

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija Lj. Vuković

VARIJANTE PROMOTORA GENA ZA
URIDIN-DIFOSFAT-GLUKURONIZILTRANSFERAZU 1A1
KAO MODULATORI BIOHEMIJSKOG FENOTIPA I
POPULACIONO FARMAKOGENETIČKI MARKERI

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija Lj. Vukovic

PROMOTER VARIANTS OF THE GENE FOR
URIDINE-DIPHOSPHATE-GLUCURONOSYLTRANSFERASE
1A1
AS MODULATORS OF BIOCHEMICAL PHENOTYPE AND
POPULATION PHARMACOGENETIC MARKERS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

- dr Branka Zukić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
- dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

- dr Branka Zukić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
- dr Svetlana Radović, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
- dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu,

Datum odbrane: _____

Stefanu i Katarini

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjerstvo u Beogradu.

Na dogotrajnom, mukotrpnom, uzbudljivom i neizvesnom putu nastanka ovog rada nailazila sam na brojne prepreke koje su nekada izgledale ogromne i nepremostive. Međutim, na svakoj od tih prepreka dočekivala me je moja dobra vila u liku predivne dr Sonje Pavlović. Sonja je svaki put sa znanjem, virtuoznošću i lakoćom uspevala da mi promeni percepciju i pokaže izlaz iz naizgled nerešivih situacija. Vođena njenim budnim i brižnim okom, dobrotom, strpljenjem i ljubaznošću dodjoh do kraja ovog puta. Zato duboku, iskrenu i doživotnu zahvalnost dugujem dr Sonji Pavlović za ukazano poverenje, za svu velikodušnost, pažnju i pomoć, jer bez nje ništa od svega ovoga ne bi bilo moguće. Naučila me je da odustajanje nije opcija i da, ma koliko da su koraci mali, postoji samo jedan pravac – NAPRED. Osim što sam dobila znanje na dar, dobila sam i najlepše lekcije iz ljudskosti i lepote darivanja i stvaranja. Nadam se da ću u životu biti u prilici da nastavim taj lanac dobrote.

Takođe zahvaljujem se mentorki dr Branki Zukić, na prijateljstvu i strpljenju, vremenu i jasnom i lakom vođenju prilikom izrade i pisanja ovog rada. Uvek je imala ideju više i ovaj rad je dobio svoju konačnu formu zahvaljujući Brankinom znanju i iskustvu.

Zahvaljujem se i svim članovima Laboratorije za molekularnu biomedicinu na nesebičnoj i svesrdnoj pomoći tokom mojih boravaka u laboratoriji. Dragi Vlado, Bojane i Nikola, hvala što nikada niste bili umorni i što ste uvek imali vremena da ispratite sve moje aktivnosti, sa vama je sve bilo lakše. Doro, hvala što si me u svakom trenutku znala zasmejati i oraspoložiti i podsetiti da je smeh najlepší začim svakog dana. Nataša hvala za pažnju i rukavice kad je pao sneg kad mu vreme nije ☺. Draga Tanja hvala za svako nezgodno pitanje kojim ste me podsećali i inspirisali na razmišljanje o tome gde sam i kuda idem. Divnoj Jovani veliko hvala što je u svakom trenutku imala nepogrešiv osećaj šta mi je potrebno i na nesebičnom deljenju informacija i znanja. Vesni, veliko hvala za pomoć u kriznoj situaciji. Hvala Aniti, Miši i Marini što su brinule i čuvale moj indeks, završavale sve administrativne poslove i spašavale me od nepotrebnih dolazaka u Beograd.

Zahvaljujem se i mojoj divnoj kumi Kiki na ljubavi i gostoprimstvu i što je žrtvovala svoje sunčane vikende i provodila ih sa mnom na Institutu dok sam završavala svoje eksperimente.

Bila je čast i neizmerno zadovoljstvo, makar i na ograničeno vreme biti deo vašeg sjajnog kolektiva. Hvala i svima onima koje nisam imenovala, a darovali su osmeh i dobro raspoloženje u prolazu. Svi zajedno ste učinili da se osećam kao kod kuće.

Takođe ceo ovaj projekat ne bi bio moguć i bez bezrezervne podrške mog supruga Dragana. Hvala ti što si uvek bio oslonac i što sam uvek bila sigurna da su deca u sigurnim rukama tokom mojih odsustvovanja. Moja porodica je uvek bila moja osnovna inspiracija i motivacija da idem napred i da ne odustanem. Hvala mojoj divnoj deci Stefanu i Katarini za strpljenje, za sve osmehe, ljubav i radost prilikom mojih povrataka.

Hvala mojoj mami za ljubav i podršku tokom mog školovanja i što me je naučila istrajnosti i upornosti.

Hvala mojoj velikoj porodici koja mi je u svakom trenutku pružala gostoprimstvo u Beogradu i koja me je bodrila i ohrabivala.

Hvala Darku Košpiću koji je, u teškom trenutku kada je izgledalo da ništa više nema smisla i kada sam bila na korak da odustanem od svega, uspeo da mi vrati veru u sebe i ubedi me da se vredi boriti.

Hvala mom kolektivu Odjeljenja za medicinsku genetiku za podršku i dobru radnu atmosferu, a naročito onima koji su verovali da će moj trud biti u korist celog kolektiva.

Na kraju hvala i onima koji su iz prikrajka posmatrali, bodrili, unapred se radovali i blanko verovali u mene.

Sva ljubav i podrška koju sam dobijala sa raznih strana me je obavezivala i inspirisala da dam svoje najbolje. Svaki osmeh i vaša radost su dovoljan razlog da izblede sećanja na sve teškoće i da u konačnici ovaj rad bude radošću obasjan.

Varijante promotora gena za uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu 1A1 kao modulatori biohemijskog fenotipa i populaciono farmakogenetički markeri

Rezime

Uvod Familija enzima uridin-difosfat-glukuronoziltransferaza (UGT) katalizuje glukuronidaciju širokog spektra endobiotika i ksenobiotika. UGT1 familija je kodirana genskim kompleksom *UGT1*, koji se sastoji od 13 proksimalnih varijabilnih egzona i od 4 zajednička distalna egzona. Alternativnom obradom nastaje više transkripata, među kojima je posebno značajan onaj čiji je produkt UGT1A1 enzim, koji učestvuje u metabolizmu bilirubina i mnogih lekova. Više od 60 varijanti je detektovano u *UGT1A1* genu, koje su povezane sa patološkim stanjima. Varijante u TATA boksu promotora *UGT1A* gena se razlikuje po broju TA ponovaka. Wild type *UGT1A1**1 sadrži 6 TA ponovaka (TA6), dok su varijante koje sadrže 5, 7 ili 8 TA ponovaka označene kao *UGT1A1**36 (TA5), *UGT1A1**28 (TA7) i *UGT1A1**37 (TA8). Transkripciona aktivnost promotora je manja što je veći broj ponovaka u odnosu na TA6.

Žilberov sindrom (ŽS) je često kliničko stanje koje karakteriše hiperbilirubinemija i ikterus. Uzrokovan je smanjenom aktivnošću UGT1A1 enzima. Najčešće detektovana varijanta koja se nalazi u osnovi ŽS je *UGT1A1**28. Njena učestalost varira u različitim populacijama, a kod belaca je prisutna sa 26% do 31%. ŽS je blago oboljenje, ali kao komorbiditet može dovesti do pogrešne dijagnoze bolesti jetre ili hemolitičkih procesa. U tim slučajevima je neophodno potvrditi ili isključiti dijagnozu ŽS molekularnom analizom *UGT1A1* gena.

Malo se zna o uticaju varijanti promotora *UGT1A1* gena na scenario kod oboljenja jetre. Samo u nekoliko slučajeva je kod pacijenata sa hepatitisom C sprovedeno genetičko testiranje na *UGT1A1**28, i pošto je dokazana pozitivnost objasnila detektovan nivo bilirubina, pacijenti su lečeni po standardnom protokolu i postigli su kontinuiran virusološki odgovor. Kod hemolitičkih anemija, kao što je talasemija, takođe je pokazano da je nivo bilirubina povezan sa pojavom komplikacija. Stoga se varijante u *UGT1A1* genu tretiraju kao tercijarni modifikatori kod beta- talasemijskih sindroma.

Pokazano je da je *UGT1A1**28 alel farmakogenetički marker za brojne farmaceutike kao što su antineoplastični lekovi koji se koriste u onkologiji (irinotekan, belinostat, epirubicin,

5-fluorouracil, aksitinib i bisulfan), zatim atazanavir i ritonavir u lečenju HIV infekcije, kao i analgetik/antipiretik acetaminofen koji je u širokoj upotrebi. Postoje podaci o učestalosti ove varijante u više populacija. Nijedna studija nije izučavala učestalost *UGT1A1**28 varijante u populaciji Republike Srpske i Republike Srbije. Populaciono-farmakogenetičke studije imaju klinički i ekonomski značaj. One mogu da dovedu do preporuka za uvođenje prediktivnih farmakogenetičkih testova pre uvođenja u terapiju određenih lekova, što dovodi do individualizacije terapije pacijenata i uštede u zdravstvenom sistemu jedne zemlje.

Ciljevi, materijali i metode Ciljevi ove studije su bili da se utvrdi učestalost TA varijanti u promotoru *UGT1A1* gena i korelacije nivoa nekonjugovanog bilirubina sa promotorskim TA genotipom *UGT1A1* kod pacijenata sa ŽS, hroničnim hepatitisom C i β-talasemijom minor, da se odredi učestalost varijantnog promotorskog TA alela *UGT1A1* gena u populaciji Republike Srbije i Republike Srpske, i da se proceni značaj *UGT1A1**28 alela kao farmakogenetičkog markera u ispitivanim populacijama. U ovoj studiji analizirano je: 51 uzorak pacijenata sa ŽS, 22 uzorka pacijenata sa dijagnozom β-talasemije minor, 24 uzorka pacijenata sa hroničnim hepatitisom C, uzorci 100 zdravih ispitanika iz opšte populacije Republike Srbije i uzorci 121 zdravih ispitanika iz opšte populacije Republike Srpske. Za analizu TA varijanti u promotorskom regionu *UGT1A1* gena primenjene su metode PCR, za umnožavanje promotorskog regiona *UGT1A1* gena, a metode fragment analize i metode sekvenciranja po Sangeru, za potvrdu rezultata dobijenih reakcijom PCR. Kod 10 pacijenata kod kojih nije utvrđen rizičan genotip za razvoj ŽS (*UGT1A1* 7/7 TA i 7/8 TA), a imali su povišene nivoe nekonjugovanog bilirubina, izvršeno je sekvenciranje 4 stalna egzona na 3' kraju *UGT1A1* gena uključujući i intron-egzon granice. Takođe, sekvenciran je i prvi varijabilni egzon *UGT1A1* gena. Rezultati su obrađeni statističkim programima.

Rezultati, diskusija i zaključci U ovoj studiji detektovne su 4 vrste genotipa: *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA, 7/7 TA i 7/8 TA. U grupi pacijenata sa ŽS učestalost rizičnih genotipova (*UGT1A1* 7/7 i 7/8 TA) bila je 80%, a učestalost *UGT1A1**28 alela u ovoj grupi pacijenata je 86,27%. Nivo nekonjugovanog bilirubina pri dijagnozi je bio statistički značajno veći u grupi pacijenata sa ŽS koji su imali rizični genotip (*UGT1A1* 7/7 i 7/8 TA) u odnosu na grupu pacijenata sa nerizičnim genotipom (*UGT1A1* 6/6 i 6/7 TA). Rezultati sekvenciranja kodirajućeg regiona *UGT1A1* gena kod 10 pacijenata kod kojih je ŽS bio dijagnostikovano fenobarbitonskim i hipokalorijskim testom, ali kod kojih nije postojala asocijacija rizičnih promotorskih varijanti sa fenotipom ŽS, su pokazali da su samo kod jednog od 10 pacijenata, pronađene varijante dva pojedinačna nukleotida: NM_000463.2 c.997-82T>C (intron 2,

pozicija 602 od 683) i c.1084+12G>A (intron 3, pozicija 12 od 283). Obe varijante nisu do sada prijavljene dbSNPs. Takođe, kod jednog pacijenta koji je klinički bio diferenciran kao ŽS, a genotipizacijom nije potvrđeno prisustvo ŽS, daljom dijagnostikom je utvrđeno da je nosilac β-talasemije minor tipa. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da pouzdanost *UGT1A1*(TA)_n genotipa kao dijagnostičkog markera za ŽS iznosi 80%. U grupi pacijenata sa HHC učestalost *UGT1A1**28 alela je bila 43,75%, što je nešto više, u odnosu na kontrolnu grupu od 40%. Nivo nekonjugovanog bilirubina kod pacijenata sa HHC je u korelaciji sa *UGT1A1* genotipom i viši je kod pacijenata koji su nosioci *UGT1A1**28 alela. Kod pacijenata sa β-talasemijom minor kod kojih je prisutna hemoliza, nivo nekonjugovanog bilirubina je u direktnoj korelaciji sa genotipom *UGT1A1*(TA)_n, te je najviši kod homozigotnih nosilaca *UGT1A1**28 alela. Na osnovu ovih nalaza, *UGT1A1*TA promotorska varijanta može da se smatra tercijernim genom modifikatorom kod β-talasemije minor. Populacione studije za populaciju Republike Srbije su pokazale da se genotipovi *UGT1A1* 6/6TA, 6/7TA i 7/7 TA javljaju sa učestalošću od 37%, 47% i 16% respektivno, a učestalost *UGT1A1**28 alela u opštoj populaciji je 0,40. U populaciji Republike Srpske genotipovi *UGT1A1* 6/6TA, 6/7TA i 7/7 TA javljaju sa učestalošću od 37,19%, 37,19% i 25,60% respektivno, a učestalost *UGT1A1**28 alela u opštoj populaciji je 0,44. Obzirom na izuzetno visoku učestalost *UGT1A1**28 alela u opštoj populaciji Republike Srbije i Republike Srpske i na njegovu ulogu i značaj u metabolizmu brojnih lekova, došlo se do zaključka da je *UGT1A1**28 alel značajan farmakogenetički marker za ove dve populacije, te se preporučuje analiza *UGT1A1* (TA)_n genotipa za u kliničkoj praksi pre uvođenja u terapiju lekova u čijem metabolizmu učestvuje UGT1A1 enzim.

Ključne reči: *UGT1A1*, Žilberov sindrom, hiperbilirubinemija, farmakogenetički marker, populaciona studija, personalizovana medicina

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ:

Promoter variants of the gene for uridine-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 as modulators of biochemical phenotype and population pharmacogenetic markers

Abstract

Introduction The uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase enzyme family (UGT) catalyse the glucuronidation of a wide range of endobiotics and xenobiotics. The UGT1 family is encoded by the *UGT1* gene complex consisting of 13 proximal variable exons and 4 common distal exons. Alternative splicing gives multiple transcripts, among which the UGT1A1 enzyme product, which is involved in the metabolism of bilirubin and many drugs, is particularly important. More than 60 variants have been detected in the *UGT1A1* gene, which are associated with pathological conditions. Variants in the TATA box of the *UGT1A* gene promoter differ in the number of TA repeats. Wild type *UGT1A1* contains 6 TA repeats (TA6), while variants with 5, 7 or 8 TA repeats are designated *UGT 1A1**36 (TA5), *UGT1A1**28 (TA7) and *UGT1A1**37 (TA8). The transcription activity of the promoter decreased accordingly to higher number of repeats compared to TA6.

Gilbert's syndrome (GS) is often a clinical condition characterized by hyperbilirubinaemia and icterus. It is caused by a reduced activity of UGT1A1 enzymes. The most commonly detected variant found in the basis of GS is *UGT1A1**28. Its frequency varies in different populations, and whites are present from 26% to 31%. GS is a mild illness, but as a comorbidity it can lead to a wrong diagnosis of liver disease or hemolytic processes. In these cases, it is necessary to confirm or exclude the diagnosis of GS by molecular analysis of the *UGT1A1* gene.

The effect of variants of *UGT1A1* gene on the development in liver disease is poorly known. In only a few cases, genetic testing for *UGT1A1**28 was performed in patients with hepatitis C, and since the confirmed positivity explained the detected level of bilirubin, patients were treated by standard protocol and achieved a continuous viral response. In hemolytic anemia, such as thalassemia, it has also been shown that the level of bilirubin is associated with the numerous of complications. Therefore, the TA promoter variants in the *UGT1A1* gene are treated as tertiary modifiers in beta-talasemia syndromes.

*UGT1A1**28 allele has been shown to be a pharmacogenetic marker for numerous pharmaceuticals such as antineoplastic drugs used in oncology (irinotecan, belinostat, epirubicin, 5-fluorouracil, axitinib and bisulfan), then atazanavir and ritonavir in the treatment of HIV infection, and analgesic /antipyretic acetaminophen which is widely used. There are data about the frequency of this variant in multiple populations. There are no studies about the frequency of *UGT1A1**28 variants in the population of the Republic Serbia and the Republic of Srpska. Population-pharmacogenetic studies have a clinical and economic significance. They can lead to recommendations for the introduction of predictive pharmacogenetic tests before the prescription of certain drugs, which can result in individualization of therapy and savings in the healthcare system.

Aims, materials and methods. The aims of this study were to determine the frequency of promoter TA variants of *UGT1A1* gene and the correlation of the level of unconjugated bilirubin with the *UGT1A1*(TA)_n genotype in patients with GS, chronic hepatitis C and β-thalassemia minor. Then, to determine the frequency of the variant TA promoter *UGT1A1* gene allele in the population of the Republic of Serbia and the Republic of Srpska. Finally, to evaluate the importance of *UGT1A1**28 allele as a pharmacogenetic marker in the examined populations. In this study, 51 samples of patients with GS, 22 patients diagnosed with β-thalassemia minor, 24 patients with chronic hepatitis C, 100 healthy subjects from the general population of the Republic of Serbia and 121 healthy subjects from the general population of Republika of Srpska were analyzed. For the analysis of the TA variants in the *UGT1A1* promoter region, PCR methodology were used for the propagation of the *UGT1A1* gene promoter region, analytical fragment analysis method and Sanger sequencing method to confirm the results obtained by the PCR reaction. In 10 patients to whom did not detect a risky genotype for the development of GS (*UGT1A1* 7/7 TA and 7/8 TA) and which had elevated levels of unconjugated bilirubin, sequencing of 4 permanent exons at the 3'end of the *UGT1A1* gene was performed, including the intron-exon regions. The first variable exon of *UGT1A1* gene is also sequenced. Obtained results were processed by statistical programs.

Results, discussion and conclusionIn this study, 4 types of genotypes were detected: *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA, 7/7 TA and 7/8 TA. In the group of patients with GS the incidence of risky genotypes (*UGT1A1* 7/7 TA and 7/8 TA) was 80%, and the incidence of *UGT1A1**28 alleles in this group of patients was 86.27%. The level of unconjugated bilirubin at the diagnosis was statistically significantly higher in the group of patients with GS who had a risky genotype (*UGT1A1* 7/7 TA and 7/8 TA) compared to a group of patients with a non-risk genotype (*UGT1A1* 6/6 TA and 6/7 TA). The results of the sequencing of *UGT1A1* gene in 10

patients who diagnosed as GS by phenobarbital and hypocaloric test, but whom not found association of risky promotor TA variants with GS phenotype, showed that only one of 10 patients had variants of two single nucleotides: NM_000463. 2 c.997-82T> C (intron 2, position 602 of 683) and c.1084 + 12G> A (intron 3, position 12 of 283). Both variants have not been reported as dbSNPs. Also, at one patient who was clinically differentiated as GS, but the diagnosis of GS was not confirmed by *UGT1A1*(TA)_n genotyping, further diagnosis was determined presence of β-thalassemia minor type. On the basis of the obtained results, it was found that the reliability of the *UGT1A1* genotype as a diagnostic marker for GS is 80%. In the group of patients with HHC, the *UGT1A1**28 allele rate was 43,75%, compared to the frequency of the same allele in control group of 40%. The level of unconjugated bilirubin in patients with HHC is correlated with *UGT1A1*(TA)_n genotype and is higher in patients carriers of *UGT1A1**28 allele. In patients with β-thalassemia minor with hemolysis, the level of unconjugated bilirubin is in direct correlation with the genotype *UGT1A1*(TA)_n, and it is the highest in homozygous carriers of *UGT1A1**28 allele. Based on these findings, *UGT1A1* (TA)_n can be considered a gene modifier for β-thalassemia minor. Population studies for the population of the Republic of Serbia showed that genotypes *UGT1A1* 6/6TA, 6/7TA and 7/7 TA occur with a frequency of 37%, 47% and 16% respectively, and the frequency of *UGT1A1** 28 allele in the general population is 0,40. In the population of the Republic of Srpska, genotypes *UGT1A1* 6/6TA, 6/7TA and 7/7 TA occur with a frequency of 37,19%, 37,19% and 25,60% respectively, and the frequency of *UGT1A1**28 allele in the general population is 0,44. Considering the extremely high incidence of *UGT1A1**28 alleles in the general population of Republic of Serbia and Republic of Srpska, and its vital role and importance in the metabolism of numerous drugs, it has been concluded that *UGT1A1**28 allele is a significant pharmacogenetic marker in these two populations, and that *UGT1A1* (TA)_n genotype analysis is recommended to be performed in introducing into therapy the drugs in which metabolism UGT1A1 enzyme is involved.

Key words: *UGT1A1*, Gilbert's syndrome, hyperbilirubinemia, pharmacogenetic marker, population study, personalized medicine

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metabolizam endobiotika i ksenobiotika	2
1.2. Uridin-difosfat glukuronoziltransferaze	3
1.2.1. Metabolizam bilirubina	7
1.2.2. Varijante <i>UGT1A1</i> gena i aktivnost UGT1A1 enzima	11
1.3. Hiperbilirubinemije	17
1.3.1. Nasledne hiperbilirubinemije	17
1.3.1.1. Poremećaji konjugovanja bilirubina	18
Žilberov sindrom	18
Klinička slika i dijagnoza Žilberovog sindroma	19
Genetička osnova i obrazac nasleđivanja Žilberovog sindroma	20
Dijagnostika Žilberovog sindroma	21
Krigler-Najarov sindrom	22
Krigler-Najarov sindrom tip I	22
Krigler-Najarov sindrom tip II	23
Lusi-Driskolov sindrom	23
Neonatalna žutica	24
1.3.1.2. Poremećaji ekskrecije bilirubina	24
Dubin-Džonsonov sindrom	24
1.3.1.3. Poremećaji preuzimanja i skladištenja bilirubina u hepatocitama	24
Rotorov sindrom	24
1.3.2. Hiperbilirubinemije uzrokovane hemolizom i drugim bolestima jetre	24
1.3.2.1. Talasemijski sindromi	25
1.3.2.2. Hronični hepatitis C	27
1.4. Personalizovana medicina	29
1.4.1. Farmakogenetika/farmakogenomika kao osnov za primenu personalizovane medicine	31
1.4.2. Populaciona farmakogenomika	32

1.5. <i>UGT1A1</i> kao farmakogenetički marker	34
1.5.1. Supstrati UGT1A1 enzim	34
Irinotekan.....	34
Raloksifen.....	36
Reltegravi.....	37
Etoposid.....	37
1.5.2. Inhibitori UGT1A1 enzima.....	38
1.5.2.1. Terapeutski lekovi kao UGT1A1 inhibitor	38
Inhibitori proteaze.....	38
Inhibitori tirozin kinaze	38
Drugi lekovi.....	39
1.5.2.2. Ekstrakti biljaka koji imaju inhibitornodejstvo na UGT1A1 enzim.....	39
1.5.3. Induceri i inhibitori ekspresije <i>UGT1A1</i> gen	39
1.5.4. Značaj interakcije različitih lekova i njihov efekat na ekspresiju <i>UGT1A1</i> gena i aktivnost UGT1A1 enzima.....	41
1.5.5. Uticaj životnog stila na fenotipsku ekspresiju <i>UGT1A1</i> gena.....	43
1.5.6. <i>UGT1A1</i> aleli i njihova uloga u bolestima.....	44
1.6. Populacione specifičnosti distribucije <i>UGT1A1</i> varijanti.....	45
1.6.1. Populacija Republike Srbije.....	48
1.6.2. Populacija Republike Srpske	48
2. Ciljevi.....	50
3. Materijali i metode.....	53
3.1. Materijal.....	54
3.1.1. Ispitanici- zdrava kontrolna grupa	54
3.1.1.1. Ispitanici iz populacije Republike Srbije	54
3.1.1.2. Ispitanici iz populacije Republike Srpske.....	54
3.1.2. Pacijenti.....	55
3.1.2.1. Pacijenti sa Žilberovim sindromom	55
3.1.2.2. Pacijenti sa Krigler Najarovim sindromom tip II	56
3.1.2.3. Pacijenti sa hroničnim hepatitisom C	56

3.1.2.4. Pacijenti sa talasemijskim sindromima	56
3.1.3. Prajmeri	57
3.1.3.1. Dizajniranje prajmera za umnožavanje <i>UGT1A1</i> gena.....	58
3.2. Metode	59
3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi na koloni	59
3.2.2. Lančana reakcija polimeraz	59
3.2.3. Fragment analiza.....	62
3.2.4. Analiza DNK na agaroznom gelu	62
3.2.5. Analiza DNK elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.....	63
3.2.6. Sekvenciranje DNK	64
3.2.7. In silico analiza intronskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena.....	65
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	65
3.2.8.1. Fišerov egzaktni test.....	65
3.2.8.2. Šapiro-Vilkov test	66
3.2.8.3. Kolmogor-Smirnov test	66
3.2.8.4. Man-Vitnjev test	66
4. Rezultat.....	67
4.1. Detekcija promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena, optimizacija metodologije.....	68
4.1.1. Analiza promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> reakcijom PCR	68
4.1.2. Analiza promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> fragment analizom.....	69
4.1.3. Analiza promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> sekvenciranjem po Sangeru.....	69
4.2. <i>UGT1A1</i> gen i Žilberov sindrom	71
4.2.1. Učestalost promotorskih varijanti u grupi pacijenata sa ŽS.....	71
4.3. <i>UGT1A1</i> gen i Krigler-Najarov sindrom tip 2.....	72
4.3.1. Sekvenciranje <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa sumnjom na CN2	72
4.3.2. In silico predikcija relevantnosti uočenih varijanti u transkripcionoj regulaciji <i>UGT1A1</i> gena.....	73
4.4. Hiperbilirubinemij uzrokovane hemolizom kod talasemijskih sindroma i hroničnim hepatitisom C	74
4.5. Učestalost promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa talasemijskim sindromima	75

4.5.1. Analiza korelacije nivoa nekonjugovanog bilirubina u odnosu na promotorske varijante <i>UGT1A1</i> kod pacijenata sa talasemijskim sindromima.....	76
4.5.2. β -talasemija minor prikriena kliničkom slikom Žilberovog sindroma	77
4.6. Učestalost promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C	77
4.6.1. Analiza korelacije nivoa nekonjugovanog bilirubina u odnosu na promotorske varijante <i>UGT1A1</i> kod pacijenata sa hroničnim hepatitisom C.....	78
4.7. Uporedni prikaz vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na promotorski genotip <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor i HHC	79
4.8. Populacione studije učestalosti promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena	80
4.8.1. Učestalost promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena u populaciji Republike Srbije.....	80
4.8.2. Biobanka Republike Srpske	81
4.8.3. Učestalost promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena u populaciji Republike Srpske	82
4.9. <i>UGT1A1</i> *28 kao farmakogenetički marker za populaciju Republike Srbije i Republike Srpske	83
5. Diskusija.....	84
5.1. Analiza primenjenih metoda u dijagnostici Žilberovog sindroma i <i>UGT1A1</i> promotorskog genotipa	85
5.2. Analiza <i>UGT1A1</i> promotorskih genotipova kod pacijenata sa Žilberovim sindromom	85
5.3. Analiza korelacije nivoa serumskog bilirubina sa promotorskim varijantama <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa ŽS	88
5.4. Analiza korelacije nivoa bilirubina u odnosu na dijagnoze β -talasemije minor i hroničnog hepatitisa C	88
5.5. Analiza učestalosti promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor	90
5.5.1. Analiza korelacije nivoa ukupnog bilirubina u odnosu na promotorske varijante <i>UGT1A1</i> kod pacijenata sa sindromom β -talasemija minor	90

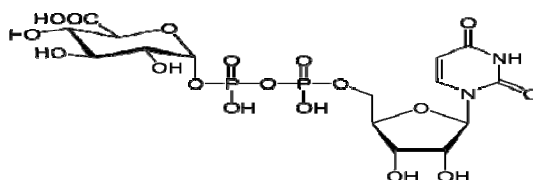
5.6. Analiza učestalost promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C	91
5.7. Analiza uporednog prikaza vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na promotorski genotip <i>UGT1A1</i> gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor i HHC.....	92
5.8. Analiza rezultata populacionih studija učestalosti promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena.....	93
5.8.1 . Analiza učestalosti promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena u populaciji Srbije.....	93
5.8.2 . Analiza učestalosti promotorskih varijanti <i>UGT1A1</i> gena u populaciji Republike Srpske	94
5.9. <i>UGT1A1</i> *28 kao farmakogenetički marker u populaciji Republike Srbije i Republike Srpske	95
6. Zaključci	97
7. Literatura	100

1.UVOD

1.1 Metabolizam endobiotika i ksenobiotika

U metabolizam i izlučivanje (ekskreciju) endobiotika, ksenobiotika i lekova uključen je veliki broj enzima. Metabolizam uključuje enzimsku konverziju jednog hemijskog oblika u drugi, dok se izlučivanje sastoji od uklanjanja (eliminacije) hemijskih jedinjenja iz organizma. Metabolizam ovih jedinjenja se najvećim delom odvija u jetri, dok se izlučivanje endobiotika i ksenobiotika i njihovih metabolita vrši preko bubrega, hepatobilijarnog sistema i pluća. Lipofilna jedinjenja se ne mogu efikasno izlučivati preko bubrega, te je neophodno da se prevedu u polarne metabolite koji se mogu izlučiti preko urina.

