarbituráte a clofibráte
- GS – približne 30% zostatkových aktivít enzýmu



Gilbertov syndróm (GS)

- 1901 Gilbert - familiárny nonhemolytický ikterus
- GS - benigná nekonjugovaná hyperbilirubinémia
 - icterus intermittens juvenilis
 - hereditárna nehemolytická hyperbilirubinémia

Výskyt: 4 až 7 % populácie s TSB $>20 \mu\text{mol/l}$, viac je postihnutých mužov (až 12%) ; po 24 hod. hladovaní resp. kalorickej restrikcii dochádza k zvýšeniu TSB ($25\text{-}50 \mu\text{mol/l}$) pričom „ pečeňové testy„ nie sú zvýšené

Diagnostika: náhodne so zvýšením TSB pri infekcii, strese, po hladovaní a námahe; cielená dif.dg. zahrňuje biochemické vyšetrenia, hladový alebo fenobarbiturátový test; pri suspektom náleze je indikované molekulárno-genetické vyšetrenie TATA boxu UGT1A1



GS a polymorfizmus UGT1A1

- 1. A(TA)₇TAA inzercia TA v promótoře
UGT1A1*28 (0,30–0,36 EU + USA; 0,11 Jap.)
- 2. G71R (0,0 EU; 0,16 Jap; 0,23 Čína) v exóne 1
- 3. T-3279G (0,26 Jap., Čína, Nem.) v PBREM

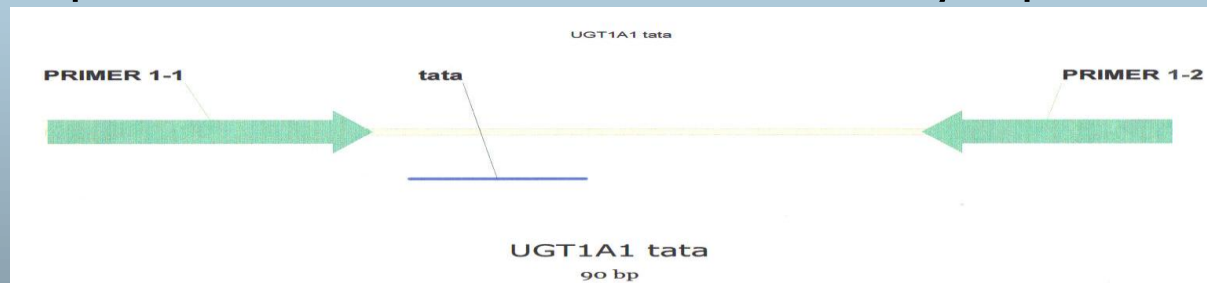
pacienti homozygotní pre (TA)₇ alebo homozygotní pre G71R sa považujú za tzv. Gilbertov genotyp

v európskej populácii 9 až 16% je homozygotov pre (TA)₇ v Japonsku iba 3%

v európskej populácii G71R mutácia je raritná, vo východnej Ázii je až 7% homozygotov

Materiál a metódy

- Izolácia DNA: kolónková izolácia kitom MN NucleoSpin Blood – mini s 0,2 ml krvi v EDTA
- PCR amplifikácia: PCR s fluorescenčne značeným primerom