Metabolizam endobiotika i ksenobiotika kod čoveka se vrši putem dve vrste biohemijskih reakcija koje su poznate kao reakcije I i reakcije II faze. Reakcije faze I su kataboličke (oksidacija, redukcija ili hidroliza). Često se dešava da su dobijeni metaboliti reaktivniji i toksičniji od polaznog jedinjenja, te je u takvim slučajevima od suštinske važnosti brza eliminacija metabolita iz organizma. U reakcijama faze I učestvuju citohrom P450 enzimi. Ova familija enzima u molekul supstrata uvodi reaktivne grupe (hidroksilna, tiolna ili amino grupa) koje predstavljaju mesto napada konjugacionih sistema iz faze II. Ubrzo nakon faze I, nastupa faza II metabolizma čije reakcije su anaboličke (sintetičke) i uključuju konjugaciju, što najčešće za rezultat ima stvaranje neaktivnih, hidrofilnih metabolita koji se lako izlučuju iz organizma. Za reaktivne grupe uvedene u fazi I, enzimi faze II za njih vezuju supstituente kao što su glukuronil, sulfatna, metil, acetil, glicil i glutationska grupa. Reakcije faze I i faze II odvijaju se najvećim delom u jetri. Stvaranje glukuronida uključuje sintezu visokoenergetskog fosfatnog jedinjenja, uridin difosfata (UDP) glukuronske kiseline (UDPGA) (Slika 1) sa kojeg se glukuronska kiselina prenosi na atom supstrata bogat elektronima (N, O ili S), uz formiranje amidske, estarske ili tiolne veze (Rang et al, 2005). Ovaj proces se zove glukuronidacija i dovodi do biotransformacije supstrata u uglavnom netoksične produkte, rastvorljive u vodi koji se kao takvi izlučuju iz organizma (Naggar et Blanchard, 2006).

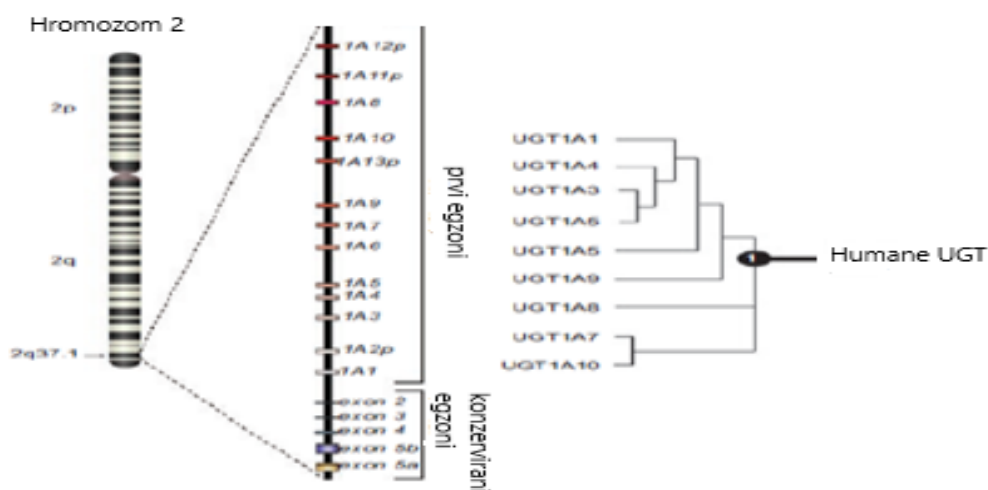


Slika 1. Uridin difosfat glukuronska kiselina

1.2 Uridin difosfat glukuronozil transferaze

Uridin difosfat glukuronozil transferaze (UGT) su superfamilija enzima (EC: 2.4) koji imaju široku supstratnu specifičnost i odgovorni su za glukuronidaciju brojnih endogenih i egzogenih supstanci. Unutar UGT superfamilije postoje četiri familije enzima: UGT1A, UGT2, UGT3 i UGT8 (Mackenzie et al, 2005). UGT1 i UGT2 familije pokazuju manje od 50% sličnosti proteinske sekvence (Burchell, 2003). UGT2 se deli na 2 subfamilije: UGT2A i UGT2B i obe su kodirane genima koji se nalaze na hromozomu 4. UGT2A enzimi su uključeni u glukuronidaciju fenolnih odoranata i policikličnih aromatičnih hidrokarbonskih metabolita, dok UGT2B enzimi učestvuju u metabolizmu steroidnih hormona (Barbier et Belanger, 2008). Proteini UGT3 i UGT8 familije još nisu dovoljno proučeni.

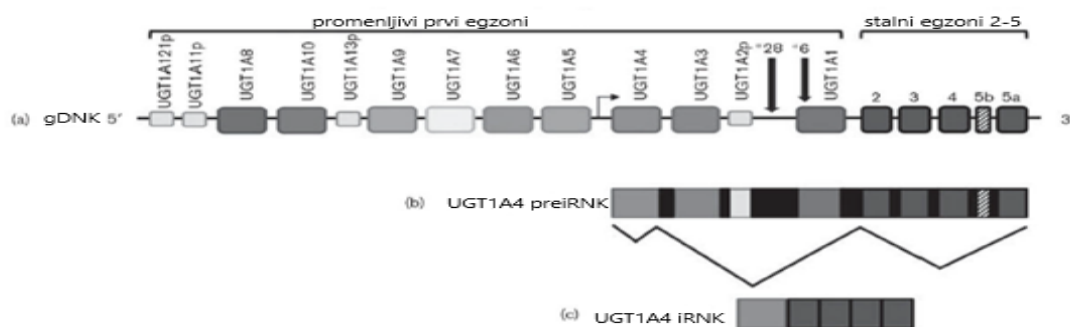
Najbolje proučena i opisana familija UGT kod ljudi je UGT1A (EC: 2.4.1) koja je kodirana kompleksnim genskim lokusom lociranim na hromozomu 2q37 (Naggar et Blanchard, 2006). Ovaj genski kompleks na 5' kraju ima 13 prvih varijabilnih egzona koji su povezani sa 4 stalna egzona na 3' kraju *UGT1A*. Četiri od 13 prvih egzona su pseudoegzoni dok je 9 egzona vijabilno, i nezavisno transkribovano sa visoko konzerviranim egzonom 2 do egzona 5, formirajući 9 različitih transkripata (*UGT1A1*, *UGT1A3* do *UGT1A10*). Pseudogeni su *UGT1A2*, *UGT1A11*, *UGT1A12* i *UGT1A13* (Gong et al, 2001) (Slika 2).



Slika 2. Kompletni *UGT1A* lokus lociran na hromozomu 2q37.1.

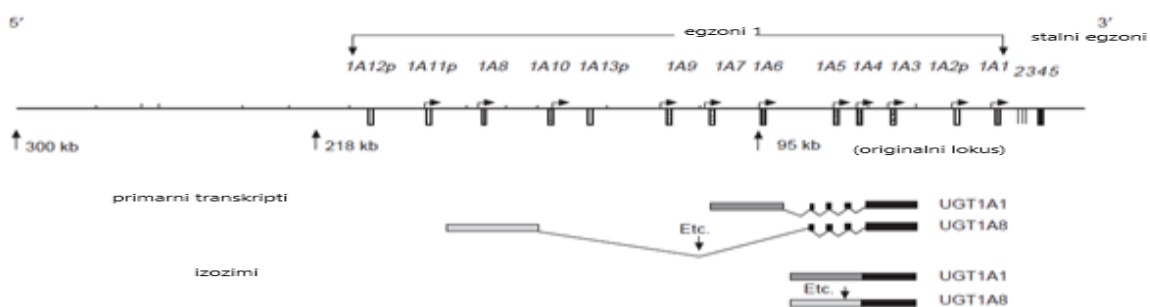
Svaki transkript ima identičan 3' kraj i jedinstven 5' kraj. Varijabilni region obezbeđuje supstratnu specifičnost, dok visoko konzervirani region (egzon 2 do 5) sadrži mesto preko kojeg se ostvaruje interakcija sa UDP glukuronskom kiselinom koja je uobičajeni donor

glukuronil grupe supstratu (Gong et al,2001). Međutim, otkrivene su i izoforme koje nastaju alternativnim splajsingom u konzerviranom regionu. Ove izoforme nastaju kada se egzon 5b prepisuje umesto ili zajedno sa egzonom 5a, pri čemu nastaju izoforme 2 ili UGT1As_i2 koje nemaju enzimsku aktivnost (Slika 3) (Girard et al, 2007; Bellemare et al, 2010).



Slika 3. Kompletni *UGT1A1* lokus. Najčešće varijante *UGT1A1*28* i *UGT1A1*6*. Egzon 5 se sastoji od egzona 5a i egzona 5b u konzerviranom regionu.

Svaki od prvih egzona, osim defektnih *UGT1A12p* i *UGT1A13p* pseudogena, imaju sopstvene TATA promotorske elemente na 5' kraju što omogućava nezavisnu inicijaciju aktivnosti RNK polimeraze, čime nastaje serija preklapajućih (eng. overlapping) primarnih transkripata (Slika 4).



Slika 4. *UGT1A* kompleksni lokus sa 13 varijabilnih egzona i njihovim promotorskim elementima

Promotorski region *UGT1A1* gena ima tipičnu promotorsku strukturu za koju se vezuje RNK polimeraza II (Pol II). TATA promotorski element (TATAA) lociran je uzvodno na poziciji -28 od mesta otpočinjanja transkripcije (eng. transcriptional start site – TSS), a nizvodni promotorski element (eng. Downstream promotor element – DPE) se nalazi na +26 od TSS

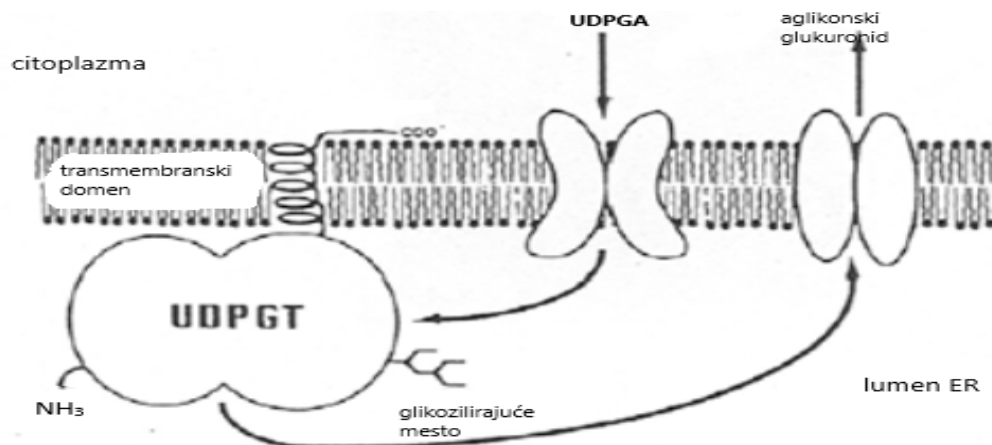
(Slika 5) (Li et al, 2009). Dinukletodini polimorfizam A(TA)₅₋₈TAA u TATA promotorskom elementu prisutan je u svim etničkim grupama, a najčešća varijanta je A(TA)₆TAA (Beutler et al, 1998). Aleli sa većim brojem TA ponovaka imaju smanjeni afinitet za vezivanje transkripcionog faktora II (TFII) što rezultira smanjenom ekspresijom gena (Hsieh et al, 2007).



Slika 5. Promotorski region *UGT1A1* gena. TSS – mesto odpočinjanja transkripcije; DPE – nizvodni promotorski element.

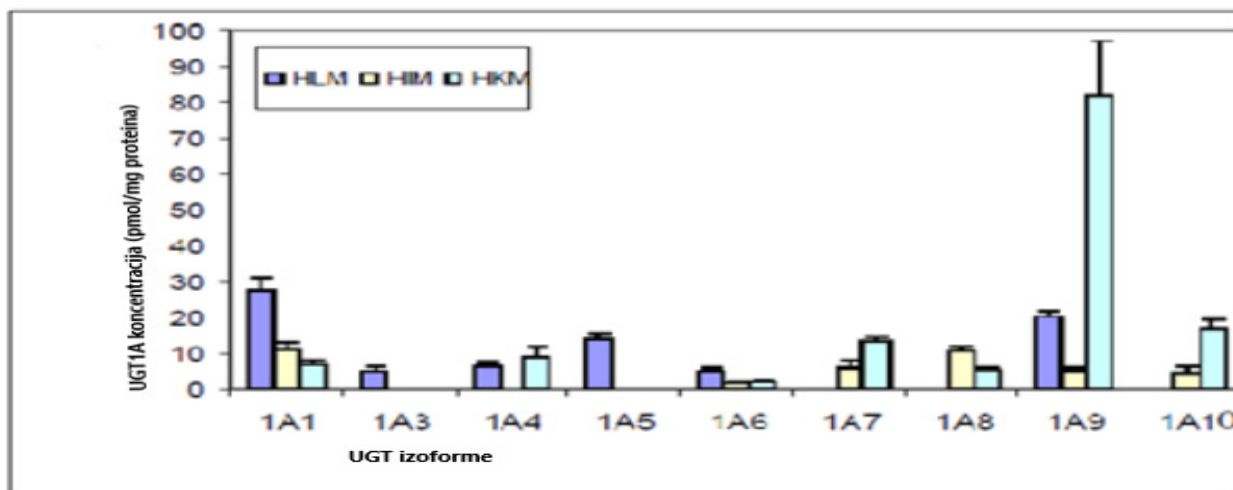
S obzirom na značaj i na široku supstratnu specifičnost UGT1A enzima, u poslednje dve decenije vršena su brojna istraživanja u cilju boljeg razumevanja uloge ovih enzima u metabolizmu endobiotika i ksenobiotika, kao i značaja različitih varijanti za efikasnost metabolisanja supstrata, i povezanosti sa raznim oboljenjima, uključujući i maligna oboljenja, koja nastaju kao posledica genetske varijabilnosti *UGT1A* lokusa.

UGT1A genski lokus kodira enzime koji imaju oko 550 aminokiselina (AK). Ovi enzimi su locirani u membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER). C-terminus svih UGT enzima ima visoko homologi region od 44 AK za koji se vezuje UDP-glukuronska kiselina. N-terminus je varijabilan naročito u regionu od 60-120AK. Oko 23-27 AK se iseca sa N terminusa tokom insercije u membranu ER. 17 AK blizu C-terminusa je lipofilno i predstavlja transmembranski domen. Veći deo proteina je lociran u lumenu ER, uključujući i domene vezivanja supstrata kao i katalitičko mesto (Meech et Mackenzie, 1997). Većina UGT enzima je glikozilirana, a postoje dokazi da fosforilacija enzima može uticati na aktivnost UGT enzima (Slika 6).



Slika 6. Topologija uridin difosfat glukuronoziltransferaze (UDP GT) i pretpostavljeni transporteri u membrani endoplazmatskog retikuluma. UDPGA- uridin5'-difosfoglukuronat.

UGT1A se ekspirira u jetri, intestinumu, bubrežima, želucu i debelom crevu. *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A10* se ekspiriraju isključivo ekstrahepatično (Strassburg et al, 1998; Strassburg et al, 2000). Opsežnim istraživanjem proteoma pomoću masene spektrometrije pokazana je distribucija *UGT1A* enzimskih izoformi po različitim tkivima (Slika 7) (Harbourt et al, 2012).



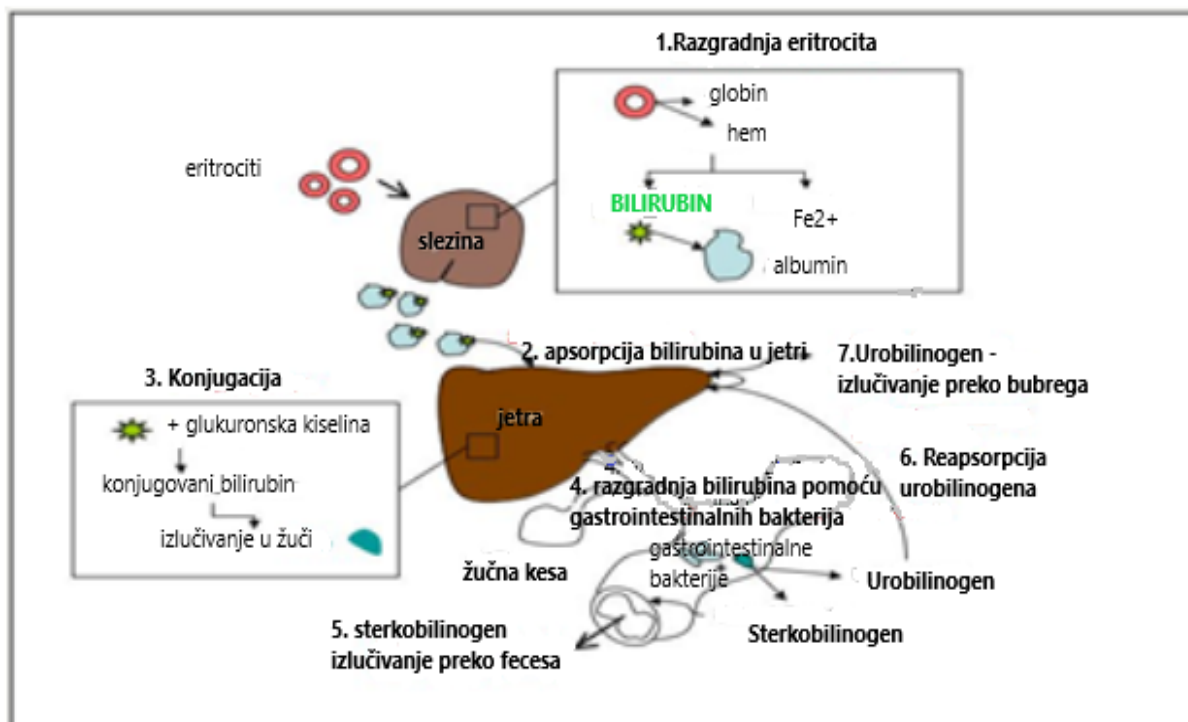
Slika 7. *UGT1A* ekspresija u humanim tkivima. HLM- humani jetreni mikrozomi (eng.human liver microsomes); HIM- humani intestinalni mikrozomi (eng.human intestinal microsomes); HKM humani bubrežni mikrozomi (eng.human kidney microsomes) (Harbourt et al,2011).

UGT1A1 gen se eksprimira u jetri, kao i u želucu, intestinumu i kolonu. Jedna od glavnih funkcija UGT1A1 enzima (EC 2.4.1.17) se odvija u jetri gde ovaj enzim vrši glukuronidaciju bilirubina koji je hidrofobni produkt razgradnje hemoglobina. Iako uopšteno UGT1A familija enzima pokazuje široku supstratnu specifičnost, izoforma UGT1A1 je jedini enzim koji može da izvrši glukuronidaciju bilirubina. Ne postoji ni jedan alternativni metabolički put za detoksifikaciju i uklanjanje bilirubina, isključujući fotoizomerizaciju koja je relativno neefikasna u odnosu na UGT1A1 glukuronidaciju.

1.2.1 Metabolizam bilirubina

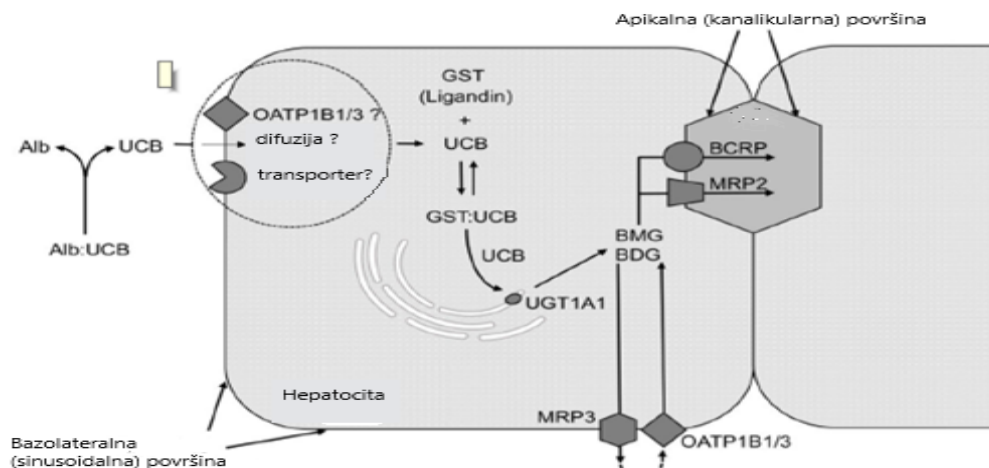
Bilirubin je krajnji produkt razgradnje proteina koji sadrže hem. Oko 80% bilirubina nastaje razgradnjom hemoglobina iz eritrocita, nakon 120 dana života eritrocita u krvi. Preostalih 20% dnevno stvorenog bilirubina nastaje iz prethodnika eritrocita u koštanoj srži (neefikasna eritrocitopoeza) i drugih hem proteina (mioglobin, citohromi, katalaza).

Hemoglobin koji izlazi iz uništenih eritrocita razgradi se u retikulo-endotelijalnom sistemu. Prvo, uz hidrosilaciju i otcepljenje CO, nastaje zeleni pigment, holoheoglobin ili verdoglobin, koji još sadrži globin i Fe³⁺ ali kod kojeg je porfirinski prsten otvoren već između pirolnih prstena I i II. Jedan metinski ugljenik se izgubio, a umesto toga na prstenima I i II pojavile su se karbonilne grupe. Iz verdoglobina se otcepljuju proteinske komponente i gvožđe, jer više ne postoji porfirinski prsten. Nastaje izduženi četvoročlani pirolni pigment, biliverdin. On se redukuje u crveni pigment bilirubin, koji je slabo rastvorljiv u vodi i cirkuliše u krvi uglavnom vezan za albumin. Male količine nevezanog, nekonjugovanog bilirubina se nalaze u ravnoteži sa vezanim, konjugovanim bilirubinom u cirkulaciji (Karlson, 1976). Nevezani, cirkulišući bilirubin ima neurotoksični efekat i povezuje se sa akutnom bilirubinemijskom encefalopatijom, koja može da se razvije u trajnu, hroničnu bilirubinsku encefalopatiju, poznatu kao kernikterus (Watchko, 2013). U normalnim okolnostima bilirubin brzo i selektivno resorbuju hepatociti, gde se najveći deo pomoću UDP-glukuronske kiseline prevodi u glukuronid, i kao takav se izlučuje u žuč. Bilirubin-glukuronid je najvažnija žučna boja. Žučne boje (mezobilirubin, mezobilirubinogen, sterkobilinogen) dalje se razgrađuju u digestivnom traktu i izlučuju se putem creva (Slika 8).



Slika 8. Metabolizam bilirubina u ljudskom organizmu. 1. razgradnja hema iz crvenih krvnih zrnaca do bilirubina 2. preuzimanje bilirubina od strane jetre 3. konjugacija bilirubina u hepatocitama 4. razgradnja bilirubina od strane crevnih bakterija 5. izlučivanje bilirubina preko fecesa 6. reapsorpcija urobilinogena 7. ekskrecija urobilinogena putem bubrega.

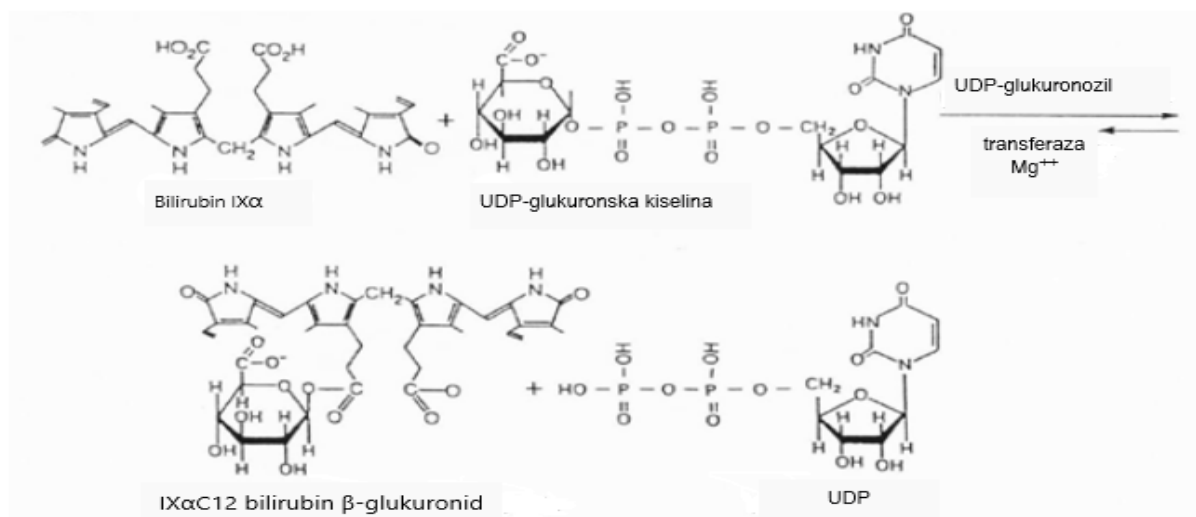
Nekonjugovani bilirubin, koji se u krvi vezao za albumin, pre ulaska u hepatocite disocira od albumina i u svom nekonjugovanom obliku ulazi u hepatocite. Način ulaska u hepatocite još nije do kraja razjašnjen. Nekonjugovani bilirubin u hepatocite može ući, difuzijom, zatim posredstvom nekog proteina u membrani koji bi se afinitetno vezivao za nekonjugovani bilirubin sa spoljašnje strane hepatocita, a postoje i studije koje ukazuju na ulogu transporterskih proteina organskih anjona (eng. organic anion transport proteins - OATP). Ovi proteini pripadaju OATP superfamiliji, poznatoj još i pod nazivom SLCO superfamilija transportera (eng. solute carrier organic anion - SLCO) (Hagenbuch et Meier, 2004). Poznato je da je konjugovani bilirubin glavni supstrat za SLCO1B1/OATP1B1 i SLCO1B3/OATP1B3 (Briz et al, 2003), kao i da varijante u ovom genu dovode do smanjenja aktivnosti samih transportera, te i do povećanja nivoa i nekonjugovanog i konjugovanog bilirubina u serumu. U citoplazmi hepatocita slobodni bilirubin se vezuje za ligandin (citoplazmatski transporterski protein iz familije glutation-S-transferaza - GST). Ligandin ima mnogo veći afinitet za bilirubin od albumina, što doprinosi akumulaciji i skladištenju bilirubina unutar hepatocita (Slika 9) (Erlinger et al, 2014).



Slika 9. Šematski prikaz transportera i enzima uključenih u nasledne poremećaje izlučivanja (klirensa) bilirubina. (Alb-albumin; BCRP – protein (breast cancer resistance protein); BMG-bilirubin monoglukuronid; BDG-bilirubindiglukuronid, GST-glutation-S-transferaza; MRP- protein vezan za otpornost na više lekova (multidrug resistance-associated protein; OATP-transportni protein organskih anjona (organic anion transport protein); UCB – nekonjugovani bilirubin (unconjugated bilirubin); UGT-uridin difosfat glukuronosil transferaza (Memon et al,2016).

Bilirubin vezan za ligandin se transportuje u glatki ER, gde se nalazi uridin difosfat glukuronosil transferaza 1A1 (UGT1A1). UGT1A1 je transmembranski protein koji u lumenu ER ima mesto za vezivanje bilirubina i za vezivanje uridin difosfo glukuronske kiseline. UDP glukuronil transferaza katalizuje prenos glukuronske kiseline sa uridin difosfata (UDP) glukuronske kiseline koji je visokoenergetsko fosfatno jedinjenje, na atom supstrata bogatog elektronima (N,O ili S) uz formiranje amidске, estarske ili tiolne veze.

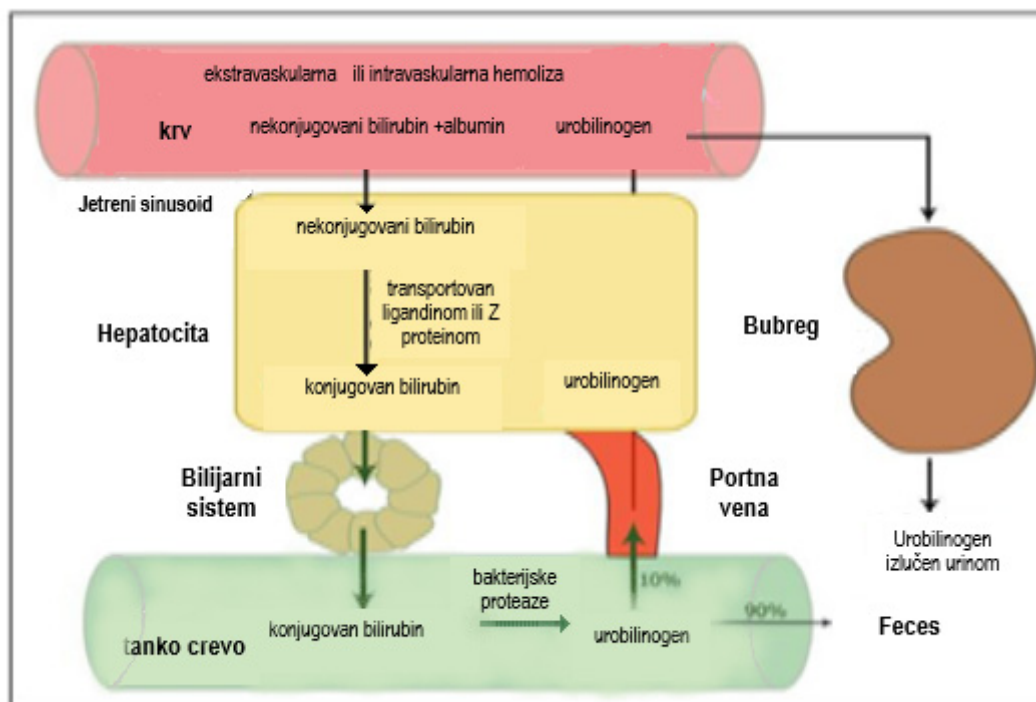
Konjugacija je dvostepeni proces u kojem UGT1A1 enzim u prvom koraku katalizuje transfer jednog molekula glukuronske kiseline na jednu karboksilnu grupu bilirubina, pri čemu nastaje bilirubin monoglukuronid, a potom se vezuje i drugi molekul glukuronske kiseline na drugu karboksilnu grupu i tako nastaje bilirubin diglukuronid (Slika 10). Obe vrste konjugovanog bilirubina su manje liposolubilne od svog prekursora, a kao rastvorljive u vodi se izlučuju u urin ili žuči.



Slika 10. Reakcija glukuronidacije bilirubina pomoću enzima UDP glukuronoziltransferaze. UGT1A1 enzim koristi bilirubin-IX α i UDP-glukuronsku kiselinu pri čemu nastaje IX α C12 bilirubin β -glukuronid i UDP

Kada konjugovani bilirubin izađe iz ER u citoplazmu, on difunduje ili ka apikalnoj površini hepatocita (kanalikularna površina) ili ka bazolateralnoj površini (sinusoidalna površina). Na kanalikularnoj površini ekskretuje se u žuč pomoću dve ATP-vezujuće kasete (ABC) transportera: ABCC2/MRP2 (eng. multi-drug resistance associated protein) i ABCG2/BCRP (eng. breast cancer resistance protein) (Vlaming et al, 2009). Značajna frakcija konjugovanog bilirubina se izlučuje nazad u sinusoidalni krvotok pomoću ABCC3/MRP3 transportera, ali se odmah potom resorbuje u hepatocyte pomoću nosača SLCO1B1/OATP1B1 i SLCO1B3/OATP1B3.

Kod različitih bolesti jetre proizvodi se više bilirubina, a istovremeno je i propustljivost ćelija jetre povećana za tu boju, tako da glukuronid bilirubina (direktni, konjugovani bilirubin) i sam bilirubin (indirektni, nekonjugovani bilirubin) prelaze u krv odakle difundiraju u tkiva i kožu pri čemu se ispoljava žutica, ikterus (Slika 11). Začepljenje žučnih kanala može proizvesti iste simptome. Zato je određivanje bilirubina značajno za kliničke analize i može pomoći u postavljanju diferencijalne dijagnoze (Karlson, 1976).



Slika 11. Šematski prikaz distribucije konjugovanog i nekonjugovanog bilirubina kroz organe i krvotok

Pokazalo se da UDP glukuronil transferaza ima široku supstratnu specifičnost, tako da osim u metabolizmu bilirubina učestvuje i u metabolizmu mnogih lekova i drugih egzogenih molekula (Rang et al, 2005).

1.2.2. Varijante *UGT1A1* gena i aktivnost *UGT1A1* enzima

Nasleđeni poremećaji konjugacije primarno nastaju usled promena u *UGT1A1* genu, koje rezultiraju smanjenom aktivnošću *UGT1A1* enzima ili potpunim odsustvom samog enzima.

Do sada je opisano oko 130 alelskih varijanti *UGT1A1* gena i u egzonskim i u promotorskim sekvencama (Wishnumurti et al, 2018). Nemutirana *UGT1A1* promotorska varijanta, odnosno nosilac normalnog *UGT1A1* alela (eng. wild type), se označava kao *UGT1A1**1.

Najčešće i najviše proučavane su alelske varijante vezane za broj TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1* gena. U nemutiranom promotorskom regionu *UGT1A1* (rs8175347) ima 6 TA ponovaka. *UGT1A1* varijanta sa 7 TA ponovaka se obeležava kao *UGT1A1**28, sa 5 TA ponovaka *UGT1A1**36, dok je varijanta sa 8 TA ponovaka označena kao *UGT1A1**37. Broj ponovaka u *UGT1A1* promotorskom regionu direktno korelira sa transkripcionom aktivnošću samog *UGT1A1* promotora, tako da povećanje/smanjenje broja

ponovaka u odnosu na *UGT1A1**1 smanjuje/povećava njegovu transkripcionu aktivnost, a time dovodi i do smanjene/povećane aktivnosti UGT1A1 enzima. Varijante *UGT1A1**28 i *UGT1A1**37 dovode do hiperbilirubinemije i povećanog rizika od stvaranja žučnih kamenaca kod nekoliko naslednih hemolitičkih stanja (Radlović et al, 2011).

Osim promena u promotorskom regionu, najveći broj (89%) detektovanih varijanti su one kod kojih je došlo do zamene jednog nukleotida – SNP (eng. Single Nucleotide Polymorphisms SNPs). Oko 92% SNPs locirano je u 3'UTRs regionu dok su ostali detektovani u kodirajućem regionu (Wisnumurti et al, 2018). Većina varijanti su tipa zamene nukleotida sa promenjenim značenjem kodona tzv. *missens* varijante, dok se kod varijanti kod kojih zamena nukleotida formira stop kodon tzv. *stop-gain* varijante i kod tipa zamene nukleotida sa istim značenjem kodon tzv. *silent* varijante javljaju retko. *Missens* varijante rezultiraju promenom aminokiseline u proteinu, a samim tim i izmenjenom enzimskom aktivnošću koja može biti smanjena ili inaktivna. Zamene nukleotida koje uvode stop kodon dovode do potpunog odsustva enzima. Insercije i delecije dovode do promenjenog okvira čitanja i najčešće do odsustva enzima. Odsustvo enzima UGT1A1 je letalno i nije kompatibilno sa životom. Prikaz svih prijavljenih varijanti u promotoru *UGT1A1* gena dat je u Tabeli 1.

Tabela1. Alelske varijante *UGT1A1* i aktivnost UGT1A1 enzima.

(www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca)

Naziv alela	Protein	Nucleotidna izmena Referentna sekvenca : AF297093	Izmena amino kiseline	Egzon	Efekat	Fenotip	Enzimaska aktivnost In vivo	Referenca
UGT1A1*1	UGT1A1.1				nemutiran			Ritter JK,
UGT1A1*2	UGT1A1.2	877(T>A)/878-890del	izmenjen okvir čitanja/Del	2	izmenjen okvir čitanja	CN1	odsutna	Ritter JK, Sappal BS,
UGT1A1*3	UGT1A1.3	1124(C>T)	S375F	4		CN1	neaktivan	Bosma PJ,
UGT1A1*4	UGT1A1.4	1069(C>T)	Q357X	3		CN1	neaktivan	Bosma PJ,
UGT1A1*5	UGT1A1.5	991(C>T)	Q331X	2	delecija Egzona 2	CN1	odsutna	Bosma PJ,
UGT1A1*6	UGT1A1.6	211(G>A)	G71R	1			smanjena	Aono S,
UGT1A1*7	UGT1A1.7	1456(T>G)	Y486D	5		CN2	smanjena	Aono S,
UGT1A1*8	UGT1A1.8	625(C>T)	R209W	1		CN2	4.4%	Bosma PJ;Huang CS,
UGT1A1*9	UGT1A1.9	992(A>G)	Q331R	2		CN2	smanjena	Moghrabi N,
UGT1A1*10	UGT1A1.10	1021(C>T)	R341X	3		CN1	odsutna	Moghrabi N,
UGT1A1*11	UGT1A1.11	923(G>A)	G308E	2		CN1	neaktivan	Erps LT, Labrune P,
UGT1A1*12	UGT1A1.12	524(T>A)	L175Q	1		CN2	38.4%	Seppen J,
UGT1A1*13	UGT1A1.13	508-510del	F170del	1		CN1	neaktivan	Ritter JK,
UGT1A1*14	UGT1A1.14	826(G>C)	G276R	1		CN1	neaktivan	Seppen J,
UGT1A1*15	UGT1A1.15	529(T>C)	C177R	1		CN1	neaktivan	Seppen J,
UGT1A1*16	UGT1A1.16	1070(A>G)	Q357R	3		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*17	UGT1A1.17	1143(C>G)	S381R	4		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*18	UGT1A1.18	1201(G>C)	A401P	4		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*19	UGT1A1.19	1005(G>A)	W335X	3		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*20	UGT1A1.20	1102(G>A)	A368T	4		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*21	UGT1A1.21	1223insG	izmenjen okvir čitanja	4	izmenjen okvir čitanja	CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*22	UGT1A1.22	872(C>T)	A291V	2		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*23	UGT1A1.23	1282(A>G)	K426E	4		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*24	UGT1A1.24	1309(A>T)	K437X	5		CN1	odsutna	Labrune P,
UGT1A1*25	UGT1A1.25	840(C>A)	C280X	1		CN1	odsutna	Aono S,
UGT1A1*26	UGT1A1.26	973delG	izmenjen okvir čitanja	2	izmenjen okvir čitanja	CN2	odsutna	Seppen J,
UGT1A1*27	UGT1A1.27	686(C>A)	P229Q	1		Žilber	smanjena	Aono S,
UGT1A1*28	UGT1A1.28	A(TA)6TAA to A(TA)7TAA		Promotor		Žilber	smanjena	Bosma PJ,
UGT1A1*29	UGT1A1.29	1099(C>G)	R367G	4		Žilber	smanjena	Aono S,
UGT1A1*30	UGT1A1.30	44(T>G)	L15R	1		CN2	smanjena	Seppen J,
UGT1A1*31	UGT1A1.31	1160(CC>GT)	P387R	4		CN1	odsutna	Ciotti M,
UGT1A1*32	UGT1A1.32	1006(C>T)	R336W	3		CN1	0-10%	Ciotti M,
UGT1A1*33	UGT1A1.33	881(T>C)	I294T	2		CN2	40-55%	Ciotti M,

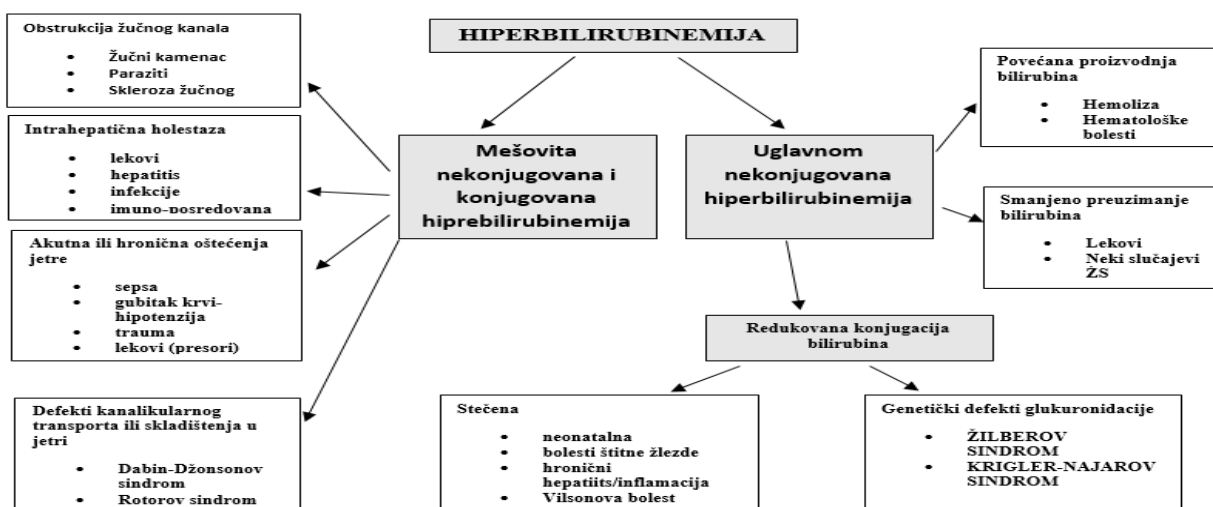
Naziv alela	Protein	Nucleotidna izmena	Izmena amino kiseline	Egzon	Efekat	Fenotip	Enzimaska aktivnost In vivo	Referenca
UGT1A1*34	UGT1A1.34	928(A>G)	M310V	2		CN2	26%-51%	Ciotti M,
UGT1A1*35 ¹	UGT1A1.35	1292(T>C)	I431T	4		CN2	61%-81%	Ciotti M,
UGT1A1*36	UGT1A1.36	A(TA)6TAA u A(TA)5TAA		Promotor			povečana	Beutler E,
UGT1A1*37	UGT1A1.37	A(TA)6TAA u A(TA)8TAA		Promotor		CN2	smanjena	Beutler E,
UGT1A1*38	UGT1A1.38	1213(A>G)/ A(TA)6TAA u A(TA)8TAA	N400D	4		CN2		Labrune P,
UGT1A1*39	UGT1A1.39	1201(G>C)/1309(A>T)	A401P/K437X	4; 5		CN1		Labrune P,
UGT1A1*40	UGT1A1.40	872(C>T)/1282(A>G)	A291V/K426E	2; 4		CN1		Labrune P,
UGT1A1*41	UGT1A1.41	120-121delCT	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN1		Ciotti, 1995
UGT1A1*42	UGT1A1.42	1388(A>C)/N A(TA)7TAA	E463A	5		CN2		Chalasanani N,
UGT1A1*43 ¹	UGT1A1.43	698(T>G)	L233R	1		-		Gagne JF,
UGT1A1*44	UGT1A1.44	115(C>G)	H39D	1		CN1		Kadacol A,
UGT1A1*45	UGT1A1.45	222(C>A)	Y74X	1		CN1		Kadacol A,
UGT1A1*46	UGT1A1.46	517delC	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN1		Kadacol A,
UGT1A1*47	UGT1A1.47	722-723delAG	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN1		Kadacol A,
UGT1A1*48	UGT1A1.48	674(T>G)/722-723delAG	V225G/izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN2		Kadacol A,
UGT1A1*49	UGT1A1.49	1043delA	izmenjen okvir čitanja	3	izmenjen okvir čitanja	CN1		Kadacol A,
UGT1A1*50	UGT1A1.50	1220delA/N	izmenjen okvir čitanja/N	4	izmenjen okvir čitanja	CN1		Kadacol A,
UGT1A1*51	UGT1A1.51	1127(A>G)/N	H376R/N	4		CN2		Kadacol A,
UGT1A1*52	UGT1A1.52	1130(G>T)	G377V	4		CN2		Kadacol A,
UGT1A1*53	UGT1A1.53	1448(G>A)	W483X	5		CN1		Kadacol A,
UGT1A1*54	UGT1A1.54	1449(G>A)	W483X	5		CN1		Kadacol A,
UGT1A1*55	UGT1A1.55	1487(T>A)/N	L496X/N	5		CN1		Kadacol A,
UGT1A1*56	UGT1A1.56	Splice acceptor site	Intron 1	Intron 1		CN1		Gantla S,
UGT1A1*57	UGT1A1.57	Splice donor site	Intron 3	Intron 3		CN1		Gantla S,
UGT1A1*58	UGT1A1.58	145(C>T)	Q49X	1		CN1		Gantla S,
UGT1A1*59	UGT1A1.59	1186delG	izmenjen okvir čitanja	4	izmenjen okvir čitanja	CN2		Huang CS,
UGT1A1*60	UGT1A1.60	-3279(T>G)		Promotor		Žilber		Sugatani J,
UGT1A1*61	UGT1A1.61	Splice donor site (G>A)	Intron 3	Intron 3		CN1		Sappal BS,
UGT1A1*62	UGT1A1.62	247(T>C)	F83L	1		Žilber		Sutomo R,
UGT1A1*63	UGT1A1.63	1091(C>T)	P364L	4		-	smanjena	Huang CS.
UGT1A1*64	UGT1A1.64	488-491dupACCT	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	Žilber	smanjena	Costa E.
UGT1A1*65	UGT1A1.65	-1126(C>T)		Promotor		Žilber	-	Costa E.

Naziv alela	Protein	Nucleotidna izmena	Izmena amino kiseline	Egzon	Efekat	Fenotip	Enzimaska aktivnost In vivo	Referenca
UGT1A1*66	UGT1A1.66	997-82(T>C)		Intron 2		Žilber	-	Costa E.
UGT1A1*67	UGT1A1.67	-85 to -83 ins CAT		Promotor		Žilber	zmanjena	Farheen S.
UGT1A1*68	UGT1A1.68	-63(G>C)		Promotor		Žilber	normalna	Farheen S.
UGT1A1*69	UGT1A1.69	476(T>C)	I159T	1		Žilber	normalna	Farheen S.
UGT1A1*70	UGT1A1.70	962(C>G)	A321G	2		Žilber	normalna	Farheen S.
UGT1A1*71	UGT1A1.71	964(A>G)	I322V	2		-	normalna	Farheen S.
UGT1A1*72	UGT1A1.72	1075(G>A)	D359N	3		Žilber	normalna	Farheen S.
UGT1A1*73	UGT1A1.73	1091(C>T)	P364L	4		Žilber	normalna	Farheen S.
UGT1A1*74	UGT1A1.74	-3345 delC		Promotor		-	-	Sai K.
UGT1A1*75	UGT1A1.75	1598(A>C)	H533P	5		-	-	Sai K.
UGT1A1*76	UGT1A1.76	1813(C>T)		3'UTR		-	-	Sai K.
UGT1A1*77	UGT1A1.77	2021(T>C)		3'UTR		-	-	Sai K.
UGT1A1*78	UGT1A1.78	1941(C>G)		3'UTR		-	-	Sai K.
UGT1A1*79	UGT1A1.79	2042 (C>G)		3'UTR		-	-	Sai K.
UGT1A1*80	UGT1A1.80	-364(C>T)		Promotor		-	-	Sai K.
UGT1A1*81	UGT1A1.81	-64(G>C)		Promotor		-	-	Sai K.
UGT1A1*82	UGT1A1.82	IVS1-72 (T>G)		Intron 1		-	-	Sai K.
UGT1A1*83	UGT1A1.83	IVS1-52 (T>C)		Intron 1		-	-	Sai K.
UGT1A1*84	UGT1A1.84	IVS2+18 (C>T)		Intron 2		-	-	Sai K.
UGT1A1*85	UGT1A1.85	IVS4-229 (A>C)		Intron 4		-	-	Sai K.
UGT1A1*86	UGT1A1.86	IVS1-157 (C>A)		Intron 1		-	-	Sai K.
UGT1A1*87	UGT1A1.87	IVS2+15 (T>C)		Intron 2		-	-	Sai K.
UGT1A1*88	UGT1A1.88	IVS2-82 (T>C)		Intron 2		-	-	Sai K.
UGT1A1*89	UGT1A1.89	-3440 (C>A)		Promotor		-	-	Innocenti F.
UGT1A1*90	UGT1A1.90	-3401 (T>C)		Promotor		-	-	Innocenti F.
UGT1A1*91	UGT1A1.91	-3177 (C>G)		Promotor		-	-	Innocenti F.
UGT1A1*92	UGT1A1.92	-3175 (A>G)		Promotor		-	-	Innocenti F.
UGT1A1*93	UGT1A1.93	-3156 (G>A)		Promotor		-	-	Innocenti F.
UGT1A1*94	UGT1A1.94	1381 (T>C)	W461R	5		CN1	-	Maruo Y.
UGT1A1*95	UGT1A1.95	1007(G>A)	R336Q	3		CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*96	UGT1A1.96	1007(G>T)	R336L	3		CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*97	UGT1A1.97	1184(G>T)	G395V	4		CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*98	UGT1A1.98	1159(C>T)	P387S	4		CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*99	UGT1A1.99	801delC	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*100	UGT1A1.100	576(C>G)	Y192X	1		CN1	-	Servedio V.
UGT1A1*101	UGT1A1.101	1060(T>C)	W354R	3		CN2	-	Servedio V.
UGT1A1*102	UGT1A1.102	111(C>A)	P34Q	1		CN2	-	Servedio V.
UGT1A1*103	UGT1A1.103	1207(C>T)	R403C	4		CN2	-	Servedio V.

Naziv alela	Protein	Nucleotidna izmena	Izmena amino kiseline	Egzon	Efekat	Fenotip	Enzimska aktivnost In vivo	Referenca
UGT1A1*104	UGT1A1.104	IVS1-1 (G>A)		Intron 1		CN2	-	Servedio V.
UGT1A1*105	UGT1A1.105	IVS4+1 (G>T)		Intron 4		CN2	-	Servedio V.
UGT1A1*106	UGT1A1.106	1433(C>A)	A478D	5		CN2	-	Servedio V.
UGT1A1*107	UGT1A1.107	118(T>C)	W40R	1		CN2	-	Petit F.
UGT1A1*108	UGT1A1.108	396-401del CAACAA	H132Q ; N133 K134del	1		CN2	-	Petit F.
UGT1A1*109	UGT1A1.109	554(A>C)	Q185P	1		CN2	-	Petit F.
UGT1A1*110	UGT1A1.110	1(A>G)		1		CN2	-	Petit F.
UGT1A1*111	UGT1A1.111	470insT	izmenjen okvir čitanja	1	izmenjen okvir čitanja	CN2	neaktivan	Rosatelli MC.
UGT1A1*112	UGT1A1.112	-1353(C>A)		Promotor		-	-	Ueyama H.
UGT1A1*113	UGT1A1.113	1477(G>C)	G493R	5		CN2	-	Yusoff S

1.3. Hiperbilirubinemije

Hiperbilirubinemije se mogu podeliti na one koje se javljaju usled povećane proizvodnje bilirubina tokom pojačane hemolize i na one koje su rezultat smanjene ekskrecije bilirubina (hepatičnog ili intestinalnog), kao i na hiperbilirubinemije koje nastaju kombinacijom ova dva uzroka. Poremećaji konjugovanja bilirubina mogu biti prouzrokovani toksičnim hepatitisom, virusnim hepatitisom, cirozom, neonatalnom žuticom, laktacionom žuticom i urođenim genetičkim defektima (Slika 12).

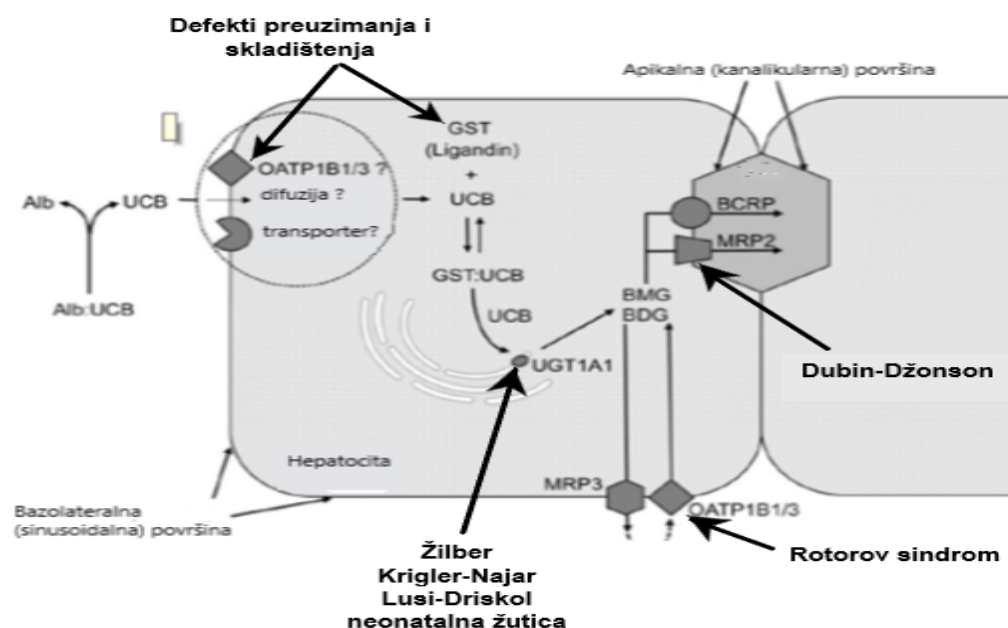


Slika 12. Diferencijalna dijagnoza hiperbilirubinemija (Strassbourg, 2010)

1.3.1. Nasledne hiperbilirubinemije

Sindromi hiperbilirubinemije koji su genetički uslovljeni mogu biti posledica povećanja produkcije bilirubina ili smanjenja klirensa bilirubina. Povećana produkcija bilirubina nastaje kao posledica intenzivne hemolize (manjak eritrocitnih enzima (npr. G6PD ili piruvat kinaze), sferocitoza, talasemije (α , β - δ), nedostatak vitamina K), dok smanjena ekskrecija bilirubina može biti posledica četiri poremećaja: 1) preuzimanja i skladištenja nekonjugovanog bilirubina u jetri, 2) konjugacije bilirubina glukuronskom kiselinom (Žilberov sindrom (eng. Gilbert Sy), Krigler-Najarov sindrom (eng. Crigler-Najjar Sy), Lusi-Driskolov sindrom (eng. Lucey-Driscoll Sy), neonatalna ili fiziološka žutica, 3) ekskrecijom bilirubina u žučnu kesu (Dabin-Džonsonov sindrom (eng. Dubin-Johnson Sy) ili preuzimanje konjugovanog bilirubina (Rotorov sindrom (eng. Rotor Sy)) (Memon et al, 2016).

Nasledne hiperbilirubinemije se javljaju kao posledica promena u genima koji učestvuju u bilo kojem od 4 navedena procesa klirensa bilirubina (Slika 13).