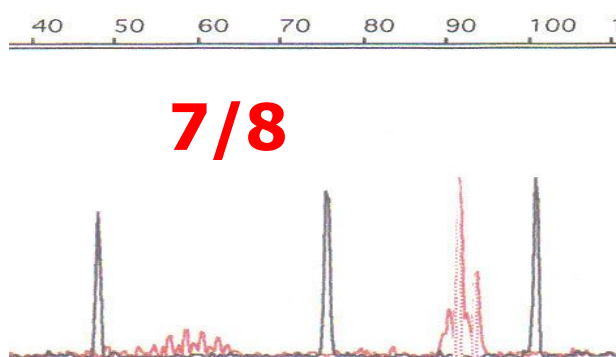
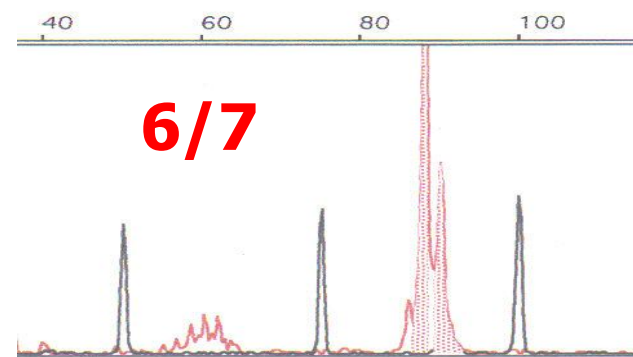
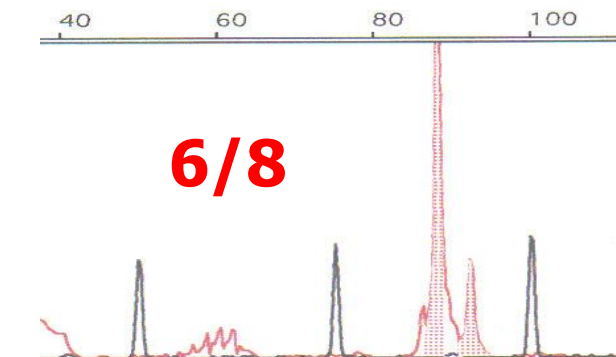
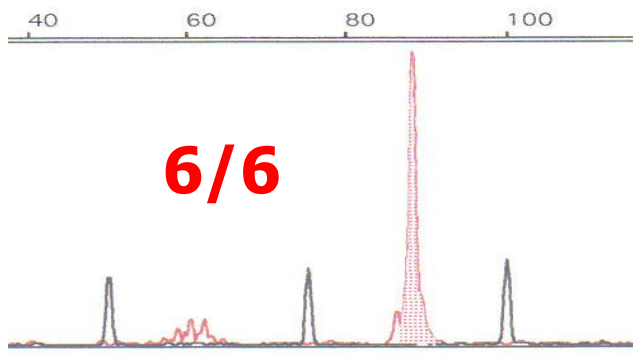
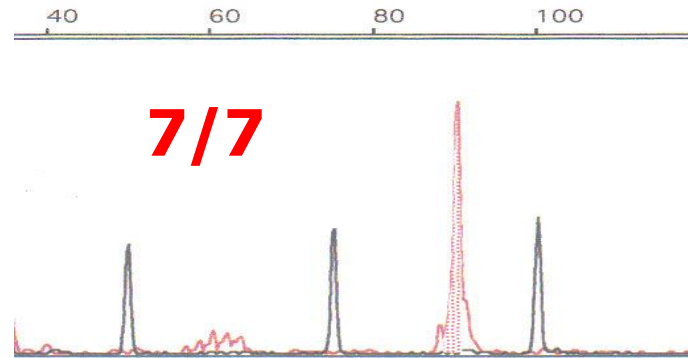
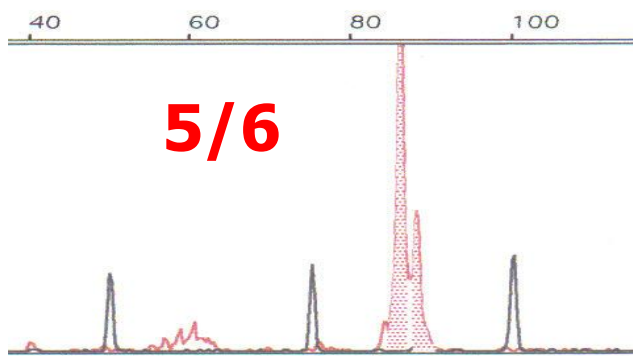


UGT1A1 tata

1 TAAC TTGGTG TATCGATTGG TTTTGGCCAT ATATATATAT ATAAGTAGGA GAGGGCGAAC CTCTGGCAGG AGCAAAGGCG CCATGGCTGT
ATTGAACCAC ATAGCTAACC AAAAACGGTA TATATATATA TATTCATCCT CTCCCGCTG GAGACCGTCC TCGTTTCCGC GGTACCGACA

- Fragmentačná analýza: na genetickom analyzátoře ABI PRISM 310

Chromatogramy z fragmentačnej analýzy



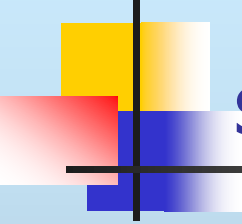


Pečeňový biochemický súbor u kontrol a GS genotypu

parameter	kontrola n=45	Gilbert n=46	p
TSB	10,5 ± 5,9	36,1 ± 15,1	<0,05
AST	0,51 ± 0,23	0,42 ± 0,16	<0,05
ALT	0,51 ± 0,43	0,40 ± 0,17	>0,05
GGT	0,74 ± 1,09	0,44 ± 0,36	<0,05

hodnoty sú vyjadrené v AP ± SD ($\mu\text{mol/l}$; $\mu\text{kat/l}$)

pozn. kontroly iba TA6/6 a TA6/7; Gilbert iba TA7/7



Frekvencia genotypov u kontrolného súboru a s GS biochemickým fenotypom

■ genotyp	TA7/7	TA7/6	TA6/6	TA8/6	TA6/5
kontrola (%)	10	44	41	3	1
n=59					
GS-fenotyp (%)	82	11	6	0	0
n=100					
Frekvencia (%)	16	40	44		
TSB-umol/l (AP±SD)	25±15,9	9,6 ±3,9	7,7±2,9		