Slika 13. Šematski prikaz transportera i enzima uključenih u nasledne poremećaje izlučivanja (klirensa) bilirubina. (Alb-albumin; BCRP – protein (breast cancer resistance protein); BMG-bilirubin monoglukuronid; BDG-bilirubindiglukuronid; CN, Krigler-Najarov, DJS, Dubin-Džonsonov; ŽS, Žilberov sindrom; sindrom; GST-glutation-S-transferaza; MRP- protein vezan za otpornost na više lekova (multidrug resistance-associated protein; OATP-transportni protein organskih anjona (organic anion transport protein); RS, Rotorov sindrom; UCB – nekonjugovani bilirubin (unconjugated bilirubin); UGT-uridin difosfat glukuronozil transferaza (Memon et al,2016).

1.3.1.1. Poremećaji konjugovanja bilirubina

Nasleđeni poremećaji konjugacije bilirubinadovode do Žilberovog sindroma, Krigler-Najarovog sindroma tip 1 i Krigler-Najarovog sindroma tip 2.

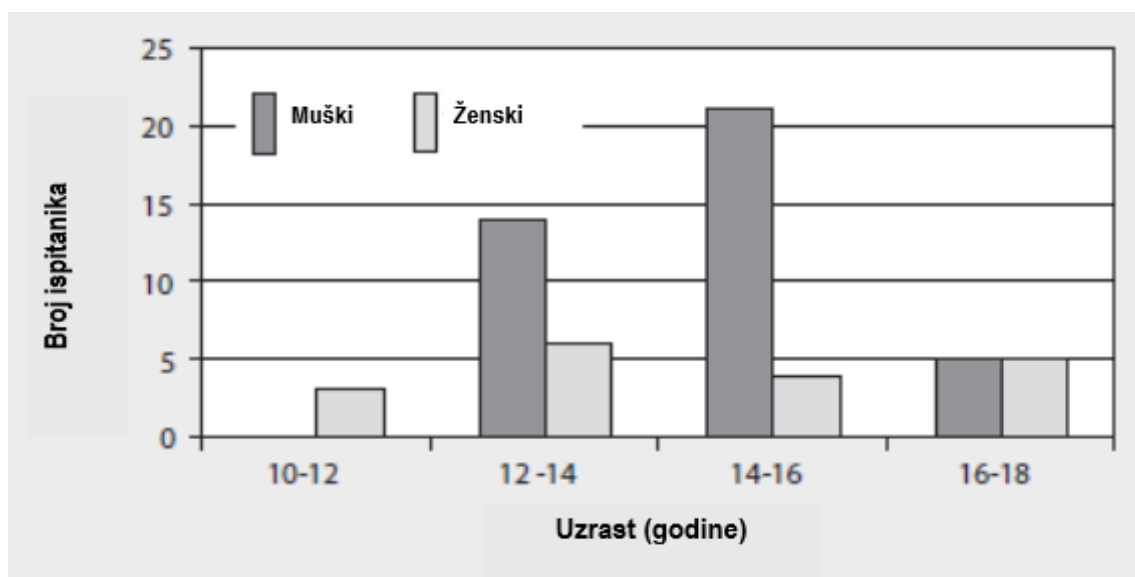
Žilberov sindrom

Žilberov sindrom (ŽS) je prvi put opisan 1901. godine od strane Žilbera i Lerebula (eng. Gilbert i Lereboullet). ŽS se manifestuje blagom, povremenom nekonjugovanom hiperbilirubinemijom koja nije izazvana hemolizom i oboljenjem jetre (Sherlock et al, 1997; Koeler, 2003). S obzirom da se radi o prolaznoj hiperbilirubinemiji, utvrđeno je da ŽS ne vodi ka hroničnoj inflamaciji jetre, histološkim promenama ili progresivnoj fibrozi, a takođe nema indicija da ŽS vodi oboljevanju jetre, niti da utiče na trajanje životnog veka pacijenata (Strassburg, 2010). Pokazalo se da veći rizik nose invazivne dijagnostičke procedure kao što

su biopsije i endoskopske holangiografije, koje su nepotrebne ukoliko se pravilno interpretira klinička slika fluktuirajuće nehemolitičke hiperbilirubinemije.

Klinička slika i dijagnoza Žilberovog sindroma

ŽS se najčešće javlja kod osoba muškog pola u detinjstvu ili ranoj adolescenciji. Bilirubinemija se registruje u fazi skoka bilirubina i sa pojavom žute prebojenosti kože i sluzokože (ikterus). Ikterus se pojačava tokom infekcija, fizičkog zamaranja, gladovanja, emotivnog stresa, medikamentozne terapije, konzumiranja alkohola, operativnih zahvata, trudnoće i promene spoljašnje temperature (Mitrović et al, 2013). Ključni faktor za dijagnozu ŽS je fluktuirajuća hiperbilirubinemija sa odsustvom hemolize. Najčešći simptomi su mučnina, neodređeni bol ispod desnog rebarnog luka, gubitak apetita, i poremećaji varenja hrane. Osim toga javljaju se i psihički i vegetativni simptomi kao što su razdražljivost, nesаница, depresija, nervoza, strah, tahikardija, glavobolja i znojenje. ŽS se retko ispoljava pre puberteta, što se objašnjava uticajem polnih hormona na ispoljavanje patološkog gena. ŽS se javlja 2-7 puta češće kod pripadnika muškog pola (Slika 14) (Radlović et al, 2007).



Slika 14. Distribucija dece sa ŽS prema polu i uzrastu (Radlović et al, 2007).

U literaturi postoje informacije o inhibitornom dejstvu niskih koncentracija testosterona na glukuronidaciju β -estradiola putem inhibicije aktivnosti UGT1A1 enzima (Liu et al 2011), kao i informacije o postojanju korelacije inhibitornog efekta određenih lekova na glukuronidaciju β -estradiola (koji se najčešće koristi u eksperimentalnom radu kao supstrat za *in vitro* glukuronidaciju enzimom UGT1A1) i na glukuronidaciju bilirubina (Zhou et al,

2010). Zbog toga postoji mogućnost da testosteron ima inhibitorno dejstvo i na glukuronidaciju bilirubina, te da bi nagli skok koncentracije testosterona u pubertetu kod dečaka mogao da bude uzrok hiperbilirubinemije i ranijeg otkrivanja ŽS kod dečaka nego kod devojčica.

Genetička osnova i obrazac nasleđivanja Žilberovog sindroma

Kada je 50 godina nakon opisivanja ŽS otkriven enzim uridindifosfat glukuronidaza koja učestvuje u metabolizmu bilirubina, ustanovilo se da su varijante u ovom genu odgovorne za pojavu ŽS. Do sada je opisano više od 130 različitih varijanti u genu za *UGT1A1* koje se dovode u vezu sa ŽS (Strassburg, 2010). U prvim radovima, prijavljeno je nekoliko familija kod kojih se ŽS nasleđivao sukcesivno kroz generacije (Foulk et al, 1959; Powell et al, 1967; Sleissenger et al, 1967), što je ukazivalo na autozomno dominantni obrazac nasleđivanja (Bosma et al, 1995). Međutim, kasnije je ustanovljeno da je obrazac nasleđivanja ŽS autozomno recesivan (Chrowdhury et al, 2001) i javlja se kod homozigotnih nosilaca određene varijante ili kod složenih heterozigota kada postoje dva različita recesivna alela na datom lokusu (Bosma, 2003).

U opštoj populaciji se javlja sa učestalošću od 3-13% (Travan et al, 2014; Owens et Evans 1975). ŽS, kao umereni oblik nekonjugovane hiperbilirubinemije, uzrokovan je promenama u broju TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1* gena. Nemutirani *UGT1A1* promotor ima šest TA ponovaka [A(TA)₆TAA] u promotorskom regionu, *UGT1A1**1alel. Transkripciona aktivnost *UGT1A1* gena zavisi od broja TA ponovaka. *UGT1A1**28, *UGT1A1**37 i *UGT1A1**36 varijante imaju sedam, osam i pet TA ponovaka, respektivno. Veći broj TA ponovaka u promotoru *UGT1A1* gena dovodi do smanjenja UGT1A1 enzimske aktivnosti. Heterozigotni status *UGT1A1**28 dovodi do smanjenja UGT1A1 enzimske aktivnosti za 25%, dok homozigotni status ove genetičke varijante smanjuje transkripcionu aktivnost za 70% (Marques et Ikediobi, 2010).

Dijagnostika Žilberovog sindroma

Dijagnoza ŽS se uspostavlja na osnovu anamneze, kliničke slike, laboratorijskih biohemijskih nalaza, fenobarbitonskog testa i testa gladovanja (Radlović et al, 2007). Konačna potvrda ŽS je moguća genetičkom analizom promotorskog regiona *UGT1A1* gena.

Referentne vrednosti bilirubina kod zdravih ispitanika su od 5 do 21 μ M/L, a vrednosti totalnog bilirubina u serumu kod ŽS fluktuiraju između 20-50 μ M/L, i retko prelaze 85 μ M/L (Hirschfield et Alexander, 2006).

U slučaju sumnje na ŽS usled povećanih referentnih vrednosti bilirubina, kao sledeće dijagnostičke procedure izvode se test gladovanja i fenobarbitonski test.

Gladovanje je stresogeni faktor koji kod pacijenata sa ŽS dovodi do prolazne hiperbilirubinemije. Sprovodi se tako što pacijenti u toku tri dana imaju unos od 400kcal/danu. Nivo ukupnog i nekonjugovanog bilirubina se meri u intervalima 0h, 24h i 48h standardnim laboratorijskim procedurama (Mendoza-Hernandez et al, 1997). Dijagnoza ŽS je moguća kod 82% ispitanika nakon 24h, dok je nakon 48h moguće dijagnostikovati sve pacijente sa ŽS. U toku 48h od početka testa gladovanja dolazi do skoka nekonjugovanog bilirubina u plazmi, koji se vraća na normalni nivo u roku od 24h od uvođenja normalne ishrane. Takođe, dijagnostički značaj ovog testa je u tome što omogućava diferencijalnu dijagnozu između ŽS i hemolitičke bolesti tako što u toku sprovođenja testa dolazi do skoka nivoa bilirubina i kod bolesnika sa hemolitičkom bolešću, ali je taj skok niži nego kod bolesnika sa ŽS (Mitrović et al, 2013).

Poznato je već decenijama da tretman fenobarbitonom kod pacijenata sa hiperbilirubinemijom dovodi do povećane ekspresije *UGT1A1* gena u jetri. Pokazano je da fenobarbiton svoje dejstvo ispoljava vezujući se za definisanu pojačivačku tzv. enhancersku DNK sekvencu *UGT1A1* gena (-3483/-3194) (Sugatani et al, 2001). Fenobarbitonski test se sprovodi u trajanju od tri dana gde se pacijentima daje 2mg fenobarbitona po kilogramu telesne mase na dan (2mg/kg/dan). Koncentracija ukupnog i konjugovanog bilirubina u serumu meri se u intervalima 0h, 24h i 48h.

Nivo nekonjugovanog bilirubina izračunava se matematički kao razlika između ukupnog i konjugovanog bilirubina.

Pregled referentnih vrednosti bilirubina kod novorođenčadi i odraslih osoba dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Referentne vrednosti bilirubina kod novorođenčadi i odraslih

Bilirubin (serum)*		SI jedinice	Tradicionalne vrednosti
Novorođenčad	konjugovani	0-10 $\mu\text{mol/L}$	0-0.6 mg/dL
	ukupni	1.7-180 $\mu\text{mol/L}$	1.0-10.5 mg/dL
Odrasli	konjugovani	0-5 $\mu\text{mol/L}$	0-0.3 mg/dL
	ukupni	3-22 $\mu\text{mol/L}$	0.2-1.3 mg/dL

*Faktor konverzije za tradicionalne vrednosti bilirubina u serumu u SI jedinice je 17,1

(www.royalcollege.ca/rcsite/documents/.../clinical-lab-tests-reference-values-e.pdf)

Krigler-Najjarov sindrom

Krigler-Najjarov sindrom obuhvata dve izuzetno retke bolesti: Krigler-Najjarov sindrom tip 1 (eng. Crigler-Najjar, CN1) i Krigler-Najjarov sindrom tip 2 (CN2). Oba oboljenja se nasleđuju po autozomno recesivnom obrascu, i pacijenti su homozigoti za određenu genetičku varijantu ili su složeni heterozigoti. Javljaju se sa učestalošću manjom od 1 na 10^6 živorođenih (Radlović, 2014). CN1 i CN2 se razlikuju u stepenu smanjenja funkcije UGT1A1 enzima. Kompletno ili skoro kompletno odsustvo sposobnosti glukuronidacije bilirubina, a time i nemogućnost uklanjanja bilirubina iz organizma nije kompatibilno sa životom.

Krigler-Najjarov sindrom tip 1

CN1 je prvi put opisan 1952. godine kao kongenitalna familijarna nehemolitička žutica sa kernikterusom (Crigler et Najjar, 1952). Klinička manifestacija CN1 se javlja ubrzo nakon rođenja sa izrazito visokim koncentracijama bilirubina (više od 20-50mg/dl) u serumu, što dovodi do bilirubinske encefalopatije, kernikterusa i smrti. Kod CN1 sa potpunim gubitkom aktivnosti bilirubin UDP-glukuroniltransferaze, detektovane su mutacije u 2, 3 i 4 egzonu *UGT1A1* gena (Strassburg, 2010). S obzirom da se radi o mutacijama u stalnim egzonima, svi transkripti koji nastanu u kombinaciji sa promenljivim egzonima davaće nefunkcionalne enzime koji su izgubili sposobnost glukuronidacije supstrata. Takođe, prijavljene su i neke mutacije u intronima koje dovode do pomeranja okvira čitanja i stvaranja prevremenih stop kodona. Bilirubin je produkt metabolizma hema, koji nema alternativni put glukuronidacije, tako da gubitak enzimske aktivnosti UGT1A1 vodi akumulaciji bilirubina u serumu više od 20-50mg/dL, ubrzo nakon rođenja. Jedine terapijske primene su ponovljene transfuzijske

izmene krvi, dugotrajne fototerapije, plazmafereze, hemoperfuzije, i konačno jedina efikasna terapija je transplantacija jetre. Stimulacija fenobarbitonom u ovim slučajevima nije efikasna.

Ne postoji jednostavan test kojim bi se potvrdila dijagnoza CN1. Definitivna dijagnoza moguća je detaljnom analizom *UGT1A1* gena i sekvenciranjem kodirajućih regiona. Mutacije koje se najčešće javljaju kod CN1 su delecije koje dovode do prevremenog prekida transkripcije ili delecija ključnih aminokiselina u bilo kom od 5 stalnih egzona *UGT1A1* gena. Većina mutacija u 5 stalnih egzona otkrivenih kod CN1, pogađaju većinu UGT1 enzima, zbog toga što ove mutacije vode gubitku sposobnosti vezivanja glukuronida i glukuronidacije supstrata.

Krigler-Najarov sindrom tipa 2

Kriegler-Najarov sindrom tipa 2 opisan je prvi put 1962. godine (Arias et al, 1962). Karakteriše se izrazito smanjenom ali ne i izgubljenom enzimskom aktivnosti UGT1A1 ispod 10% od normalne aktivnosti. Genetičke promene u *UGT1A1* genu koje vode smanjenoj aktivnosti enzima su uglavnom tačkaste mutacije, koje dovode do zamene pojedinačne aminokiseline što dovodi do smanjenja (ali ne i gubitka) enzimske aktivnosti. Nivo serumskog bilirubina ne prelazi 20mg/dL, a efikasno se snižava za više od 30% dejstvom fenobarbitona (Seppen et al, 1994). Hiperbilirubinemija kod CN2 je mnogo umerenija nego u CN1 i retko dovodi do kernikterusa.

Kao diferencijalna dijagnoza za razlikovanje CN1 i CN2, analiziraju se konjugati bilirubina. U CN1 konjugati bilirubina su prisutni u neznatnim tragovima, dok je kod CN2 monokonjugovani bilirubin prisutan u značajnim koncentracijama (Lee et al, 2001). Pacijenti sa CN2 imaju dobru prognozu, s obzirom da tretman agresivnom fototerapijom i fenobarbitonom daju dobre rezultate u snižavanju koncentracije serumskog bilirubina.

Lusi-Driskolov sindrom (eng. Lucey-Driscoll syndrome) je opisan 1960. godine kao retko familijarno oboljenje koje dovodi do teške nekonjugovane bilirubinemije u prvim danima života (Arias et al, 1965). Prema prvim nalazima pokazalo se da se u serumu majke i novorođenčeta nalazi neidentifikovani inhibitoraktivnosti UGT1A1 enzima, što dovodi do teške hiperbilirubinemije u prvim danima života koja može uzrokovati kernikterus i smrt novorođenčeta. Međutim, kod novorođenčadi, koja uz pomoć intenzivne fototerapije i transfuzije prežive ovaj prvi skok bilirubina, ne pojavljuju se ponovo epizode sa

hiperbilirubinemijom. Nakon prvog objavljenog rada o ovom sindromu, nisu opisani novi slučajevi, tako da je do danas postojanje ovog sindroma ostalo upitno (Memon et al, 2016).

Neonatalna ili fiziološka žutica se javlja 4-7 dana nakon rođenja i može da potraje 3-4 meseca pre nego što spontano nestane. Radi se benignoj i relativno čestoj pojavi nekonjugovane bilirubinemije kod zdrave novorođenčadi koja se hrane majčinim mlekom. Iako je etiologija ovog tipa hiperbilirubinemije nepoznata, postoje indicije da određene komponente iz majčinog mleka imaju uticaja na patogenezu. Takođe je pokazano i da su genetičke varijante koje su pronađene kod ŽS prisutne i kod dece kod koje se javila neonatalna žutica. Na osnovu tih saznanja može se zaključiti da se neonatalna žutica javlja kao posledica kombinacije genetičkih i sredinskih faktora (Memon et al, 2016).

1.3.1.2 Poremećaji ekskrecije bilirubina

Dubin-Džonsonov sindrom (eng. Dubin-Johnson Syndrome - DJS) je hronična, uglavnom konjugovana, nehemolitička hiperbilirubinemija. Genetička osnova ovog sindroma je u pojavi mutacija u genima *ABCC2* i *MRP2* koje mogu biti prisutne u homozigotnom stanju ili kao složeni heterozigoti. Ove mutacije dovode do smanjene ekspresije ovih transportera, a samim tim i smanjene ekskrecije bilirubina. DJS ne zahteva nikakvu terapiju, međutim njegova dijagnoza je značajna za diferencijalnu dijagnozu drugih poremećaja hepatobilijarnog sistema.

1.3.1.3. Poremećaji preuzimanja i skladištenja bilirubina u hepatocitama

Rotorov sindrom se javlja kao posledica defekata u transporterskom sistemu *SLCO1A1/OATP1B1* i *SLCO1B3/OATP1B3*, što dovodi do smanjene sposobnosti preuzimanja bilirubina i skladištenja bilirubina u hepatocitama. Ovaj sindrom ne zahteva nikakvu terapiju, međutim kao i kod DJS neophodna je dijagnoza zbog diferencijalne dijagnoze od ozbiljnijih hepatobilijarnih oboljenja.

1.3.2. Hiperbilirubinemije uzrokovane hemolizom i drugim bolestima jetre

Neuobičajeno visok nivo bilirubina se javlja kod osoba koje su nosioci rizičnih genotipova za pojavu ŽS, a kod kojih je ovaj genotip udružen sa pojačanom razgradnjom eritrocita koja prati stanja kao što je heterozigotnost za β -talasemiju, β -talasemiju intermediju, neonatalnu žuticu vezanu za deficijenciju glukoze-6-fosfo dehidrogenaze (G6PD), naslednu sferocitozu, kongenitalnu diseritropoetsku anemiju tipa II i anemiju srpastih ćelija (Premawardhena et al, 2003).

1.3.2.1. Talasemijski sindromi

Hemoglobinopatije su heterogena grupa naslednih anemija. Javljaju se usled mutacija u jednom ili više gena koji kodiraju globinske polipeptidne subjedinice hemoglobinskog tetramera. Ukoliko se radi o odsustvu ili smanjenoj sintezi globinskih lanaca govorimo o kvantitativnim hemoglobinopatijama koje se nazivaju talasemije. Kvalitativne hemoglobinopatije su posledica varijacija u aminokiselinskoj sekvenci molekula hemoglobina. U ovim slučajevima prisutna je dovoljna količina mutiranih globinskih polipeptida koji učestvuju u izgradnji molekula hemoglobina sa izmenjenim fizičkim i hemijskim svojstvima. Međutim, razvoj molekularne genetike je doveo i do boljeg shvatanja nastanka hemoglobinopatija, kao i do preciznije diferencijacije oboljenja. Naime, ispostavilo se da neke hemoglobinske varijante (npr HbE, Hb Lepore; Hb Constant Spring) imaju mutirane polipeptide, koji se sintetišu u smanjenoj količini, te se u tim slučajevima radi ipak o talasemijskim poremećajima. Tako se došlo do pojma talasemijski sindromi koji obuhvata sve hemoglobinopatije koje se karakterišu defektom u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobina (Pavlović,2006). Hemoglobin je tetramerni molekul koji se sastoji od dva para različitih globinskih lanaca (α i β) i četiri prostetične hem-grupe od kojih je svaka smeštena unutar globinskih subjedinica. Hemoglobinski tetrameri su izuzetno solubilni.

Talasemijski sindromi su autozomno recesivna monogenska oboljenja nastala kao posledica mutacija u genima za globinske lance. Mogu se naslediti u heterozigotnom ili homozigotnom obliku ili kao dvostruki heterozigoti. Ako je sinteza α -globinskog lanca smanjena reč je o α -talasemijama. Smanjena ili potpuno odsutna sinteza β -globina dovodi do β -talasemije (Pavlović,2006). β -talasemijski sindromi se po težini kliničke slike dele na: β -talasemija minor, β -talasemija intermedija i β -talasemija major.

Kao posledica mutacija u globinskim genima dolazi do smanjene sinteze α - ili β -globinskog lanca, dok se nemutirani lanac normalno sintetiše. Slobodni nemutirani globinski lanci su nesporeni i nalaze se u višku, a kako su vrlo nesolubilni stvaraju nestabilne agregate koji podležu oksidaciji i precipitaciji u ćeliji. Kod β -talasemija, α -globinski lanci stvaraju agregate poznate kao inkluziona tela. Kod α -talasemija formiraju se homotetrameri (HbH (β_4) i intrauterino-Hb Bart (γ_4)) koji sporije precipitiraju od α -globinskih lanaca. Ovi precipitati dovode do fizičkog i oksidativnog oštećenja ćelijske membrane, što rezultira prevremenom destrukcijom eritroidnih ćelija u retikuloendotelnom sistemu slezine i hemolizom. Agregati

se formiraju i precipitiraju i u eritroidnim prekursorima kostne srži i odgovorni su za izraženu neefikasnu eritropoezu i destrukciju eritroidnih ćelija u kosnoj srži (Pavlović, 2006).

Hematološki parametri karakteristični za talasemije su snižene vrednosti:

- hemoglobina, (normalne vrednosti za žene 120-160g/l i za muškarce 140-180g/l)
- MCV - srednji volumen eritrocita, (normalna vrednost 85-95fl), je mera za mikrocitozu,
- MCH - prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu, (normalne vrednosti 27-32pg), je mera za hipohromiju i
- RDW - distribucija eritrocita po volumenu, normalne vrednosti 8,5-11,5%, je mera za anizocitozu (nejednakost veličine eritrocita).

Kod talasemija se javlja nedovoljna akumulacija hemoglobina, što rezultira hipohromijom i mikrocitozom, kao i neizbalansirana akumulacija pojedinih globinskih subjedinica, što dovodi do neefikasne eritropoeze i hemolitičke anemije. Kod zdravih osoba odnos sinteze α/β -lanaca je oko 1.

Kod β -talasemija minor nivo hemoglobina nije značajno snižen, dok su MCH i MCV značajno niži, a vrednosti zavise od dobi i pola. β -talasemija intermedija je grupa talasemijskih sindroma sa ublaženom kliničkom slikom koja je rezultat različitih molekularnih mehanizama koji mogu ublažiti manjak β -globinskih lanaca u ćeliji. β -talasemija major se javlja kod osoba kod kojih su mutirana oba β -globinska alela što daje tešku kliničku sliku mikrocitne, hipohromne, hemolitičke anemije koja vodi do letalnog ishoda ukoliko se ne primenjuje stalna transfuzija. Odlikuje se izrazitom patološkom morfologijom ćelija crvene loze, anizocitozom (nejednakost veličine eritrocita) i poikilocitozom (nejednakost oblika eritrocita) i prisustvom ćelija koje podsećaju na metu.

Pojačana hemoliza vodi i ka povećanom nivou bilirubina u serumu, a samim tim i pojavi ikterusa. Stoga je korisno kod pacijenata sa talasemijskim sindromima utvrditi i genetički status za *UGT1A1* gen i u skladu sa tim prilagoditi terapiju. Tako se smanjuju komplikacije usled eventualnog slabijeg metabolizma i ekskrecije bilirubina kod pacijenata sa alelskim varijantama koje utiču na smanjenje aktivnosti UGT1A1 enzima.

Žutica i oboljenja žučne kese su uobičajena komplikacija talasemija intermedija, naročito Hb E- β -talasemija (Weatherall et Clagg, 2001). Kod pacijenata sa Hb E- β -talasemijama kod kojih je prisutan i TA7 alel, javlja se neuobičajeno visok nivo bilirubina, što značajno povećava stopu pojave žučnih kamenaca i oboljenja žučne kese (Premawardhena et al, 2003). U azijskim populacijama, u kojima je visok stepen pojavljivanja Hb E- β -talasemija, sprovedene su populacione studije sa ciljem utvrđivanja učestalosti različitih varijanti *UGT1A1*, te utvrđivanja koje su populacije pod rizikom od pojave komplikacija. Tako se došlo do otkrića da je učestalost TA7 alela vrlo visoka u populacijama Indije i Šri Lanke, gde se i pojava hiperbilirubinemije i žučnih kamenaca kod pacijenata sa Hb E- β -talasemija javlja sa izuzetno visokom učestalošću. Iako nije u potpunosti jasno široka rasprostranjenost i visoka frekvencija *UGT1A1* alela u ovim populacijama, pretpostavlja se da bi moguća evolutivna prednost za održavanje ove varijante u tako visokoj učestalosti, mogla biti usled zaštitne uloge bilirubina od oksidativnog stresa (Paramwardhena et al, 2003).

1.3.2.2. Hronični hepatitis C

Infekcija hepatitis C virusom može da se javi kao akutna infekcija, hronična infekcija, ili kao bolest izvan jetre. Akutna infekcija se retko prepoznaje, s obzirom da su kod većine bolesnika simptomi asimptomatski, ili su simptomi vrlo blagi, poput mučnine, anoreksije, nelagode ili bola u gornjem desnom kvadrantu trbuha, mialgije i atralgije.

Hronični hepatitis C (HHC) je podmukla bolest koja tokom dugog vremenskog perioda nema nikakve simptome ili su simptomi nespecifični. Često postaje uočljiva tek nakon što se razviju komplikacije hronične jetrene bolesti, odnosno ciroza i hepatocelularni karcinom. Većina autora smatra da će se kod 70% – 80% obolelih od infekcije virusom hepatitisa C, razviti hronični oblik, 20% obolelih imaće znakove ciroze jetre u periodu od 10 do 30 godina, uz moguću razvoj hepatocelularnog karcinoma kod 1% – 5% slučajeva tokom godinu dana (Rodger, 2000; Herrera, 2003).

Naime, zbog trajnog štetnog dejstva virusa, hepatociti odumiru, a na njihovom mestu se stvaraju ožiljci vezivnog tkiva i dolazi do fibroze jetre, pri čemu se smanjuje količina funkcionalnog tkiva jetre (Herrera, 2003). Uznapredovali stepen ovog procesa naziva se ciroza. Hronični hepatitis C čest je uzrok ciroze (Herrera, 2003). Progresija fibroze jetre u cirozu jetre može se dogoditi u periodu od nekoliko nedelja ili može trajati godinama. Pacijenti sa HHC mogu imati hronični hepatitis i 40 godina pre nego što se bolest razvije u

cirozu (Wolf, 2012). Međutim pokazalo se da je nakon 45 godina starosti pacijenata, veća verovatnoća za progresiju bolesti, te se zbog toga kod mlađih osoba agresivno pristupa lečenju hepatitisa C iako se kod njih fibroza možda nije razvila (Poynard et al, 2003; Herrera, 2003).

Genotip i viremija nisu se pokazali značajnim prediktorima pojave ciroze jetre (Herrera, 2003).

Laboratorijski testovi koji ukazuju na smanjenu funkciju jetre su visoke vrednosti serumskog bilirubina i albumina i abnormalni parametri koagulacije. Komplikacije uključuju ascites, krvarenje, encefalopatiju i rak jetre (Herrera, 2003).

Čajld-Puova (eng. Child-Pugh) klasifikacija razvijena je za određivanje težine ciroze i uključuje dva klinička (veličinu ascitesa i stupanj portalne encefalopatije) i tri laboratorijska pokazatelja (nivo serumskog bilirubina i albumina i plazmatski nivo protrombinskog vremena) (Degoricija, 2004). Na osnovu ovih pokazatelja određuje se stepen razvijenosti ciroze (Tabela 3).

Tabela 3. Čajld-Puova klasifikacija (Degoricija, 2004).

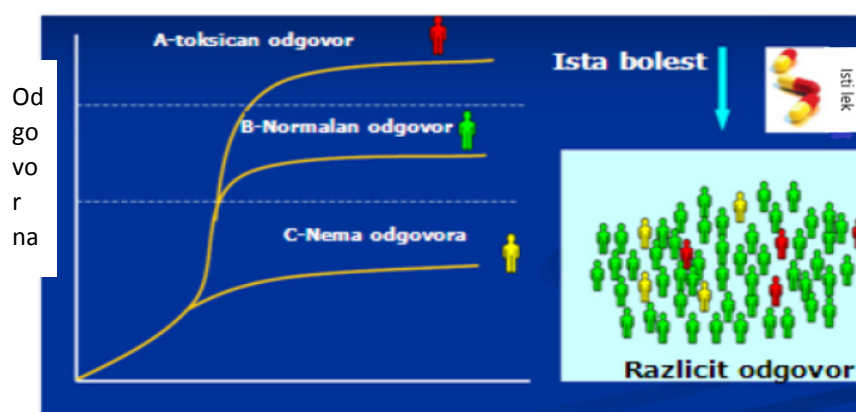
Pokazatelj	Čajld-Pu klasifikacija hepatitisa		
	A	B	C
Ascites	nema	mali_umeren	velik
Portalna encefalopatija	nema	I-II	III-IV
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	<51	51-102	>102
Albumin (gr/L)	>34	25-34	<25
Protrombinsko vrijeme (%)	>60	46-60	<46

Osim infekcije virusom hepatitisa C, u fibrozi jetre i patogenezi HHC važnu ulogu imaju, i genetički faktori i oksidativni stres. S obzirom na povećani nivo bilirubina kod pacijenata sa HHC, koji je jedan od glavnih prognostičkih parametara stepena razvoja bolesti, morao bi se

razmotriti i značaj *UGT1A1* genetičkih varijanti kao mogućih prognostičkih i terapijskih markera HHCi kao prediktora pojave hepatocelularnog karcinoma kod pacijenata sa HHC (Tseng et al, 2005). Do sada, ima vrlo malo istraživanja o povezanosti *UGT1A1**28 genotipa sa stepenom fibroze jetre, viremijom i biohemijskim markerima kod pacijenata koji su uspešno odreagovali na kombinovani antiviralni tretman.

1.4. Personalizovana medicina

U medicini nije novost da pacijenti sa istom dijagnozom ne bi trebalo da se leče na isti način. Još se u antičkoj Grčkoj pristupalo nekoj vrsti individualizacije terapije i tzv. flegmatične osobe su se lečile rashlađenom hranom. Kako je nauka napredovala i kako su dokazi o različitim dogovorima na istu terapiju kod različitih osoba postajali sve prisutniji, tradicionalni pristup lečenju u kojem se za istu bolest svim pacijentima prepisuje istilek u istoj dozipolako se napušta. Sada znamo da je odgovor pacijenta na lek u direktnoj zavisnosti od genetičke osnove same osobe. Saznanje da ne postoji „prosečan pacijent“ koji će uvek reagovati na isti način na isti lek i da ne postoji „prosečna terapijska doza“ koja će dovesti do istog farmakološkog i terapijskog učinka kod svih pacijenata uvod je u novu eru personalizovanog pristupa lečenju (Slika 15).

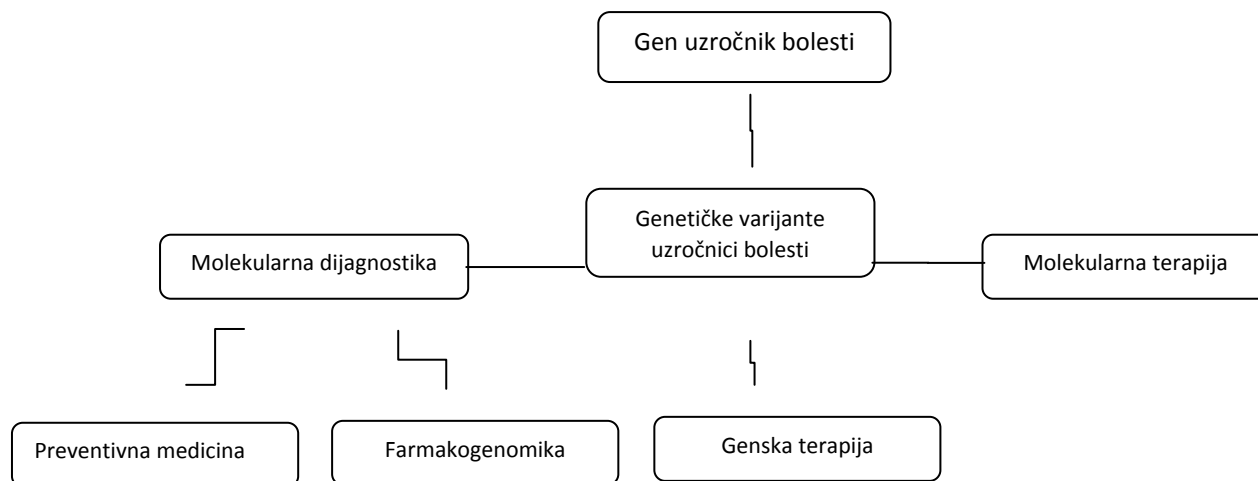


Log koncentracija leka

Slika 15. Tri moguća terapijska odgovora kod pacijenata sa istom bolešću kojima je dat isti leku istoj terapijskoj dozi (Mujagić et Mujagić, 2012).

Personalizovana medicina je medicina koja je zasnovana na poznavanju genoma. Prilikom ovakvog pristupa lečenju pacijenata koriste se znanja o genetičkoj osnovi bolesti, kao i znanja o individualnom odgovoru na terapiju, koja direktno zavise od sposobnosti svakog pojedinca da metabolizuje lekove, što je posledica genetičkih različitosti među ljudima. Personalizovana medicina se danas naziva još i genomska medicina, individualizovana medicina i egzaktna medicina (eng. precision medicine) (Pavlovic et al, 2017). Zahvaljujući ovakvom pristupu, akumulaciji znanja iz genetike i molekularne biologije, kao i razvojem sofisticiranih metoda, došlo se do velikog napretka u prevenciji, dijagnostici i lečenju bolesti. Posebna vrsta studija koje su doprinele primeni personalizovane medicine u kliničkoj praksi su analize velikog broja genetičkih markera kod različitih osoba obolelih od istog tipa bolesti i utvrđivanje povezanosti tih markera sa patološkim fenotipom (engl. Genome-wide association study, GWAS) (Bush et Moore, 2012).

Strategije zdravstvene zaštite koja je već usvojila personalizovanu medicinu zasniva se na nekoliko ključnih aktivnosti: dijagnostika na osnovu analize genetičkih markera i ekspresije gena, farmakogenomika, specifična molekularna, genska i ćelijska terapija, prediktivna genetika i preventivna medicina (Slika16) (Pavlović et al, 2014).



Slika 16. Strategije zdravstvene zaštite bazirane na personalizovanoj medicini (Pavlovic et al, 2014)

1.4.1. Farmakogenetika/farmakogenomika kao osnov za primenu personalizovane medicine

Farmakogenetika je naučna oblast nastala kasnih 1950-tih godina, sintezom farmakologije i genetike. Farmakologija se primarno bavila farmakokinetikom („delovanje organizma na lek“) koja je odnos između profila koncentracija leka postignutih u različitim delovima organizma i farmakodinamikom („delovanje leka na organizam“) koja se vezuje za događaje koji slede posle interakcije leka sa njegovim receptorom (Rang et al, 2005). Međutim ustanovljeno je da na metabolizam leka u organizmu utiču brojni faktori: genetičke varijante u genu koji kodira enzim koji učestvuje u metabolizmu tog leka, greške u transkripciji ili translaciji zbog kojih se ne sintetiše dovoljna količina enzima, promene u promotorskom regionu koje vode ka izmenjenom afinitetu za inducer ili supresor gena (induceri dovode do povećane ekspresije gena, a supresori do smanjene). Ove promene u genomu i posledice tih promena na metabolizam lekova proučava farmakogenetika, tj. ona proučava vezu genetičke varijabilnosti i individualnog odgovora na terapiju lekovima.

Istraživanja u ovoj oblasti se vrše sa ciljem otkrivanja genetičkih markera i njihovih varijanti koji su uzrok individualnog odgovora na pojedine terapeutike. Drugi aspekt istraživanja je identifikacija gena i genskih produkata koji su u korelaciji sa različitim patološkim stanjima, a koji mogu biti meta za nove generacije lekova (Wolf et al, 2000).

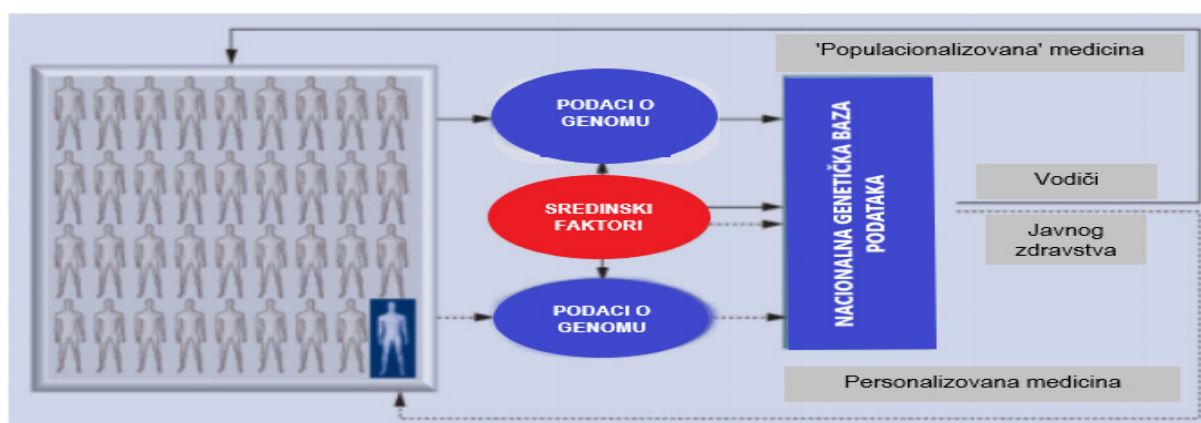
U novije vreme, se pojavio i pojam farmakogenomike koja predstavlja glavni stub personalizovane medicine. Farmakogenomika je farmakogenetika primenjena na ceo genom (Pavlovic et al, 2017). Razlika između farmakogenetike i farmakogenomike je u tome što farmakogenetika istražuje nasledne promene u pojedinačnim genima, a farmakogenomika istražuje uticaj genoma kao celine u reakciji na lekove (Mujagić et Mujagic, 2012). Farmakogenomika integriše informacije dobijene primenom savremenih naučnih metoda kao što su: DNK sekvenciranje, funkcionalne genomske analize, DNK mikroerej, erej za genotipizaciju, SNP ereji, sekvenciranje nove generacije kao i rezultate GWAS studija, što za rezultat ima individualizaciju terapije. U svetlu novih znanja, došlo se do shvatanja da je pređašnji pristup lečenju „jedna doza leka za sve pacijente“ postao neprimeren u današnjoj kliničkoj praksi. U savremenoj medicini izbor leka i određivanje doze se vrši prema specifičnom genetičkom zapisu pacijenta. Na osnovu svega do sada navedenog, možemo reći da je primena farmakogenomike u kliničkoj praksi značajno doprinela individualizaciji terapije u skladu sa genotipom i profilom ekspresije gena pacijenta. Danas su dostupni

farmakogenetički testovi za nekoliko farmakogenomičkih markera (TPMT, UGT1A1, CYP2C9, VKORC1) i testiranje je ili obavezno ili se preporučuje pre započinjanja terapije (Pavlović et al, 2014). Ovim testiranjem se omogućava da svaki pacijent dobije odgovarajući lek, kao i adekvatnu dozu leka u skladu sa svojim genetičkim statusom, čime se smanjuje broj neželjenih efekata i komplikacija do kojih bi moglo doći usled neprimljene doze i pogrešnog izbora leka.

Agencije za kontrolu lekova: američka FDA (engl. American Food and Drug Administration), evropska EMA (eng. European Medicines Agency) i japanska PMDA (eng. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Japan), su za određene lekove navele informacije o preporučenim farmakogenetičkim testovima. Za više od 170 lekova je poznato koja genetička varijanta utiče na metabolizam, a za 64 leka postoje uputstva za doziranje na osnovu genotipa (Pavlovic et al, 2014).

1.4.1.2 Populaciona farmakogenomika

Istraživanja u oblasti populacione farmakogenomike su pokazala da je od izuzetne važnosti utvrditi koji farmakogenomički markeri su karakteristični za određenu populaciju ili etničku zajednicu (Matte et al, 2012). Ovakva istraživanja i informacije dobijene iz njih, su ključni da bi se u zdravstvenom sistemu jedne zemlje moglo uvesti individualizovano lečenje zasnovano na genotipu populacije (Slika 17).



Slika 17. Farmakogenomika u personalizovanoj i “populacionalizovanoj” medicini (Matte et al, 2012).

U skladu sa tim, u zadnjih 10 godina urađena su brojna istraživanja sa ciljem utvrđivanja populacione specifičnosti distribucije farmakogenetičkih markera. Značajne razlike u

frekvencama farmakogenetičkih markera kod kavkaskih, afričkih i azijskih naroda, kao i kod pojedinačnih populacija se moraju imati u vidu ukoliko se određene bolesti (kao npr. malarija, HIV/AIDS, tuberkuloza), u nekim populacijama javljaju sa velikom učestalošću, a u terapiji bolesti se koriste lekovi koji su supstrati za te farmakogenetičke markere, te je od izuzetne važnosti raspolagati sa farmakogenomičkim informacijama za tu populaciju. Na taj način mogu se predvideti rizici za pojavu neželjenih efekata i komplikacija na terapiju lekovima. Implementacija farmakogenomike u nacionalni zdravstveni sistem obezbeđuje bolji tretman pojedinačnog pacijenta, a osim toga ima i svoju ekonomsku opravdanost zbog efikasnijeg lečenja i smanjene stope neželjenih efekata i komplikacija.

U svrhu bržeg uvođenja farmakogenomike u kliničku praksu pokrenut je internacionalni „PGENI“ projekat (eng. Pharmacogenomics for Every Nation Initiative – PGENI). „PGENI“ projekat ima za cilj se formira baza podataka o genomskim rizicima prilikom određivanja medikamentozne terapije za svaku zemlju. Ovakva baza podataka bi pomogla da se u zdravstvenom sistemu svake zemlje uvede personalizovano lečenje bazirano na genotipu populacije. Srbija je aktivni član „PGENI“ projekta.

1.5. *UGT1A1* kao farmakogenetički marker

Smanjena aktivnost UGT1A1 enzima, praćena povišenim nivoom bilirubina u serumu, u većini slučajeva ukazuje na benigna stanja. Međutim, smanjena aktivnost ovog enzima se pokazala izuzetno značajnim indikatorom u kontekstu toksičnosti velikog broja lekova. Mnoge egzogene supstance, mutageni ksenobiotici i terapijski lekovi su ili supstrati ili inhibitori za UGT1A1 enzim. Osim toga hemijska jedinjenja mogu da imaju i ulogu u indukciji ili inhibiciji ekspresije gena. U zadnjih deset godina intenzivno se proučavala interakcija velikog broja lekova, sekundarnih metabolita biljaka i brojnih drugih hemijskih jedinjenja iz spoljašnje sredine sa UGT1A1 enzimom i *UGT1A1* genom. Otkriveno je da UGT1A1 enzim ima višestruka ligand-vezujuća mesta, te se pristupilo razvoju brojnih proba specifičnih za mesta vezivanja što je dovelo do važnih saznanja o interakciji UGT1A1 enzima i njegovih liganda. Takođe su proučavane interakcije različitih lekova međusobno (eng. drug-drug interactions D/DI), ili lekova i biljnih sekundarnih metabolita (eng. drug/herbal drug interactions - D/HDI). Pokazalo se da je izuzetno važno poznavati ove interakcije, s obzirom na ozbiljnost neželjenih efekata i komplikacija usled neadekvatnog kombinovanja lekova, kao i nepoznavanja genotipa.

Najveći farmakogenetički klinički značaj ima varijanta *UGT1A1**28, naročito kod upotrebe lekova koji su supstrati za UGT1A1 enzim, i koriste se u lečenju karcinoma (Marques et Ikediobi, 2010).

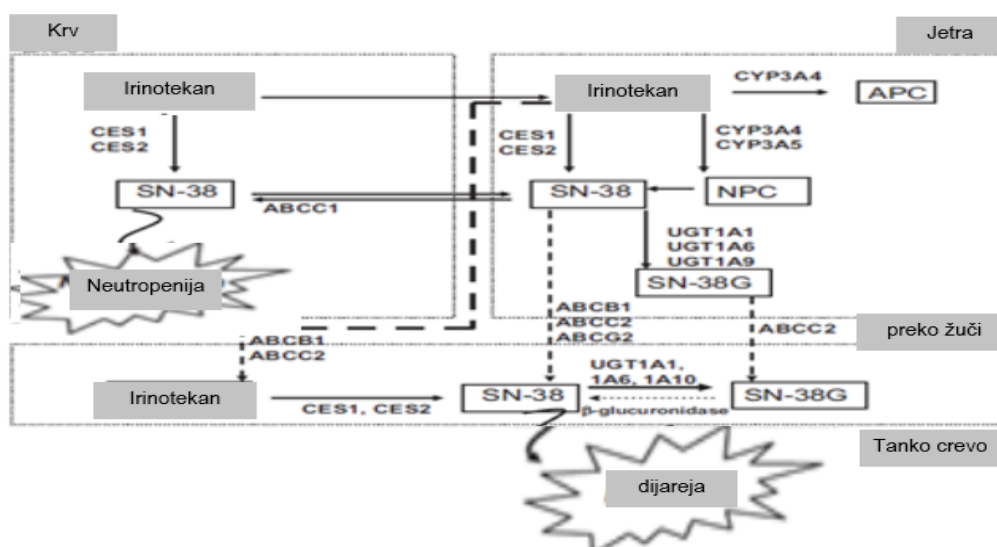
1.5.1. Supstrati UGT1A1 enzima

Supstrati za UGT1A1 enzim su široko korišćeni lekovi u koje spadaju: irinotekan (SN-38) (terapija karcinoma debelog creva), acetaminofen (paracetamol), karvediol (terapija ishemije i kardiomiopatije), etoposid (hemoterapeutik koji se koristi u lečenju karcinoma testisa i sitnoćelijskog karcinoma pluća), lamotrigin (antiepileptik), ibuprofen (analgetik, antipiretik i antiinflamacijski lek), diklofenak (lečenje osteoartritisa i reumatoidnog artritisa), estradiol (za ublažavanja simptoma menopauze), troglitazon (tretman dijabetes melitusa tip II), simvastatin, lovastatin, atorvastatin (statini koji se koriste u terapiji hiperholesterolemije i poremećaja lipidnog statusa), lozartan (hipertenzija), tramadol (terapija jakog bola), belinostat (terapija perifernog T-ćelijskog limfoma i trombocitopenije), raloksifen (terapija osteoporoze u postmenopauzi), raltegravir i abacavir (antiretroviralni lekovi u terapiji HIV infekcije) (www.drugbank.ca).

Irinotekan je inhibitor topoizomeraze I koji se koristi u tretmanima nekoliko tipova solidnih tumora, a naročito u kombinaciji sa drugim hemoterapeuticima u lečenju metastatskih kolorektalnih karcinoma. Aktivni metabolit irinotekana SN-38 sprečava re-ligaciju prekida jednolančanih DNK tokom sinteze DNK u ćelijskoj replikaciji. Kako se prekidi na DNK ne popravljaju efikasno, brzo dolazi do ćelijske smrti. Neželjeni efekti irinotekana, koji uključuju tešku dijareju, mijelosupresiju i neutropeniju, javljaju se zbog neefikasnog metabolizma i ekskrecije SN-38 (Torkamani et Vaux, 2015). UGT1A1 enzim učestvuje u glukuronidaciji SN-38.

Pokazalo se da terapija irinotekanom sa određenim hemoterapijskim agensima (tj. oksaliplatinom) može da prouzrokuje izuzetnu neutropeniju 4. stepena kod pacijenata koji su homozigoti za *UGT1A1**28 varijantu (Marques et Ikediobi, 2010). Od 2005. u skladu sa izveštajima o povezanosti *UGT1A1**28 genotipa i toksičnosti irinotekana, Američka agencija za hranu i lekove donela je preporuku o testiranju na *UGT1A1**28 pre uvođenju leka irinotekana u terapiju karcinoma debelog creva.

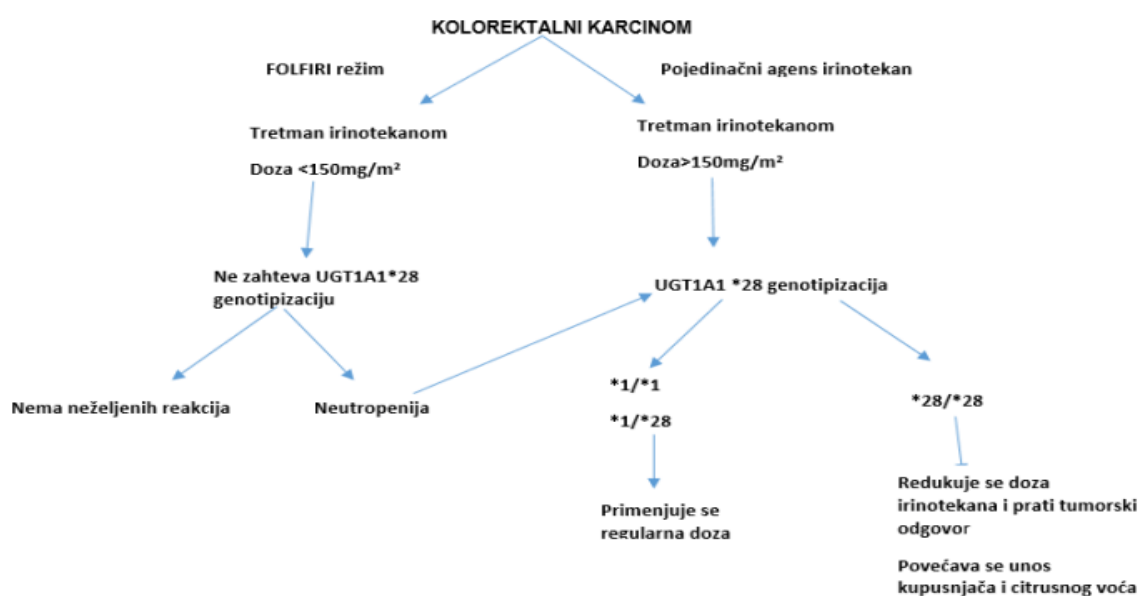
Irinotekan se prevodi u svoju aktivnu formu SN-38 pomoću karboksilesteraze (CES), a nakon toga se, pomoću UGT1A1 enzima vrši glukuronidacija ovog aktivnog metabolita u SN-38G. Osim toga irinotekan može biti oksidovan pomoću citohrom P450 3A4 (CYP3A4) u dve neaktivne forme – APC i NPC (Slika 11). U eliminaciji irinotekana učestvuju i ABCB1 (eng. multi-drug resistance 1 P-glycoprotein) i ABCC2 (eng. multi-drug associated protein 2) transporteri (Slika 18).



Slika 18. Metabolizam irinotekana. ABC-ATP vezujuća kaset (eng. ATP binding cassette); ABCB1 (eng. multi-drug resistance 1 P-glycoprotein gene); ABCC2 (eng. multi-drug associated protein 2 gene); CES karboksilesteraze; APC - 7-etil-10-[4-N-(5-aminopentanoična kiselina)-1-1-piperidino]karboniloksikamptotecin; NPC-7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) karboniloksikamptotecin (Naggar et al,2006).

Prilikom određivanja toksičnosti irinotekana trebalo bi uzeti u obzir složeni metabolizam ovog leka i uključenost većeg broja gena, te imati u vidu da *UGT1A1* (TA)n genotipizacija ne mora biti dovoljna.

Na osnovu dosadašnjih saznanja, ukazuje se nedvosmislena potreba za personalizovanim pristupom u lečenju kolorektalnog karcinoma irinotekanom. Takođe neophodno je usvojiti i algoritme lečenja ove vrste karcinoma u kojem bi farmakogenetički testovi bili neizostavni deo kliničke prakse (Slika 19).



Slika 19. Klinički algoritam lečenja kolorektalnog karcinoma irinotekanom i genotipizacije *UGT1A1*. FOLFIRI režim – folinska kiselina-fluorouracil-irinotekan (Marques and Ikediobi, 2010)

Raloksifen je selektivni modulator estrogena i koristi se u prevenciji osteoporoze kod žena u postmenopauzi (Trontelj et al, 2009), a od 2007. godine i za redukciju rizika od invazivnog karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi sa osteoporozom (FDA News,2007). *UGT1A1* je ključni enzim za klirens raloksifena. Pokazano je da polimorfizmi *UGT1A1* gena dovode do široke varijabilnosti farmakokinetike i farmakodinamike raloksifena koji se u serumu javlja kao raloksifen, raloksifen-6-glukuronid i raloksifen-4'-glukuronid. Raloksifen se izlučuje iz organizma uglavnom nakon konjugacije i prevođenja u metabolite glukuronida. Terapeutski učinak ima samo nekonjugovani raloksifen, koji se vezuje sa visokim afinitetom za estrogenski receptor i tako dovodi do farmakodinamičkog odgovora (Dodge et al,1997).

Medjutim, suprotno očekivanjima, pokazano je da se u serumu pacijenata koji su homozigoti za *UGT1A1*28* alel, nivoi sva tri metabolita raloksifena javljaju sa 2 puta većom koncentracijom nego kod pacijenata koji su homozigotni nosioci 6/6 TA ponovaka ili heterozigotni nosioci 6/7 TAponovaka u promotoru *UGT1A1* gena (Trontelj et al,2009), te je kod ovih pacijenata merenjem gustine butne kosti, uočen i bolji terapijski učinak raloksifena. U pokušaju da se pronađe objašnjenje ovakvih nalaza, izvršena su dodatna ispitivanja koja su pokazala da značajnu ulogu u glukuronidaciji raloksifena ima UGT1A1 enzim u tankom crevu (Trdan Lusin et al,2011), a da bi se konačno rasvetlilo ovo paradoksalno otkriće neophodno je sprovesti dodatna istraživanja.

Reltegravir je inhibitor integraze humanog virusa imunodeficijencije-1 (HIV-1). Takođe se pokazalo i da je supstrat UGT1A1 enzima. Međutim nije utvrđena značajna korelacija između veće koncentracije leka u serumu i neželjenih efekata, tako da testiranje na *UGT1A1*28* varijantu nema farmakogenetičkog značaja.

Etoposid je antikarcinogeni lek koji je inhibitor topoizomeraze II. Glukuronidaciju etoposida vrši UGT1A1, te snižena aktivnost ovog enzima rezultira povećanom koncentracijom leka u krvi i smanjenom ekskrecijom leka. Iz tih razloga se javlja niz neželjenih efekata, te se smatra da bi farmakogenetičko testiranje na prisustvo *UGT1A1*28* varijantnog alela bilo relevantno i opravdano, pre primene ovog leka (Wen et al, 2007).