Biondi M.L. et al. Clin.Chem. 1999, 45, 897-898



DNA diagnostika pri GS za a proti

- biochemická diagnostika: TSB,SCB,AST,ALT,GGT,AP
+ iné : 100 –200 Sk
- diagnostika GS je postavená na náleze hyperbilirubinémie bez hemolýzy, na fyziologických hodnotách parametrov pečeneňového súboru a vylúčení iných príčin hyperbilirubinémie
- pri biochemickej diagnostike stále chýba pozitívny dôkaz a pretrváva diagnostická neistota, zvlášť ak sú u pacienta prítomné aj iné symptómy resp. nie je fyziologický lab.nález; vyslovené podozrenie na hepatopatiu vyžaduje funkčné testy, krajne biopsiu; diagnostická neistota – podozrenie na závažnejšiu pečeneňovú patológiu má vplyv na životospriavu, ovplyvňuje kvalitu života a môže viesť k indikácii ďalších nákladných vyšetrení, prípadne k zbytočnej farmakoterapii
- biochemická diagnostika je nevyhnutnou podmienkou pre indikovanie DNA vyšetrenia; vyžaduje však úpravu referenčných hodnôt na súbory s vylúčením TA7 homozygotov (15μmol/l ?)



DNA diagnostika pri GS za a proti

- DNA- diagnostika : izolácia+jedna z možných metód-DGLC, FA, RT-PCR: 800 – 1800 Sk
- na rozdiel od mnohých DNA vyšetrení (monogénové ochorenia) vyšetrenie neprináša definitívnu diagnózu a dg. GS nemôže byť postavená iba na tomto vyšetrení, nakoľko až 50% (TA)⁷ homozygotov nemá hyperbilirubinémiu; na druhej strane vylúčenie GS-genotypu poukazuje na závažnú príčinu ikteru hoci sa nedá vylúčiť iné závažné ochorenie i pri GS-genotype
- zistenie GS-genotypu zvyšuje predpoklad, že iná príčina hyperbilirubinémie je menej pravdepodobná
- určenie GS-genotypu je racionálnym dôvodom na zmenu životosprávy (neopodstatnená diéta, abusus alkoholu), zväženie antikoncepcie
- je cennou informáciou vo vzťahu k farmakoterapii a toxikológii



Záver

- Získané údaje ohľadom výskytu GS a frekvencie (TA)₇ polymorfizmu v SR sú v zhode s údajmi, týkajúcimi sa Kaukazoidnej populácie.
- Analogické údaje boli získané vo vzťahu genotyp – biochemický fenotyp a budú vyžadovať korekciu referenčných hodnôt STB v zmysle zníženia hornej hranice, čo môže viesť k zvýšeniu počtu indikovaných pacientov na DNA vyšetrenia.
- Je riešenie aplikácia metód, ktoré znížia cenu vyšetrenia alebo obmedziť vyšetrenia ?



Záver-pokračovanie

- Zhodnotenie prínosu DNA vyšetrenia u GS a vplyvu polymorfizmov na metabolizmus vyžaduje rozsiahlejšie štúdie.
- Zvlášť detailné štúdium je potrebné pre určenie vzťahu polymorfizmov k závažnosti a trvaniu neonatálneho ikteru.
- V SR chýba štúdia, ktorá by u GS-genotypov zhodnotila vplyv pohlavia, veku, výživy, fajčenia, abusu alkoholu na fenotypové prejavy.



Záver-pokračovanie

- Rozsiahlejšie štúdie sú potrebné na vyhodnotenie kombinácii polymorfizmov, v Európe zvlášť vzťahu (TA)7 a –T3263G na fenotypový prejav.
- Novou otvorenou oblasťou budú farmakogenetické štúdie, ktoré prehodnotia vplyv polymorfizmov UGT1A1 na metabolizmus farmák a ich odlišnú toxicitu.