1.5.2. Inhibitori UGT1A1 enzima

1.5.2.1. Terapeutski lekovi kao UGT1A1 inhibitori

Inhibitori proteaze

Inhibitori proteaza su grupa antiviralnih lekova koji se koriste u terapiji infekcija virusom HIV-a i virusom hepatitisa C (Rang et al, 2005). Veliki broj ovih lekova, osim inhibicije proteaze, inhibiraju i enzim UGT1A1 što rezultira nekonjugovanom hiperbilirubinemijom (Zucker et al, 2001, McDonald et al, 2012,). Šest različitih inhibitora proteaza HIV-a atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir i sakvinavir, inhibiraju UGT1A1 enzim (Zhang et al, 2005). Što se tiče antiviralnih lekova koji se koriste u lečenju infekcije virusom hepatitisa C, nekonjugovanu hiperbilirubinemiju putem inhibicije UGT1A1 enzima prouzrokuju lekovi faldprevir, telaprevir, simeprevir, paritaprevir, daklatasvir i asunaprevir (Zhang et al, 2005, Ji et al, 2012, Alam et al, 2017, Cao et al 2017, Sane et al, 2014). Inhibitori proteaze indinavir i atazanavir se koriste u terapiji HIV infekcije i hroničnog virusnog hepatitisa. Ovi lekovi su kompetitivni inhibitori UGT1A1 enzima i mogu izazvati hiperbilirubinemiju kompetitivnim vezivanjem za vezujuće mesto bilirubina na UGT1A1 enzimu.

Inhibitori tirozin kinaze

Inhibitori tirozin kinaze mogu imati veoma jak do umeren inhibitorni efekat na UGT1A1 enzim. Sa pojavom hiperbilirubinemije mogu se povezati lekovi: nilotinib, regorafenib, sorafenib, pazopanib, lapatinib, erlotinib, gefitinib i ikotinib (Lv Xia et al, 2019). Pokazalo se da nilotinib inhibira UGT1A1 enzim i da istovremena primena nilotiniba i irinotekana dovodi do značajnog povećanja koncentracije SN-38 u plazmi, kao i do pojave izražene hiperbilirubinemije (Singer et al, 2007, Fujita et al, 2011). Takođe je utvrđeno da koadministracija irinotekana i erlotiniba rezultira u značajnom povećanju koncentracije SN-38 u plazmi, što se direktno dovodi u vezu sa prisustvom *UGT1A1**28 alela (Liu et al, 2010). Kliničke doze imatiniba ili lapatiniba mogu da budu okidači za značajno povećanje koncentracije lekova koji se metabolišu preko UGT1A1 enzima u plazmi.

Drugi lekovi

Postoji još veliki broj lekova koji imaju inhibitornu ulogu na UGT1A1 enzim među kojima su i levotiroksin (lečenje deficijenacijetiroidnog hormona), ketokonazol (lečenje gljivičnih oboljenja), vitamin A, diklofenak, acetaminofen, nesteroidni antinflatorni lekovi, tolkapon i enatakapon (lečenje parkinsonove bolesti).

Sorafenib se koristi za inhibiciju proliferacije tumorskih ćelija. Metabolisan je preko CYP3A4 i UGT1A9 enzima. Kombinovanim tretmanom sorafeniba i irinotekana u lečenju solidnih tumora, dolazi do povećane izloženosti irinotekanu i SN-38. Međutim ova povećana izloženost irinotekanu i SN-38 ne rezultira povećanjem toksičnosti, što se objašnjava primenom manjih doza irinotekana (125mg/m²). Sorafenib deluje inhibitorno na UGT1A1 enzim, što može dovesti do nekonjugovane hiperbilirubinemije, naročito kod pacijenata sa 7/7 TA genotipom.

1.5.2.2. Ekstrakti biljaka koji imaju inhibitorno dejstvo na UGT1A1 enzim

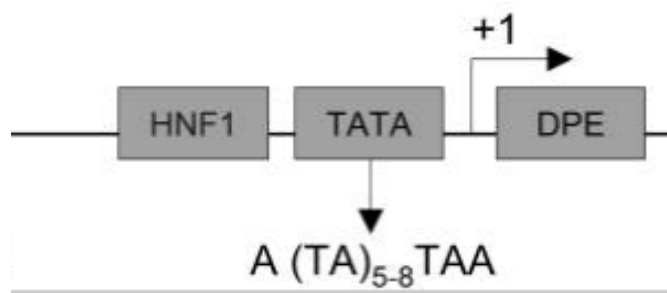
U poslednjoj deceniji izvršena su brojna istraživanja o dejstvu sekundarnih metabolita biljaka koje se koriste u fitofarmaciji na aktivnost UGT1A1 enzima. Tako se došlo do saznanja da ekstrakti brojnih značajnih biljnih ekstrakata imaju inhibitorno dejstvo na UGT1A1 enzim (Lv Xia et al, 2019). Najznačajnije fitodroge koje ispoljavaju ovo dejstvo su ekstrakti *Silybum marianum* (nar.zmijina trava ili sikavica), *Serenoa repens* (poznata u farmakoindustriji pod nazivom Saw palmetto, a intenzivno se koristi za prevenciju karcinoma prostate), *ehinacee* (Mohamed et al, 2010), ženšena (Zheng et al, 2014), đumbira, cimeta, valerijane, borovnice i drugog bobičastog voća (Choi et al, 2014). Većina biljnih ekstrakata pokazuje slabo inhibitorno dejstvo na UGT1A1 enzim, a klinički značaj može imati *Silybum marianum*, *Saw palmetto* i *ehinacea* (Mohamed et al, 2010).

1.5.3. Induceri i inhibitori ekspresije *UGT1A1* gena

Brojni lekovi menjaju aktivnost UGT1A1 enzima delujući kao induceri ili kao inhibitori *UGT1A1* gena (Strassburg, 2008, Perrera et al, 2008, Kiang et al, 2005). Najpoznatiji induceri *UGT1A1* gena su rifampicin i fenobarbiton. Fenobarbiton se decenijama koristi u terapiji hiperbilirubinemije zbog svoje sposobnosti da poveća ekspresiju *UGT1A1* gena u jetri. Otkriveno je da se fenobarbiton vezuje za distalnu enhensersku sekvencu od 290bp na poziciji

-3483/-3194 *UGT1A1* gena (Sugatani et al, 2001). Pretpostavlja se da se ovaj enhenser, nazvan gtPBREM, sastoji od tri motiva jedarnih receptora (eng. nuclear receptor motifs) koji su razdvojeni sa oko 90bp. Od 5' kraja ovi motivi su imenovani sa NR4, gtNR1 i NR3. Ove motive aktivira jedarni orfan receptor (eng. nuclera orphan receptor) koji pripada familiji humanih konstitutivnih aktivirajućih receptora - hCAR (eng. Human constitutive active receptor). Mutacioni eseji su pokazali da mutacije u gtNR1 motivu smanjuje za 80% CAR zavisnu aktivnost enhensera. Mutacije u NR4 i NR3 zadržavaju 50% originalne aktivnosti, dok mutacije u sva 3 motiva istovremeno dovode do potpunog gubitka enhenserske aktivnosti. Sposobnost fenobarbitona da, preko gtPBREM enhensera, indukuje *UGT1A1* gen i povećava ekspresiju ovog gena koristi se u tretmanu pacijenata sa sindromom CN tip II, te se prilikom lošijeg odgovora pacijenta na terapiju fenobarbitonom moraju uzeti u obzir i ispitivanje varijanti u ovom enhenserskom regionu (Sugatani et al 2001).

Uzvodno od TATA promotorskog elementa nalazi se *HNF1* sekvenca koja ima ulogu u aktivaciji transkripcije *UGT1A1* gena (Slika 20). U blizini ove sekvence nalaze se CpG ostrvca čijom metilacijom *HNF1* gubi svoju ulogu i nivo transkripcije *UGT1A1* gena rapidno opada, tako da možemo reći da je nivo ekspresije *UGT1A1* pozitivno regulisan sa *HNF1*, a negativno regulisan metilacijom DNK. Eksperimentalno je pokazano da dodavanje inhibitora DNK metiltransferaze na ćelije kolorektalnog karcinoma dovodi do obnavljanja *HNF1* funkcije i do povećanja ekspresije *UGT1A1* gena (Belanger et al, 2010).



Slika 20. Regulatorne i promotorske sekvence *UGT1A1* gena

Regulacija ekspresije *UGT1A1* gena je moguća i na nivou iRNK putem interakcije miRNK sa 3' netranslirajućim regionom na ciljnoj iRNK (eng. UTR – 3' untranslated region) što rezultira inhibicijom sinteze proteina. Mi-RNK su poznati kao epigenetički regulatori genske ekspresije kako u razvoju zdravih tkiva, tako i u tumorskim tkivima. *In silico* analizom je identifikovana miRNK 491-3p (miR-491-3p) kao potencijalni regulator svih gena iz *UGT*

familije gena, a svoju regulatornu ulogu ispoljava vezivanjem za UGT1A 3' netranslirajući region koji je isti kod svih UGT1A enzima (Dluzen et al, 2014). Eksperimentalno je pokazano da nivo *UGT1A1* iRNK opada sa porastom koncentracije miRNK 491-3p (miR-491-3p) u ćelijama u kojima je izvršena transfekcija sa ovom miRNK (Dluzen et al, 2014). Možemo zaključiti da se represivna uloga miRNK očitava u značajnom smanjenju količine iRNK *UGT1A1*. Takođe se pokazalo da porast nivoa miRNK 491-3p korelira sa smanjenom konjugacijom raloksifena u raloksifen-6-glukuronid i raloksifen-4- glukuronid (Dluzen et al, 2014). U budućim studijama možda će se rasvetliti uloga i značaj interakcije miRNK-491-3psa iRNK kod nosilaca *UGT1A1**28 i *UGT1A1**1 varijanti koje bi objasnile paradoks da homozigotni nosioci 7/7 TA, imaju duplo veće koncentracije raloksifen-6-glukuronida i raloksifen-4-glukuronida od homozigotnih 6/6 TA i heterozigotnih nosilaca 6/7 TA.

1.5.4. Značaj interakcije različitih lekova i njihov efekat na ekspresiju *UGT1A1* gena i aktivnost UGT1A1 enzima

Ukoliko se pacijent tretira istovremeno lekom koji je supstrat za UGT1A1 enzim i lekom koji je inducer *UGT1A1* gena, neophodno je povećati dozu leka koji je supstrat za UGT1A1 enzim da bi se postigao željeni terapijski učinak. Takođe, ukoliko se lek supstrat UGT1A1 enzima kombinuje sa lekom koji je inhibitor ovog gena, neophodno je uzeti u obzir i *UGT1A1*(TA)_n genotip pacijenta da bi se izbegli ili smanjili neželjeni efekti lekova. Naime, za pacijente koji su homozigotni nosioci *UGT1A1**28 varijantnih alela i samim tim imaju urođeno smanjenu aktivnost UGT1A1 enzima, kombinacija leka supstrata i leka koji bi dodatno inhibirao (ekspresiju gena ili aktivnost enzima) može dovesti do ozbiljnih neželjenih efekata i komplikacija. U Tabeli 4 je prikazan spisak lekova koji su supstrati i inhibitori UGT1A1 enzima, kao i potreba za analizom *UGT1A1*(TA)_n genotipa pacijenta pre prepisivanja leka.

Tabela 4. Klinički značaj testiranja prisutnosti *UGT1A1**28 kod različitih lekova

Lek	UGT1A1	Kratak opis	Indikacije za farmakogenetičko testiranje	racionalnost
Irinotekan (SN-38)	supstrat	Prisustnost <i>UGT1A1</i> *28 alela je faktor rizika za razvijanje neželjenih efekata tretmanom irinotekanom	****	Testiranje sprečava toksičnost leka pri visokim dozama
Raloksifen	supstrat	Pacijenti- homozigoti za <i>UGT1A1</i> *28 koji su pod tretmanom raloksifinom su više pod uticajem aktivnog metabolita koji dovode do većeg mineralne gustine karličnih kostiju	**	Testiranje može da ukaže na pacijente kojima su potrebne veće doze raloksifena
Raltegravir	supstrat	Homozigotnost <i>UGT1A1</i> *28 se povezuje sa povećanim koncentracijama leka u plazmi, ali se ne mogu povezati sa sigurnošću upotrebe ovog leka	*	Testiranje se nije pokazalo korisnim
Indinavir	inhibitor	Indinavir inhibira <i>UGT1A1</i> enzim i dovodi do povećanja koncentracije i nekonjugovanog i totalnog bilirubina. Ovaaj efekat vodi do kliničke žutice kod pacijenata sa <i>UGT1A1</i> *28 genotipom	**	Testiranjem se izbegava hiperbilirubinemija
Atazanavir	inhibitor	Atazanavir inhibira <i>UGT1A1</i> enzim što vodi ka hiperbilirubinemiji. Pacijenti sa <i>UGT1A1</i> *28 genotipom su pod većim rizikom od ispoljavanja žutice	***	Jaki dokazi da testiranje može sprečiti pojavu kliničke žutice
Sorafenib	inhibitor	Sorafenib na visokim dozama inhibira aktivnost <i>UGT1A1</i> , što dovodi do hiperbilirubinemije	**	Potrebno je sprovesti detaljnije studije o uticaju sorafeniba na <i>UGT1A1</i> aktivnosti

*Nije neophodno testiranje pre tretmana

**Testiranje bi moglo biti korisno, ali su potrebna dodatna istraživanja

***Postoje dokazi da bi testiranje moglo biti značajan indikator pre tretmana

****Postoje jaki dokazi da testiranje obezbeđuje esencijalne informacije prilikom određivanja terapije

1.5.5. Uticaj životnog stila na fenotipsku ekspresiju *UGT1A1* gena

Proučavanjem životnog stila i nivoa ekspresije *UGT1A1* gena došlo se do zanimljivih i korisnih saznanja. Tako je utvrđeno, da duvanski dim kod pušača indukuje ekspresiju *UGT1A1* gena. Pušači koji su homozigotni nosioci nemutiranog *UGT1A1*(TA)n varijantnog alela –TA6, mogu biti rezistentni na irinotekan te iz tog razloga mogu imati negativan terapijski odgovor (van der Bol et al, 2007). Takođe je utvrđeno i da alkohol indukuje aktivnost UGT1A1 enzima u jetri (Ideo et al, 1971). Kasniji radovi su pokazali da Kupferove ćelije imaju centralnu ulogu u etanolom stimulisanom indukciji UGT1A1 enzima u parenhimalnim ćelijama jetre. Pokazano je da kod pacova koji su deficitarni za Kupferove ćelije ne dolazi do povećanja nivoa ni UGT1A1 proteina, ni mRNA za *UGT1A1* (Kardon et al, 2002). Zbog ovakvih saznanja neophodno je uzeti u razmatranje i životne navike pacijenta prilikom dijagnoze hiperbilirubinemije, kao i prilikom određivanja terapije za određene bolesti, s obzirom da sada znamo da te životne navike mogu uticati na odgovor pacijenta na lekove koji su supstrati ili inhibitori UGT1A1 enzima, kao i na lekove koji su induciji *UGT1A1* gena (Peterson et al, 2005).

Namirnice koje se koriste u ishrani mogu povećati ekspresiju *UGT1A1* gena, što je naročito važno da znaju osobe koje su homozigotni nosioci TA7 alela. Peterson i sar. su ispitali uticaj 4 botaničke familije na aktivnost UGT1A1 enzima preko nivoa serumskog bilirubina. Ispitivane su *Cruciferae*, *Rutaceae*, *Liliaceae* i *Leguminosae*. Rezultati ovih istraživanja su pokazala visoku korelaciju između konzumiranja *Cruciferae* (kupusnjače i brokoli), citrusa i soje i nivoa ekspresije *UGT1A1* gena kod homozigotnih nosilaca TA7 alela

Interakcija ishrane sa nivoom aktivnosti UGT1A1 enzima se mora posmatrati i u kontekstu različitog etničkog porekla pojedinaca koji žive na različitim geografskim područjima, kao i u odnosu neposrednog okruženja, životnog stila i dijete.

1.5.6. *UGT1A1* aleli i njihova uloga u bolestima

UGT1A1 gen se pokazao i kao potencijalni marker za procenu rizika od pojave različitih malignih i kardiovaskularnih bolesti. Osim bilirubina i farmaceutskih lekova, *UGT1A1* enzim vrši glukuronidaciju benzo(α)piren-trans-7,8-dihidrodiola koji je prekursor jakog karcinogena benzo(α)piren-trans-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksida nađenog u hrani pripremanoj na roštilju, katranu i dimu od cigarete (Fang et al. 2002). Takođe ovi enzimi vrše glukuronidaciju i estradiola (Williams et al, 2002), kao i 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridine (PhIP) –karcinogen pronađen u kivanom mesu (Girard et al. 2005). *UGT1A1* enzim pokazuje zaštitnu ulogu protiv benzo(α)piren i PhIP posredovane karcinogeneze, kao i modulatornu ulogu u nivou estradiola u telu.

U više studija kineske i bele populacije pokazalo se da TA7 alel povišava rizik od kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke. Kako ovaj alel smanjuje aktivnost *UGT1A1* enzima povećana izloženost karcinogenima može se potencijalno povezati sa razvojem kancera. Međutim neke studije su pokazale da nema korelacije između TA7 alela i karcinoma dojke (Tsezou et al, 2007; Guillemette et al, 2001) dok je jedna studija pokazala da nosioci alela TA7 imaju niži rizik za karcinom dojke (Sparks et al, 2004).

S druge strane, postoje izvesni dokazi da TA7 mogu imati protektivnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti (KVB). Smatra se da bilirubin može da deluje kao antioksidans i da sprečava stvaranje plaka na krvnim sudovima koji vode do ateroskleroze (Lin et al, 2010). Više studija je pokazalo povezanost niskih koncentracija bilirubina sa povišenim rizikom od nastanka KVB (Ekblom et al, 2010).

Uzimajući u obzir ova opsežna znanja dolazi se do ideje da bi, u budućnosti i ishrana pojedinca trebalo da bude prilagođena genotipu (nutrigenomika), i da bi se takvom ishranom mogli smanjiti rizici od pojave bolesti koje se povezuju sa enzimskom aktivnošću *UGT1A1* enzima, bez obzira da li je ta aktivnost pod uticajem promena na genskom ili enzimskom nivou.

1.6. Populaciona specifičnost distribucije *UGT1A1* varijanti

Kada je *UGT1A1* gen prepoznat kao farmakogenetički marker i kada se došlo do saznanja da pojedine varijante gena u homozigotnom stanju rezultiraju sporijim metabolizmom, ne samo bilirubina, već i značajnih farmaceutika došlo je do ekspanzije istraživanja ovog gena. Sprovedene su brojne populacione studije o distribuciji *UGT1A1* varijanti i pokazalo se da postoji izrazita različitost u učestalostima pojedinih varijanti i genotipova između etničkih grupa. Učestalosti pojedinih alela variraju među populacijama iz različitih geografskih oblasti, tako da postoje razlike između Afro-Amerikanaca, afričkih, kavkaskih i azijskih naroda. Najznačajnija i najviše proučavana varijanta je *UGT1A1**28 sa 7 TA ponovaka u promotorskom regionu. Varijantni alel *UGT1A1**28 (rs8175347) je najčešći alel u beloj populaciji kao i kod Afro-Amerikanaca (Tabela 5).

Tabela 5. Distribucija genetičkih varijanti *UGT1A1* kroz različite rase (Shimoyama, 2010)

Alel Narodi	<i>UGT1A1</i> *28 (TA)7TAA	<i>UGT1A1</i> *36 (TA)5TAA	<i>UGT1A1</i> *37 (TA)8TAA	<i>UGT1A1</i> *6 (G71R)
Kavkaski	0,29-0,39	0,01-0,018	0,008-0,022	Nije detektovana
Azijski	0,02-0,14	Nije detektovana	Nije detektovana	0,08-0,13 (Japan i Koreja 0,15-0,25)
Afro- Amerikanci	0,38-0,45	0,035-0,065	0,042-0,07	Nije detektovana

Najniža učestalost *UGT1A1**28 alela je kod azijskih naroda, dok je kod evropskih i afričkih naroda ovaj alel zastupljen sa značajnom učestalošću. Utvrđeno je da se ovaj alel u pacifičkoj regiji javlja sporadično, sa vrlo niskom učestalošću i da u pacifičkim populacijama nije utvrđeno postojanje 7/7 TA genotipa (Premawardhena et al, 2003).

U jednoj studiji pokazano je da je najveća raznovrsnost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena i posledično tome i raznovrsnost genotipova, prisutna na Afričkom kontinentu (Tabela 6) (Beutler et al, 1998).

Tabela 6. Učestalost promotorskih genotipova *UGT1A1* gena u tri etničke grupe (Beutler et al, 1998).

Genotip <i>UGT1A1</i> (TA) _n	Evropljani	Azijati	Afrikanci
6/6	24 (33.8%)	33 (75%)	26 (25.74%)
6/7	39 (54.93%)	13 (27.66%)	37 (36.63%)
7/7	8 (11.27%)	1 (2.12%)	19 (18.81%)
7/8	0	0	6 (5.94%)
8/8	0	0	2 (1.98%)
6/8	0	0	4 (3.96%)
7/5	0	0	5 (4.95%)
6/5	0	0	2(1.98%)
Ukupno	71	47	101

Podaci o učestalosti *UGT1A1*28* alela kod evropskih naroda prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Distribucija *UGT1A1*28* alela i *UGT1A1(TA)n* promotorskih genotipova u evropskim populacijama (Kapedanovska, 2014)

	<i>UGT1A1*28</i>	6/6(%)	6/7(%)	7/7(%)
Španija	0.34	/	/	10
Italija	0.32	/	/	9; 16
Grčka	0.35	48.9	40.4	8.5
Francuska	0.32	/	/	17
Nemačka	0.32	43	45	12.4
Poljska	0.42	33.3	50	16.7
Velika Britanija	0.27	50.8	44	5
Turska	0.24	56.3	34.4	9.3
Holandija	0.37	/	/	12

Takođe je primećena značajna oscilacija u učestalostima distribucije alela u nekim lokalnim zajednicama koje su geografski bliske. Tako je u Španiji, kod Katalonaca 7/7 TA genotip prisutan sa učestalošću od 6,5%, dok je kod Baskijaca prisutan sa 14,8% (Premawardhena, 2003), a u Valensiji sa 11,33% (Torres, 2017). Na osnovu podataka dostupnih iz literature o učestalosti TA7 alela i 7/7 TA genotipova u velikom broju populacionih studija uočava se zaista široka raznolikost dobijenih vrednosti.

Na osnovu do sada dostupnih podataka o učestalosti *UGT1A1*28* alela u državama bivše Jugoslavije (Kapedanovska et al, 2014, Marinković et al, 2008, Ostanek et al, 2007) uočava se sličnost sa drugim narodima iz evropske grupe naroda (Tabela 8).

Tabela 8. Učestalost *UGT1A1**28 alela kao i *UGT1A1(TA)_n* promotorskih genotipova kod naroda bivše SFRJ

	<i>UGT1A1</i> *28	6/6	6/7	7/7
Makedonija	0.31	50	37.5	12.5
Hrvatska	0.34	38.4	47.9	9.8
Slovenija	0.37	38.1	47.9	13.6

S obzirom na pokazanu raznolikost u učestalosti alela *UGT1A1* gena, potrebno je sprovesti populacione studije i u populacijama za koje ne postoje podaci, u svrhu dobijanja punih informacija. Ove informacije su takođe značajne i za populacije kod kojih je učestala pojava β -talasemija, koja dovodi do hiperbilirubinemije i posledično do stvaranja žučnih kamenaca kao komplikacija hiperbilirubinemije (Premawadhena et al, 2003).

1.6.1. Populacija Republike Srbije

Republika Srbija je država jugoistočne Evrope, koja se rasprostire na Balkanskom poluostrvu na površini od 88.499km². Od 2009-2010. godine, Srbija je podeljena na statističke regione. Pet statističkih regiona Srbije su: Beograd, Vojvodina, Šumadija i zapadna Srbija, južna i istočna Srbija i Kosovo i Metohija. Na osnovu podataka Republičkog zavoda za statistiku (<http://www.stat.gov.rs>) Republika Srbija je nastanjena sa 7 001 444 stanovnika. Prema podacima sa popisa iz 2011. godine 83% stanovništva Srbije čine Srbi, zatim 3% Mađari, po 2% Romi i Bošnjaci, dok sve druge manjine čine 10% stanovništva.

1.6.2. Populacija Republike Srpske

Republika Srpska je entitet Bosne i Hercegovine koji zahvata severni i istočni geoprostor Bosne i Hercegovine. Republika Srpska se sastoji od 7 geografskih regija: Krajina, Posavina, Semberija, Podrinje I i Podrinje II, Sarajevsko-Romanijski region i Istočna Hercegovina.

Administrativni centri su Banja Luka, Doboj, Bijeljina, Zvornik, Foča, Istočno Sarajevo i Trebinje (Slika 21).



Slika 21. Mapa Bosne i Hercegovine sa entitetom Republika Srpska i administrativnim centrima

Prema podacima iz Biltena o popisu stanovništva 2013. godine, Republičkog zavoda za statistiku Republike Srpske (www.rzs.rs.ba), na površini od 25 053 km² nastanjeno je 1 170 342 stanovnika. Populaciju Republike Srpske čini većinsko srpsko stanovništvo (83%). Pripadnici bošnjačkog naroda zastupljeni su sa 12,69%, dok je pripadnika hrvatskog naroda 2,26%. Ostale etničke grupe zastupljene su sa 2% .

Regije imaju različitu gustinu naseljenosti. Broj stanovnika u svakoj regiji prikazan je u Tabeli 9

Tabela 9. Broj stanovnika po regijama u Republici Srpskoj

Regija	Krajina – Banja Luka	Posavina-Doboj	Semberija-Bijeljina	Podrinje I- Zvornik	Podrinje II- Foča	Sarajevsko-romanijski Istočno Sarajevo	Istočna Hercegovina Trebinje	ukupno
Broj stanovnika po regijama	502.957	212.789	125.739	116.066	38.689	87.051	87.051	1.170.342

2. CILJEVI

Uridin-difosfat-glukuronozil transferaza 1A1 (UGT1A1) je enzim faze II metabolizma endogenih i egzogenih hemijskih jedinjenja. Ovaj enzim pokazuje ekskluzivitet za glukuronidaciju bilirubina, što je ključan korak u ekskreciji bilirubina. Poremećaji u metabolizmu i ekskreciji bilirubina vode ka brojnim stanjima i bolestima, i predstavljaju jedan od bitnih faktora i pokazatelja zdravstvenog stanja čoveka. Kako promene u genetskoj strukturi *UGT1A1* gena dovode do promena u njegovoj ekspresiji, kao i funkcionalnosti UGT1A1 enzima, ukazuje se potreba utvrđivanja korelacija genetskih varijanti *UGT1A1* sa nivoom bilirubina u serumu, kao i povezanost sa stanjima i bolestima koje su posledica odstupanja nivoa serumskog bilirubina od referentnih vrednosti. Stanja u kojima je poremećen metabolizam bilirubina zbog genetskih defekata u *UGT1A1* genu su Žilberov sindrom i Krigler Najjar-ov sindrom. Kod Žilberovog sindroma poremećaj ekspresije gena se javlja zbog promena broja TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1*, a kod Krigler –Najar-ovog sindroma promene nastaju u kodirajućim sekvencama *UGT1A1* gena, što dovodi do smanjenja ili gubitka supstratne specifičnosti.

Povećavanje nivoa serumskog bilirubina je pokazatelj i dijagnostički parametar za stanja i bolesti koja vode pojačanoj hemolizi (talasemije) ili smanjenoj funkciji jetre usled fibroze ili ciroze (hronični hepatitis C). Stoga je korisno kod ovih stanja i bolesti poznavati i urođenu sposobnost pacijenta ka metabolisanju bilirubina, što vodi ka personalizovanom pristupu terapiji, predviđanju i sprečavanju potencijalnih komplikacija osnovne bolesti usled smanjene enzimske aktivnosti UGT1A1.

Takođe, ustanovljeno je da varijante *UGT1A1* gena pokazuju populacionu specifičnost, te da se promotorske varijante ovog gena u različitim populacijama javljaju sa značajno različitim učestalostima. Iz ovog razloga su populacione studije utvrđivanja učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena opravdane i potrebne.

UGT1A1 enzim pokazuje široku supstratnu specifičnost, i zna se da se brojni i značajni medikamenti u organizmu metabolišu i izlučuju nakon glukuronidacije putem aktivnosti UGT1A1 enzima. S tim u vezi, promotorske TA varijante *UGT1A1* su značajni farmakogenetički markeri i pokazalo se da je genotipizacija promotorskih varijanti korisna, čaki neophodna pre uvođenja nekih farmaceutika u terapiju. Smanjeni metabolizam farmaceutika ili njihovih intermedijera vodi ka izraženim toksičnim efektima i neželjenim pojavama.

Na osnovu ovih saznanja definisani su ciljevi ove studije:

1. Optimizovati metodu za detekciju *UGT1A1*(TA)n varijante
2. Utvrditi učestalost promotorskih TA varijanti *UGT1A1* gena u grupi pacijenata sa ŽS
3. Utvrditi korelaciju promotorskih TA varijanti *UGT1A1* gena u grupi pacijenata sa ŽS sa nivoom bilirubina u serumu.
4. Kod pacijenata sa ŽS kod kojih ne postoji korelacija između nivoa bilirubina i TA varijanti u promotoru *UGT1A1* gena, utvrditi da li postoje druge varijante u kodirajućim regionima *UGT1A1* gena.
5. Utvrditi učestalost TA varijanti u promotoru *UGT1A1* gena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C.
6. Utvrditi korelaciju promotorskih TA varijanti *UGT1A1* gena u grupi pacijenata sa hroničnim hepatitisom C sa nivoom bilirubina u serumu.
7. Utvrditi učestalost varijanti u promotoru *UGT1A1* gena kod pacijenata obolelih od talasemijskih sindroma
8. Utvrditi korelaciju promotorskih TA varijanti *UGT1A1* gena u grupi pacijenata sa talasemijskim sindromom sa nivoom bilirubina u serumu.
9. Utvrditi učestalost promotorskih TA varijanti *UGT1A1* kod ispitanika iz opšte populacije Republike Srbije.
10. Utvrditi učestalost promotorskih TA varijanti *UGT1A1* kod ispitanika iz opšte populacije Republike Srpske.
11. Utvrditi da li je *UGT1A1*(TA)n varijanta kandidat za farmakogenetičko testiranje pre uvođenja lekova u terapiju u čijem metabolizmu učestvuje UGT1A1 enzim.

3. MATERI JALI I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1. ISPITANICI – ZDRAVA KONTROLNA GRUPA

U okviru ove studije, za populaciona ispitivanja korišćeni su uzorci 100 zdravih ispitanika iz populacije Republike Srbije i 121 ispitanik iz populacije Republike Srpske.

3.1.1.1 Ispitanici iz populacije Republike Srbije

Uzorci zdravih ispitanika iz Republike Srbije su prikupljeni u saradnji sa Univerzitetskom dečjom klinikom u Beogradu i od dobrovoljnih davalaca krvi. Svi odrasli ispitanici ili roditelji/staratelji maloletnih lica su pre davanja uzorka krvi na genetičku analizu obavešteni o studiji i potpisali su Informisani pristanak. Ispitanici nisu u srodstvu. Krv svih ispitanika uzimana je venepunkcijom kubitalne vene u vakutajner sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1. Etički odbor Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, u skladu sa Odredbama i načelima sadržanim u Helsinškoj deklaraciji i Konvenciji Saveta Evrope o Ljudskim pravima i biomedicini iz 1997. godine, je dao odobrenje za sprovođenje ove studije. Krv svih ispitanika je transportovana do Laboratorije za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je izolovana DNK. U studiju je uključeno 63 ispitanika muškog pola i 37 ispitanika ženskog pola. Od ukupno 100 ispitanika u studiju je uključeno 22 dece i 78 odraslih.

3.1.1.2 Ispitanici iz populacije Republike Srpske

Na osnovu podataka o broju stanovnika u svakoj regiji određen je broj ispitanika za svaku regiju koji čini 0,01% ispitivane populacije. U ovoj studiji korišćen je 121 uzorak zdravih ispitanika iz populacije Republike Srpske od kojih je 31 ispitanik bio muškog pola i 90 ispitanika ženskog pola.

Uzorci krvi zdravih ispitanika iz Republike Srpske obezbeđeni su u saradnji sa Univerzitetskim Kliničkim Centrom Republike Srpske Banja Luka, Opštom Bolnicom Doboj, Opštom Bolnicom Bijeljina, Opštom bolnicom Trebinje, Javnom zdravstvenom ustanovom Bolnica Istočno Sarajevo, Javnom zdravstvenom ustanovom Bolnica Zvornik i Kliničko Bolnički Centar Foča (Tabela 7). Ispitanici iz Republike Srpske su pre davanja uzorka za genetičku analizu obavešteni o sadržaju studije i dali su potpisan Informisani pristanak. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora UKC Republike Srpske, i od strane Etičkog

odbora Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Krv ispitanika iz regionalnih centara Republike Srpske transportovana je pod optimalnim uslovima (na ledu) do Odjeljenja za medicinsku genetiku Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske u Banja Luci, gde se čuvala zamrznuta na -18°C dok nisu svi uzorci sa terena prikupljeni, te su odatle u zamrznutom stanju transportovani do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je vršena izolacija DNK. Uzorci DNK 121 zdravog ispitanika iz Republike Srpske se čuvaju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Davaoci krvi koji su učestvovali u ovoj studiji nisu u srodničkim vezama i Evropskog su porekla.

Tabela 10. Ispitanici iz populacije Republike Srpske

Regija	Krajina – Banja Luka	Posavina- Doboj	Semberija- Bijeljina	Podrinje I- Zvornik	Podrinje II- Foča	Sarajevsko- romanijski Istočno Sarajevo	Istočna Hercegovina Trebinje	Ukupno
Br. stanovnika po regijama	502.957	212.789	125.739	116.066	38.689	87.051	87.051	1.170.342
Br. ispitanika	52	22	13	12	4	9	9	121

3.1.2. PACIJENTI

3.1.2.1 Pacijenti sa Žilberovim sindromom

U ovu studiju je uključeno 51 dete kojem je na Univerzitetškoj dečjoj klinici u Beogradu dijagnostikovano Žilberovo sindrom. Dijagnoza ŽS je postavljena na osnovu biohemijskih parametara kao i na osnovu trodnevnog testa gladovanja i fenobarbitonskog testa. Informisani pristanak za učestvovanje u studiji potpisali su roditelji ili staratelji maloletnih pacijenata. Ovu studiju odobrio je Etički odbor Univerzitetške dečje klinike, Univerziteta u Beogradu. Uzorci pacijenata iz Univerzitetške dečje klinike u Beogradu su transportovani istog dana po uzorkovanju do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je vršena izolacija DNK.

3.1.2.2 Pacijenti sa Krigler-Najarovim sindromom tipa II

U studiju su uključena 10 pacijenata sa sindromom Krigler–Najar tipa II koji su kao takvi dijagnostikovani na Univerzitetnoj dečjoj klinici, Univerziteta u Beogradu. Uzorci pacijenata iz Univerzitetske dečje klinike u Beogradu su transportovani istog dana po uzorkovanju do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je vršena izolacija DNK.

3.1.2.3 Pacijenti oboleli od hroničnog hepatitisa C

U studiju su uključena i 24 pacijenta obolela od hroničnog hepatitisa C kod kojih se javila teška fibroza i ciroza jetre i koji su primali antivirusnu terapiju i/ili pegilirani interferon i ribavirin između 2003. i novembra 2015. godine. Uzorci krvi ovih pacijenata su prikupljeni na Odeljenju za hepatologiju, Klinike za infektivne i tropske bolesti, Medicinskog fakulteta u Beogradu, Kliničkog centra Srbije i transportovani su istog dana po uzorkovanju do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je vršena izolacija DNK. Svi pacijenti su potpisali Informisani pristanak za učešće u ovoj studiji. Etički odbor Kliničkog centra Srbije odobrio je ovu studiju.

3.1.2.4 Pacijenti sa talasemijskim sindromima

U DNK biobanci Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu nalaze se uzorci pacijenata sa talasemijskim sindromom. Dijagnostika za talasemijske sindrome izvršena je u periodu od 2004-2018. godine. Uvidom u registre i dokumentaciju pacijenata izvršena je trijaža pacijenata koji su uvršteni u ovu studiju. Odabrani su pacijenti za koje su u dokumentaciji postojali podaci o vrednostima ukupnog i direktnog bilirubina. Za učestvovanje u ovoj studiji odabrano je 22 pacijenta sa talasemijskim sindromom. Kako su pacijenti sa talasemijskim sindromima potpisali otvoreni pristanak za istraživanja u okviru Projekata kojima se bavi Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, u ovoj studiji su korišćeni njihovi izolati DNK pohranjeni u biobanku Instituta.

Krv svih ispitanika i pacijenata uzimana je venepunkcijom kubitalne vene u vakutajner sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1.

3.1.3 PRAJMERI

Za analizu promotorskog regiona *UGT1A1* gena u PCR reakciji korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji za analizu promotorskog regiona *UGT1A1*(TA)_n

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Deo koji se umnožava	Veličina fragmenta koji se umnožava
UGT1A1 Forward	5'-CTTGGTGTATCGATTGGTTTTTG-3'	Promotorski region <i>UGT1A1</i> gena	71 bp za 6 TA ponovaka
UGT1A1 Reverse	5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTTTCG -3'		

Dvadeset procenata slučajno odabranih uzoraka je analizirano fragment analizom fluorescentnih PCR produkata. U Tabeli 12. su prikazani prajmeri koji su korišćeni za fragment analizu fluorescentnih PCR produkata. UGT1A1 F prajmer obeležen je FAM plavom bojom.

Tabela 12. Prajmeri korišćeni za fragment analizu fluorescentnih PCR produkata

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Fluorescentna boja
UGT1A1 F	5'-famTACAGTCACGTGACACAG-3'	FAM obeležen
UGT1A1 R	5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTTTCG-3'	-

Nasumično je odabrano 10% uzoraka, za koje su rezultati genotipizacije promotora *UGT1A1* metodologijom PCR/akrilamidna elektroforeza provereni i potvrđeni pomoću Sangerove metode sekvenciranja.

Kod 10 pacijenta sa Krigler-Najarovim sindromom tipa II, sekvencirana su 4 stalna egzona na 3' kraju *UGT1A1* gena uključujući i intron-egzon granice: egzon 2, egzon 3, egzon 4 i egzon 5. Sekvenciran je i prvi varijabilni egzon *UGT1A1* gena koji je zbog veličine sekvenciran u dve odvojene reakcije sa 2 različita para prajmera. Sekvence korišćenih prajmera date su u Tabeli 13.

Tabela 13. Prajmeri korišćeni za reakcije sekvenciranja *UGT1A1* gena

Naziv	Sekvenca prajmera	Dužina	T _{ann}	Produkt
UGT1A1_ex1-1_F	5'- GCTACCTTTGTGGACTGACAGC-3'	22bp	60°C	546bp
UGT1A1_ex1-1_R	5'- CCATGAGCTCCTTGTTGTGCAG -3'	22bp		
UGT1A1_ex1-2_F	5'- GCCATTCCAAAGGGAGGATG-3'	20bp	60°C	789bp
UGT1A1_ex1-2_R	5'- GATGATGCCAAAGACAGACTCAAAC - 3'	25bp		
UGT1A1_int1ex2_F	5'- CTGTAAGCAGGAACCCTTCCTC -3'	22bp	58°C	476bp
UGT1A1_int1ex2_R	5'- GGATTAATAGTTGGGAAGTGGCAGG -3'	25bp		
UGT1A1_ex3_F	5'- AAGTTGCCAGTCCTCAGAAGC -3'	21bp	60°C	438bp
UGT1A1_ex3_R	5'- TGTTACTCACATGCCCTTGCAG -3'	22bp		
UGT1A1_ex4int4_F	5'- TGCAAGGGCATGTGAGTAACAC-3'	22bp	62°C	535bp
UGT1A1_ex4int4_R	5'- GCACTCCAGCCTAGGTGAC -3'	19bp		
UGT1A1_ex5_F	5'- CAGGTTTCCTTTCCCAAGTTTGG -3'	23bp	58°C	550bp
UGT1A1_ex5_R	5'- CACTCTGGGGCTGATTAATTTATGC -3'	25bp		

3.1.3.1 Dizajniranje prajmera za umnožavanje *UGT1A1* gena

Referentna sekvenca humanog *UGT1A1* gena (NG_033238.1) je pregledana u ENSEMBL bazi podataka (<http://www.ensembl.org>) i pregledom ENST00000305208.9 je potvrđeno gde se nalaze egzoni i introni ovog gena. Prajmeri su dizajnirani tako da analiziraju svih 5 kodirajućih egzona i susedne intronske sekvence *UGT1A1* gena. Prajmeri su birani tako da ne budu veći od 25 nukleotida, da obuhvate regione do 800 bp i da imaju slične temperature topljenja i slični GC sastav. Ove osobine su proveravane web alatima dostupnim slobodno na internetu:

OligoAnalyzer3.1(<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>),

Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),

Primer3(v.0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>).

Proveravano je i da li izabrani prajmeri sadrže česte SNV, SNPCheck3 alatom (<https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>). Na kraju su prajmeri proveravani *in-silico* PCR programom UCSC In-Silico PCR (<http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr>) ili BIOTEC In Silico PCR (<http://www4a.biotec.or.th/cgi-bin/webPcr>). Na ovaj način je dizajnirano šest pari prajmera za analizu *UGT1A1* gena čije su sekvence prikazane u Tabeli 4.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi na koloni

Izolacija DNK iz periferne krvi vršena je na koloni prema uputstvu za korišćenje QIAamp DNA Blood Mini Kit, *QIAGEN*.

Proteinaza K, koja se koristi u izolaciji DNK, kao i uzorak krvi, se temperiraju na sobnoj temperaturi. Na dno ependorf epruvete od 1,5ml doda se 20µl proteinaze K, 200µl nekoagulisane krvi i 200µl AL pufera. Nakon vorteksovanja u trajanju od 15s, smeša se inkubira 10 minuta na 56°C. U toku inkubacije dolazi do lize ćelije i oslobađanja DNK od proteina. Zatim se u smešu dodaje 200µl apsolutnog etanola i vorteksuje se 15s. Sva količina dobijene smeše pažljivo se prenosi na kolonu. Centrifugiranje kolone se vrši 1 minut na 8000rpm. Sadržaj u kolektorskoj tubi se odbacuje, a kolona, za koju se vezala DNK, prebacuje se u novu kolektorsku tubu. U kolonu se dodaje 500µl pufera AW1 kojim se ispiraju nečistoće sa kolone. Kolona se ponovo centrifugira 8000rpm 1 minut. Nakon centrifugiranja odbacuje se eluat sa nečistoćama. Kolona se prebacuje u novu kolektorsku tubu i dodaje se 500 µl AW2 pufera koji još jednom ispira nečistoće sa DNK. Sledi centrifugiranje kolone 3 minuta na 13 000 rpm i još jednom jedan minut na istoj brzini u cilju uklanjanja pufera iz kolone. Nakon toga kolona je prebacivana u sterilnu mikrotubu. U kolonu je dodavano 200µl elucionog pufera koji se inkubira 1 minut na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1 minut na 8 000 rpm elucioni pufer prolazi kroz kolonu i spira DNK vezanu na kolonu. U mikrotubi se dobija izolovana DNK koja se, do dalje upotrebe, čuva na -20°C. Za merenje koncentracije DNK je korišćen spektrofotometar *NanoVue* (GE Healthcare), po uputstvu za rad na aparatu.

3.2.2. Lančana reakcija polimeraze

U ovom radu je kao metod genotipizacije za promotor, kao i za ceo kodirajući region *UGT1A1* gena primenjen konvencionalni PCR metod (lančana reakcija sapolimerazom) koji je osmislio Kary Mullis (Mullis et al, 1986).

PCR metod se zasniva na imitaciji replikacije u *in vitro* uslovima, pri čemu se stvara veliki broj kopija sekvence od interesa koristeći malu početnu količinu DNK uzorka. Za *in vitro* replikaciju DNK neophodna je DNK matrica (jednolančana DNK tj. denaturisana dupleks DNK) koja se želi umnožiti, u količini 100ng/reakciji, zatim jednolančani prajmeri dužine 20-30 nukleotida čije su sekvence komplementarne krajevima one DNK sekvence koja se umnožava, smeša gradivnih blokova - slobodnih dezoksiribonukleotida u zasićenim

koncentracijama i enzim DNK polimeraza. U ovom radu korišćena je KAPA Taq DNA Polymerase (KAPABiosystems) termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, a dobijena je iz rekombinantnih sojeva *Escherichia coli*. Taq Polimeraza ima 5'-3' polimeraznu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, na višim temperaturama na kojima bi se drugi enzimi denaturisali. Enzimski sistem pokazuje 1 grešku na $2,2 \times 10^5$ ugrađenih nukleotida. Za aktivnost ovog enzima potrebni su i magnezijumovi joni Mg^{2+} koji se dodaju u obliku vodenog rastvora $MgCl_2$. PCR reakcija se odvija u puferu KAPA Taq Buffer B (Tris-potassium chloride buffer). KAPA pufer je 10x koncentrovani pufer koji se sastoji od 50 mM KCl, 10 mM TRIS Cl, 15mM $MgCl_2$ (1,5mM u 1x), pH8.3.

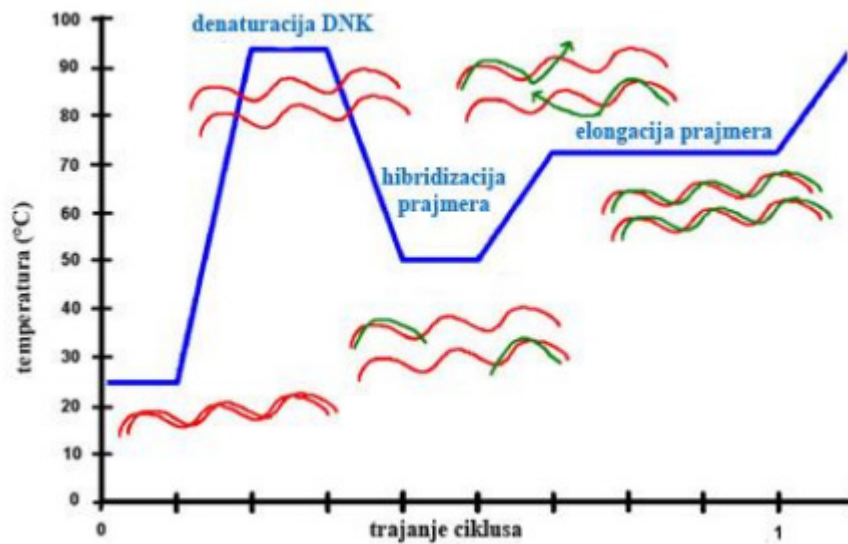
Smeša za PCR reakciju, finalne zapremine 25 μ l, sadržala je sledeće komponente:

Komponenta	Volumen reakcije 25 μ l	Finalna konc.
PCR-grade H ₂ O	Do 25 μ l	N/A
Q buffer	5 μ l	
10x KAPA Taq Buffer B	2,5 μ l	1x
25mM $MgCl_2$	1,5 μ l	
10mM dNTP Mix	1 μ l	0,2mM svaki
20 μ M Forward Primer	1 μ l	0,4 μ M
20 μ M Reverse Primer	1 μ l	0,4 μ M
5U/ μ l KAPA Taq DNA Polymerase	0,2 μ l	1,5U
DNK matrica	2-10 μ l	100ng/reakc

PCR reakciona smeša se stavlja u PCR aparat u kojem se odvija dalji tok reakcije. Korišten je PCR aparat proizvođača Eppendorf. PCR reakcija započinje hot-start-om na 95°C u trajanju od 5 minuta, sa ciljem kompletne denaturacije dvolančane DNK i smanjivanja nespecifičnog vezivanja prajmera za DNK sekvencu, redukcije stvaranja prajmer-dimera i povećanja prinosa PCR produkta. PCR reakcija se nastavlja ponavljanjem 35 ciklusa, od kojih se svaki sastoji od tri osnovne faze: denaturacije (razdvajanje dvolančane DNK na jednolančane matrice), hibridizacije prajmera (eng. annealing) i elongacije prajmera dodavanjem nukleotida na 3' krajeve prajmera pomoću DNK polimeraze.

Zagrevanje reakcione smeše na 95°C pri čemu dolazi do denaturacije, odnosno razdvajanja dvostrukih lanaca DNK traje 30 sekundi. Zatim se reakciona smeša hladi na 63°C pri čemu

dolazi do vezivanja prajmera. Ova faza traje oko 30 sekundi. Elongacija se odvija na 72°C kada Taq polimeraza započinje polimerizaciju i dostiže maksimum aktivnosti. Trajanje ove faze je 20 sekundi. Nakon 35 ponovljenih ciklusa sprovodi se finalna elongacija 7 minuta na 72 °C, pri čemu dolazi do kompletiranja parcijalno elongiranih produkata.



Slika 22. Shematski prikaz PCR reakcije(<https://biosistemika.com/workshops>)

Temperaturni profil PCR reakcije za umnožavanje promotorskog regiona *UGT1A1* bio je:

95°C 5min

(95°C /30s, 63°C /30s, 72°C /20s) 35 ciklusa

72°C 7min

3.2.3. Fragment analiza

Nakon umnožavanja promotorskog regiona *UGT1A1* gena pomoću klasične metode PCR reakcije i analize produkta na poliakrilamidnom gelu, nasumično je odabrano 20% uzoraka na kojima je izvršena genotipizacija fragment analizom, u svrhu provere dobijenih rezultata, kao i validnosti primenjene PCR metode.

Fragment analiza za analizu polimorfizma broja ponovaka TA sekvenci u promotorskom regionu *UGT1A1* gena, je odabrana kao metoda zbog svoje specifičnosti i senzitivnosti. Koristi se za proučavanje gena analizom polimorfizama dužine genetičkog markera.

Fragment analiza je specifična po tome što se koriste fluorescentno obeleženi prajmeri, koji se vezuju za ciljane sekvencu i nakon PCR reakcije vrši se kapilarna elektroforeza u automatskom DNK sekvenceru, gde se detektuje fluorescentni signal. U kapilari PCR produkti putuju do detektora fluorescentnog signala, tako da kraći produkti putuju brže i njihovi fluorescentni signali se registruju prvi.

PCR reakciona smeša je bila u volumenu od 12 μ l u kojoj se nalazilo 50ng DNK, 1xPCR buffer (Qiagen), 15,4mM MgCl₂, 0,4mM dNTPs, 1U HotStart polymerase (Qiagen) i po 4 μ l UGT1A1F i UGT1A1R prajmera. PCR reakcija otpočinje aktivacijom polimeraze na 95°C 15 minuta, nakon čega sledi 35 ponavljanja ciklusa denaturacije 95°C 30 sekundi, aniling na 55°C 30 sekundi i 30 sekundi elongacija na 72°C. Nakon 35 ciklusa reakcija se završava finalnom ekstenzijom na 72°C u trajanju od 7 minuta. PCR produkti su razdvajani na Applied Biosystems 3130 DNA Analyzer i dobijeni podaci su analizirani sa Gene Mapper v4 softverom.

3.2.4. Analiza DNK na agaroznom gelu

Provera količine dobijenog PCR produkta vršena je na horizontalnom 2% agaroznom gelu. Gel je pravljen rastvaranjem agaroze u puferu 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8,0), pri čemu je isti pufer korišćen i za elektroforezu. U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum bromid (finalna koncentracija 0,5 μ g/ml), koja interkalira u DNK i omogućava vizuelizaciju. Elektroforeza se izvodi 30 minuta, pri jačini struje od 110 mA i naponu od 110 V. Marker koji je korišten je bio dužine 100bp, a PCR produkt dobijen iz ove reakcije je bio dužine 69-75 baznih parova. DNK je vizualizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm. Nakon elektroforeze gelovi su dokumentovani CCD kamerom sa *BioDocAnalyze* sistemom. Na osnovu debljine trake na agaroznom gelu određivanja je količina PCR produkta koja se nanosila na poliakrilamidni gel.

3.2.5. Analiza DNK elektroforezom na poliakrilamidnom gelu

Poliakrilamidna gel elektroforeza pogodna je za razdvajanje malih molekula DNK i za uzorke sa malom količinom DNK, a primenjuje se i u slučajevima kada je potrebno da se postigne veća rezolucija i bolje razdvajanje traka nego što je to moguće na agaroznoj gel elektroforezi. Koristi se 15% poliakrilamidni gel koji se pravi rastvaranjem akrilamida (19:1) u vodi i 10xTBE (Tris-Borate-EDTA Buffer) puferu, a za inicijaciju polimerizacije se koriste 10% amonijumpersulfat (APS) i tetrametilendiamin (TEMED).

Odmah po rastvaranju APS-a i TEMED-a gel se nanosi između dve staklene ploče montirane na vertikalni držač. Zatim se u gel stavlja češljic sa odeljcima od 0,75mm. Gel se ostavlja pod lampom dok ne polimeriše u potpunosti. Ploča sa gelom se prenosi na nosač koji se smešta u vertikalnu kadu za elektroforezu. Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1xTBE. Prvo se pušta jedan ciklus (pre-run) na 300V, 60mA u trajanju od 40 minuta, u cilju zagrevanja gela, i za postizanje boljih performansi elektroforeze uzoraka.

PCR produkt se pomeša sa *Blue Loading Buffer 6x*, i sva količina se nanosi u bunariće na 15% poliakrilamidni gel. Kao marker koristi se Ladder od 5bp. Elektroforeza se odvija na 300V/60mA u trajanju od 5 sati.

Nakon završetka elektroforeze, vrši se razvijanje gela i bojenje srebro nitratom. Gel se pažljivo izvadi između ploča i inkubira 20-30 minuta na klackalici, u kadici sa rastvorom 10% etanol-sirćetne kiseline. Zatim se rastvor etanol-sirćetne kiseline prospe i gel se prelije rastvorom 0,1% srebro nitrata (rastvor AgNO_3 čuva se u mraku do upotrebe). Bojenje gela srebro nitratom se vrši u mraku, na klackalici. Nakon 10 minuta gel se 2 puta ispere vodom i prelije razvijanjem (1,5% NaOH; 0,01% NaBH_4 ; 0,048% formaldehid). Razvijanje gela traje 10-20 minuta.

Kada se na gelu pojave jasne i čitljive trake, proces razvijanja se zaustavlja 0,75% rastvorom Na_2CO_3 . Gel se slika CCD kamerom i slike se dokumentuju u arhivi.

3.2.6. Sekvenciranje DNK

(prema protokolu za *BigDye Terminator Ready Reaction Kit - Applied Biosystems*)

Metodom sekvenciranja se određuje redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK polimeraze da sintetiše komplementarni lanac DNK, nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK, pri čemu koristi smešu dezoksiribonukleotida i didezoksiribonukleotida (Sanger et al., 1977). Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Na ovaj način se dobija serija jednolančanih fragmenata čija se dužina razlikuje za po jedan bazni par. Svaki od četiri dideoksinukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućeno da se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji umesto u četiri odvojene. Za sekvenciranje DNK korišćen je *BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*).

Umnoženi PCR produkti su proveravani elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Zatim je vršeno prečišćavanje produkta na koloni korišćenjem kompleta *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)* prema uputstvu proizvođača. U mikrotubu sa PCR smešom je dodavano 85 µl PB pufera, nakon čega je smeša vorteksovana i centrifugirana tokom 5s. Čitava zapremina je nanošena na QIAquick spin kolonu i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min radi vezivanja umnoženog PCR produkta za kolonu. Eluat je odbacivan, nakon čega je kolona ispirana sa 750 µl pufera PE a zatim i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min. Nakon odbacivanja eluata, kolona je dodatno centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min, zbog dodatnog uklanjanja preostale tečnosti. QIAquick kolona je na kraju prebacivana u čistu mikrotubu od 1,5 ml i vršeno je eluiranje sa kolone uz pomoć EB pufera, centrifugiranjem na 13 000 rpm tokom 1 min. U reakcijama sekvenciranja su korišćeni isti prajmeri kao i za umnožavanje fragmenta u PCR reakciji. Smeša za reakciju sekvenciranja, finalne zapremine 8µl, sadržala je sledeće komponente:

- 3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-500bp)
- Prajmer za sekvenciranje (finalna koncentracija 3.2 pmol)
- 3µl Ready Reaction Mix (*Applied Biosystems*)

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje bio je: 96°C/1min (96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) X 25 ciklusa 4°C/∞. Nakon završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani precipitacijom Na-acetatom. U 8 µl smeše je dodavano po 40 µl 0,1M Na-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu. Zatim je vršeno centrifugiranje na 13 000 rpm tokom 20 min, uz odlivanje supernatanta. Na talog je potom dodavano 200 µl 70% etanola, praćeno centrifugiranjem 10 min na 13000 rpm, posle čega je supernatant uklanjan. Ovaj korak je ponavljan dva puta. Nakon toga talog je u potpunosti osušen. Osušeni talog je rastvaran u 25 µl formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*) i celokupna zapremina je korišćena za kapilarnu elektroforezu. Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*.

3.2.7. *In silico* analiza intronskih varijanti *UGT1A1* gena

Za *in silico* analizu varijanti detektovanih u intronu 2 i intronu 3 gena *UGT1A1* korišten je kompjuterski algoritam dostupan na internetu. To je program MatInspector (Cartharius et al., 2005). Zadati uslov je bio kriterijum da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora iz biblioteke vertebrata za ispitivanu sekvencu bude 0.75.

3.2.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka u ovoj studiji kao testovi značajnosti korišten je Fisher-ov Exact test, dok su za testove normalnosti korišteni Shapiro-Wilk-ov test i Kolmogorov-Smirnov test. Za upoređivanje vrednosti nekonjugovanog bilirubina u dve grupe ispitanika (pacijenati i zdrave kontrole) korišten je Man –Vitnijev test.

Sve statističke analize izvršene su pomoću IBM SPSSv.21 s softvera.

3.2.8.1. Fišerov egzaktni test

Fišerov egzaktni test je test značajnosti i koristi se za analizu tabela kontingencije (eng.contingency tables), umesto χ^2 testa. U praksi se koristi kada je veličina uzorka mala, ali je validan i za velike uzorke.

3.2.8.2. Šapiro-Vilkov test

Šapiro-Vilkov test (eng. Shapiro-Wilk test) normalnosti je jedan od tri opšta testa normalnosti, kreirana da detektuju sva odstupanja od normalnosti. U kombinaciji sa još nekim testom normalnosti predstavlja dobar alat za određivanje normalnosti. Test odbacuje hipotezu normalnosti kada je p-vrednost manja ili jednaka 0,05. Ovakav rezultat dopušta zaključak sa 95% pouzdanosti da rezultati ne podležu normalnoj raspodeli (www.variation.com). Ukoliko test pokaže p-vrednost veću od 0,05, jedini zaključak koji se može doneti je da ne postoji značajno odstupanje od normalne raspodele.

3.2.8.3. Kolmogor-Smirnov test

Kolmogor-Smirnov test se koristio za ispitivanje normalnosti distribucije ne-konjugovanog bilirubina kod pacijenata sa Žilberovim sindromom. Normalnost se pokazuje statistički neznačajnim (slučajnim) odstupanjem od normalnosti, tj. iznosom **Sig.** većim od 0,05. U slučaju kada je Sig 0,000 pretpostavka o normalnosti nije potvrđena i mora se odbaciti. Ovo je uobičajeni slučaj za velike uzorke. (Pallant, 2017)

3.2.8.4. Man-Vitnijev test

Man-Vitnijev (eng. Mann-Whitney) test se upotrebljava za ispitivanje razlika između dve nezavisne grupe na neprekidnoj skali. Umesto da poredi srednje vrednosti dve grupe kao što se to radi u t-testu, u Man-Vitnejevom testu poredi se njihove medijane. Dobijene vrednosti neprekidne promenljive pretvara u rangove za obe grupe i potom se izračunava da li se rangovi tih grupa značajno razlikuju. Kako se rezultati pretvaraju u rangove, stvarna raspodela rezultata nije važna. U našoj studiji poredili smo nivo ne-konjugovanog bilirubina između ispitanika sa rizičnim genotipom i ispitanika sa nerizičnim genotipom. (Pallant, 2017).

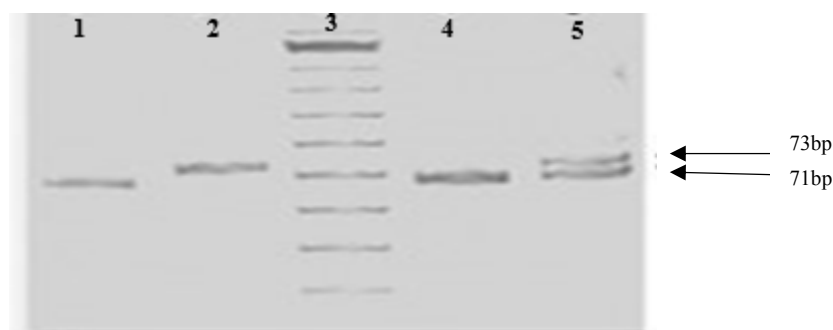
4. REZULTATI

4.1. Detekcija promotorskih varijanti *UGT1A1* gena, optimizacija metodologije

4.1.1. Analiza promotorskih varijanti *UGT1A1* reakcijom PCR

Svim ispitanicima u ovoj studiji izvršena je genotipizacija promotorskih varijanti *UGT1A1* gena. Za analizu promotorskih varijanti *UGT1A1* gena korišćena je lančana reakcija polimeraze u kojoj je umnožavan promotorski region *UGT1A1* gena. Nemutirana promotorska varijanta (*UGT1A1**1) koja ima 6TA ponovaka u TATA promotorskom elementu daje PCR produkt dužine 71bp. Druge varijante koje je moguće detektovati ovom reakcijom su *UGT1A1**35 sa 5TA ponovaka, *UGT1A1**28 sa 7TA ponovaka i *UGT1A1**37 sa 8TA ponovaka. Dužine PCR fragmenata ovih varijanti su 69, 73 i 75 baznih parova, respektivno. S obzirom da se dužine očekivanih PCR fragmenata razlikuju za svega 2bp za elektroforetsko razdvajanje fragmenata je korišćen 15% poliakrilamidni gel.

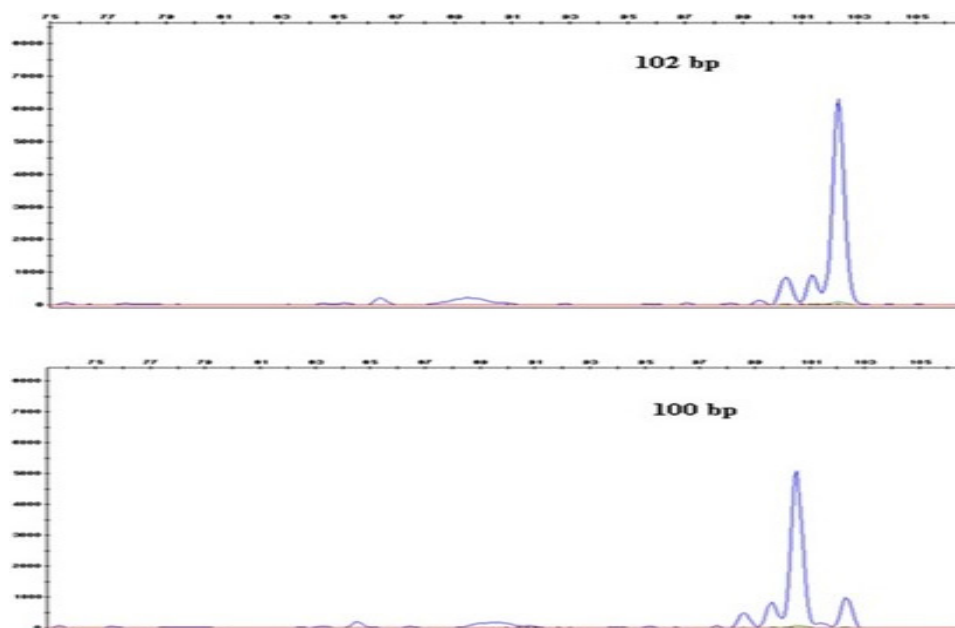
U ovoj studiji detektovane su 3 promotorske *UGT1A1* alelske varijante: *UGT1A1**1, *UGT1A1**28 i *UGT1A1**37, sa šest, sedam i osam TA ponovaka u TATA promotorskom elementu. U svim analiziranim grupama ispitanika i pacijenata detektovana su tri genotipa 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA (Slika 23), dok su u grupi sa ŽS detektovana i dva slučaja sa genotipom 7/8 TA.



Slika 23. PCR produkti *UGT1A1*(TA)_n promotora nakon elektroforeze na 15% akrilamidnom gelu obojenom Ag-nitratom. Kolone 1 i 4 - 6/6 TA ponovci (71bp), kolona 2 - 7/7 TA ponovci (73bp), kolona 5 - 6/7 TA ponovaka (71bp i 73 bp). Kolona 3 -5bp DNK marker

4.1.2. Analiza promotorskih varijanti *UGT1A1* fragment analizom

Dvadeset procenata slučajno odabranih uzoraka je podvrgnuto analizi promotorskih varijanti fragment analizom. Na elektroferogramu dobijenom fragment analizom uzoraka kod ispitanika sa 7/7 TA genotipom pik se javlja na poziciji 102bp, dok se kod genotipa 6/6 TA, pik javlja na 100bp (Slika 24).

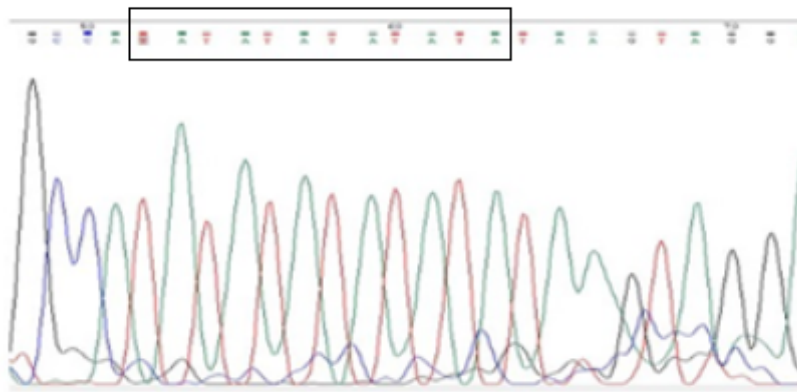


Slika 24. Elektroferogram dobijen fragment analizom dužine ponovaka *UGT1A1(TA)_n* promotora. Gornji pik - 7/7 TA ponovaka (102bp). Donji pik - 6/6 TA ponovaka (100bp).

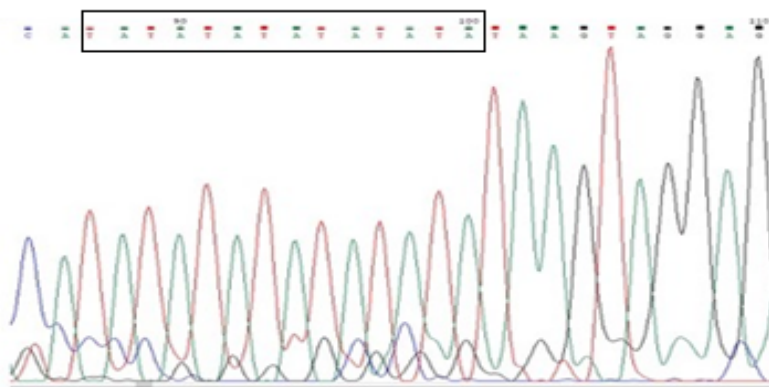
Kod svih uzoraka koji su testirani fragment analizom potvrđen je genotip koji je dobijen u analizi elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.

4.1.3. Analiza promotorskih varijanti *UGT1A1* sekvenciranjem po Sangeru

Na deset procenata nasumično odabranih uzoraka izvršeno je sekvenciranje PCR produkata umnoženog regiona promotora *UGT1A1* metodom po Sangeru. Ova metoda je upotrebljena sa ciljem da se provere rezultati dobijeni PCR/poliakrilamidnom elektroforezom. Sekvenca promotorskog TATA bloka započinje adeninom, nastavlja se TA ponovcima u 5, 6, 7 ili 8 kopija i završava se sa TAA motivom (A(TA)₅₋₈TAA). Na elektroferogramu je očitavan broj TA ponovaka u sekvenci. Kod naših ispitanika sekvenciranjem smo utvrdili tri genotipa *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA (Slika 25 i Slika 26).



Slika 25. Elektroferogram dobijen sekvenciranjem promotora *UGT1A1* gena kod ispitanika sa *UGT1A1* 6/6 TA genotipom



Slika 26. Elektroferogram dobijen sekvenciranjem promotora *UGT1A1* gena kod ispitanika sa 7/7 TA genotipom

Sekvenciranjem promotorskog regiona kod svih ispitanika potvrđeni su rezultati dobijeni PCR/poliakrilamidnom gel elektroforezom, kao i fragment analizom. Uzorci kod kojih je potvrđen *UGT1A1* 6/6 TA i 7/7 TA genotip korišteni su kao negativne, odnosno pozitivne kontrole u svakom ciklusu poliakrilamidne gel elektroforeze.

U našoj studiji pokazali smo da su sve tri metode validne za dijagnostiku ŽS i da se u rutinskoj praksi može koristiti metoda koju smo dizajnirali u našoj laboratoriji, a zasnovana je na PCR i poliakrilamidnoj gel elektroforezi.

4.2. *UGT1A1* gen i Žilberov sindrom

Pacijenti kojima je na osnovu kliničkih parametara uspostavljena dijagnoza ŽS, podvrgnuti su genetičkom testiranju promotorskih varijanti *UGT1A1* gena. Ukoliko dijagnoza ŽS nije potvrđena brojem TA ponovaka u promotoru *UGT1A1* gena, tj. nije detektovan genotip *UGT1A1* 7/7 TA, sekvencirani su kodirajući regioni *UGT1A1* gena.

4.2.1 Učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u grupi pacijenata sa ŽS

Grupa pedijatrijskih pacijenata sa ŽS se sastojala od 32 ispitanika muškog (62,75%) i 19 ispitanika ženskog pola (37,25%). Srednja dob ispitanika je bila 16 godina (od 3 do 19 godina). U ovoj grupi pacijenata detektovana su 4 genotipa *UGT1A1*(TA)_n promotora: 6/6 TA, 6/7 TA, 7/7 TA i 7/8 TA. Distribucija *UGT1A1*(TA)_n genotipova kod pedijatrijskih ŽS pacijenata bila je 6/6 TA (3,92%), 6/7 TA (15,87%), 7/7 TA (76,4%) i 7/8 TA (3,92%) (Tabela 14). Zbog malog broja nosilaca 6/6 TA i 7/8 TA genotipa, za dalju analizu grupe sa 6/6 TA (3,92%) i 6/7 TA (15,87%) *UGT1A1* promotorskim genotipom su objedinjene u grupu koja je označena kao nerizična grupa za ŽS, dok su ispitanici sa genotipom 7/7 TA (76,4%) i 7/8 TA (3,92%) svrstani u grupu koja se tretirala kao grupa sa rizikom za pojavu ŽS.

Tabela 14. Učestalost promotorskih *UGT1A1* genotipova u grupi pacijenata sa ŽS i u kontrolnoj grupi

<i>UGT1A1</i> (TA) _n genotip	ŽS pacijenti (n=51)		Zdrava kontrolna grupa (n=100)	
	n	%	N	%
6/6	2	3,92	37	37
6/7	8	15,87	47	47
7/7	39	76,47	16	16
7/8	2	3,92	0	0

Kod 80,39% pacijenata kojima je klinički postavljena dijagnoza ŽS, otkriven je rizičan promotorski genotip, dok je u kontrolnoj grupi taj procenat bio pet puta niži i iznosio je 16%. Deset pacijenata (19,61%) iz grupe kojoj je kliničkim testovima postavljena sumnja na ŽS nije

imalo rizični genotip, te se uzrok hiperbilirubinemije nije mogao povezati sa promotorskom varijantom *UGT1A1**28. U kontrolnoj grupi bilo je 84% ispitanika sa nerizičnim *UGT1A1* promotorskim genotipom.

Razlike u distribuciji *UGT1A1*(TA)_n promotorskih genotipova u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa ŽS bile su statistički značajne (Fišerov egzaktni test, p<0.001).

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se 7TA alel (*UGT1A1**28) u grupi pacijenata sa ŽS javljao sa učestalošću od 86,27%, dok je u kontrolnoj grupi bio zastupljen sa 40%.

Kod 2 pacijenta sa ŽS identifikovana je izuzetno retka varijanta sa 8TA ponovaka (*UGT1A1**37).

Nosioci rizičnih genotipova za ŽS imali su 21 puta veću šansu za razvoj ŽS nego nosioci nerizičnih genotipova, OR=21,5(9.0-51.6), p<10⁻¹⁴ (Fišerov egzaktni test).

U ovoj studiji dijagnostička vrednost *UGT1A1*(TA)_n markera za dijagnozu ŽS bila je 80%.

4.3. *UGT1A1* gen i Krigler-Najarov sindrom tip 2

Kod 20% pedijatrijskih pacijenata kod kojih je na osnovu kliničke slike, biohemijskih parametara, hipokalorijskog i fenobarbitonskog testa dijagnostikovano ŽS, a kod kojih genetičkom analizom promotora nije potvrđena asocijacija promotorskih varijanti sa fenotipom ŽS, postavljena je sumnja na postojanje Krigler Najarovog sindroma tip 2 (CN2). CN2 se javlja kao posledica nukleotidne zamene u kodirajućim egzonskim sekvencama što rezultira smanjenjem ali ne i gubitkom enzimske aktivnosti UGT1A1. Sekvenciranje stalnih egzona gena *UGT1A1* je izvršeno kod 10 pacijenata. Alelske varijante u kodirajućim regionima *UGT1A1* gena bi mogle biti uzrok hiperbilirubinemije kod ove grupe pacijenata, i dijagnoza CN2 bi bila potvrđena.

4.3.1. Sekvenciranje *UGT1A1* gena kod pacijenata sa sumnjom na CN2

Kod 10 pacijenata su sekvencirana 4 stalna egzona na 3' kraju *UGT1A1* gena uključujući i intron-egzon granice: egzon 2, egzon 3, egzon 4 i egzon 5. Sekvenciran je i prvi varijabilni egzon *UGT1A1* gena koji je zbog veličine sekvenciran u dve odvojene reakcije sa 2 različita para prajmera.

Samo kod jednog pacijenta koji je imao 6/7 TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1* gena, su pronađene varijante dva pojedinačna nukleotida: NM_000463.2 c.997-82T>C (intron 2, pozicija 602 od 683) i c.1084+12G>A (intron 3, pozicija 12 od 283). Prva varijanta je

nađena u intronu 2 na poziciji 602 od 683 i nastala je zamenom timina sa citozinom. Druga varijanta je otkrivena u intronu 3 na poziciji 12 od 283, a nastala je zamenom guanina sa adeninom. Obe varijante nisu do sada prijavljene dbSNPs.

4.3.2. *In silico* predikcija relevantnosti uočenih varijanti u transkripcionoj regulaciji *UGT1A1* gena

U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za varijante detektovane u DNK sekvencama u intronu 2 i intronu 3 *UGT1A1* gena (NM_000463.2 c.997-82T>C, intron 2, pozicija 602 od 683; c.1084+12G>A, intron 3, pozicija 12 od 283) identifikovane kod našeg pacijenta sa sumnjom na ŽS korišćen je program MatInspector (Cartharius et al 2005).

Za varijantu u intronu 2, c.997-82T>C, dobijeni rezultati pokazuju da se u nemutiranoj sekvenci, kada je prisutan T nukleotid, za ovu sekvencu vezuju transkripcioni faktor iz familije AT-vezujućih transkripcionih faktora (AT-vezujući TF1) i alternativno iskrajana varijanta FOXP1 transkripcionog faktora (eng. forkhead box protein P1), aktivirana u embrionalnim matičnim ćelijama. Kada je prisutna varijanta koja umesto T sadrži nukleotid C, mesta vezivanja za ova dva transkripciona faktora se ukidaju i za ovu sekvencu se vezuje samo transkripcioni faktor v-Myb, varijanta AMV v-myb (eng. avian myeloblastosis virus) faktora koji pripada familiji ćelijskih i virusnih myb-nalik transkripcionih regulatora.

U slučaju varijante *UGT1A1* gena u trećem intronu c.1084+12G>A, rezultati dobijeni MatInspector analizom pokazuju da se za nemutiranu sekvencu, kada je prisutan G nukleotid, vezuju sledeći transkripcioni regulatori: LSTM element (eng. localized sequence tandem motif) sa spejserom od 8bp iz familije tandemskih sekvenci lokalizovanih motiva, SP1 transkripcioni faktor, KLF7 transkripcioni faktor (eng. Kruppel-like transcription factor) i transkripcioni faktor iz familije cinkanih prstića tipa BED sa 4 GC-bogata regiona. Kada je umesto G nukleotida prisutan varijantni A nukleotid, ukidaju se mesta prepoznavanja sva pomenuta 4 transkripciona faktora, a uvodi se mesto prepoznavanja za autoimuni regulator AIRE (eng. autoimmune regulator element).

4.4.Hiperbilirubinemije uzrokovane hemolizom kod talasemijskih sindroma i hroničnim hepatitisom C

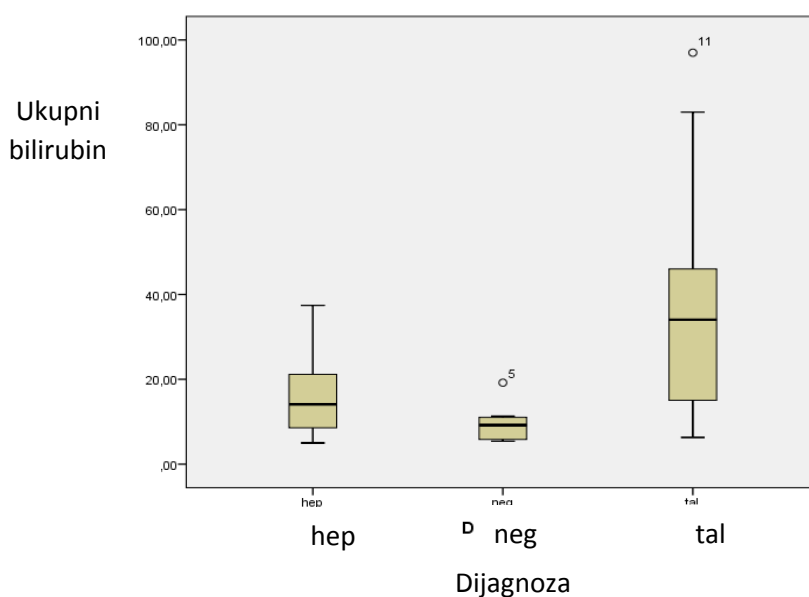
Kod talasemijskih sindroma, zbog sinteze defektnog β -globinskog lanca,dolazi do pojačane hemolize i posledično tome do porasta nivoa bilirubina u serumu. Takođe kod bolesti jetre, kao što je hronični hepatitis C, dolazi do povećanja nivoa bilirubina, usled oštećenja i fibroze jetre, te smanjenja njene funkcije.

U ovoj studiji imali smo grupu od 22 pacijenta sa dijagnozom β -talasemije minor i 24 pacijenta sa hroničnim hepatitisom C(Tabela 15).

Tabela 15. Nivo ukupnog bilirubina kod pacijenata sa talasemijom i HHC

	Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	Medijana	Std. devijacija	Broj ispitanika
Talasemije	37,04	34,05	25,84699	22
Hronični hepatiitis C	16,33	14,10	9,83898	24
Kontrole	9,5938	9,200	4,52000	8

Izmerena vrednost ukupnog bilirubina kod pacijenata sa talasemijom je bila visoka i za 3,86 puta je bila veća nego vrednosti kod kontrolne grupe. Kod pacijenata sa HHC vrednost ukupnog bilirubina je bila veća za 1,7 puta od vrednosti iz kontrolne grupe.



Slika 27. Medijana i interkvartilni opseg nivoa bilirubina u tri grupe ispitanika. Hep – pacijenti sa hroničnim hepatitisom C; tal - pacijenti sa β -talasemijom minor; neg - kontrolna grupa zdravih ispitanika

Standardna devijacija od 25,84 za medijanu od 34,05 kod pacijenata sa talasemijom ukazuje na velike oscilacije u vrednostima ukupnog bilirubina kod pojedinačnih pacijenata što može biti posledica individualnih genetičkih razlika za *UGT1A1* gen. Slično, mada manje izraženo, se uočava i kod pacijenata sa HHC (Slika 27). Ovakvi rezultati za vrednosti bilirubina ukazuju i na potrebu da se pacijentima obolelih od ovih bolesti utvrdi i individualna sposobnost konjugacije bilirubina i klirensa bilirubina, što smo mi i uradili u ovoj studiji.

4.5. Učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata sa talasemijskim sindromima

Kod svih 22 pacijenta sa β -talasemijom minor izvršena je genotipizacija za promotorske varijante *UGT1A1* sa ciljem da se shvate interindividualne razlike i značajne oscilacije u vrednostima bilirubina u serumu. Očekivano je da pacijenti koji su homozigotni nosioci za 6TA *UGT1A1* promotorsku sekvencu imaju najniže vrednosti, dok homozigoti za 7TA promotorsku varijantu imaju najviše vrednosti. Rezultati ovog dela studije su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Uporedni prikaz vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na genotip promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor

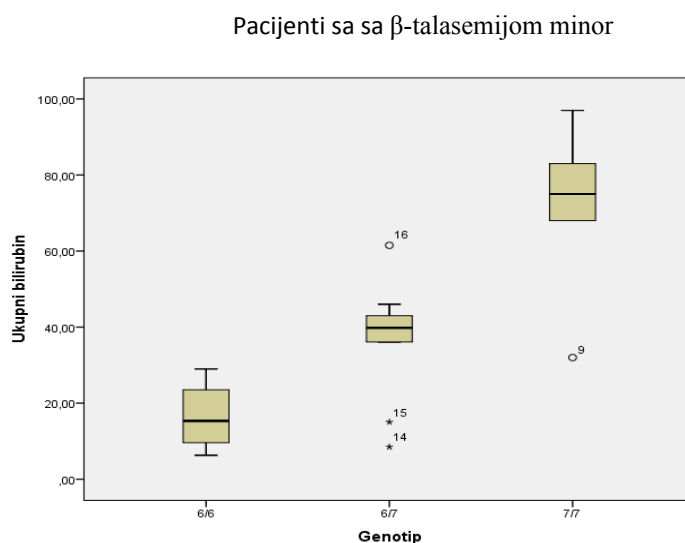
	Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	Medijana	Std. devijacija	Broj ispitanika (%)	Broj zdravih ispitanika
6/6	16,52	15,35	8,45505	8 (36)	37 (37)
6/7	36,41	39,80	15,91454	9 (41)	47 (47)
7/7	71,00	75,00	24,32077	5 (23)	16 (16)

U grupi pacijenata sa β -talasemijom minor nakon genotipizacije za promotorske varijante *UGT1A1* gena utvrđeno je da su prisutna sva tri genotipa. Genotip 6/6 TA bio je prisutan kod 8(36%) pacijenata, heterozigotni 6/7 TA genotip kod 9 (41%), a homozigotni za promotorsku varijantu od 7TA ponovaka (7/7 TA) kod 5 ispitanika (23%). U odnosu na učestalosti genotipova u opštoj, zdravoj populaciji uočava se neznatno veći broj pacijenata sa 7/7 TA genotipom nego u grupi zdravih ispitanika.

Što se tiče nivoa bilirubina u odnosu na genotip *UGT1A1* gena, najniže vrednosti bilirubina su izmerene kod pacijenata sa 6/6 TA genotipom, upravo kao što je bilo i očekivano. Kod heterozigotnih 6/7 TA nosilaca vrednosti bilirubina su bile više za 2,2 puta nego kod 6/6 TA genotipa. Najviše vrednosti bilirubina uočene su kod homozigotnih nosilaca *UGT1A1**28 varijante (7/7 TA). Izmerene vrednosti bilirubina u ovoj grupi pacijenata bile su 4,3 puta veće nego u grupi sa 6/6 TA genotipom.

4.5.1. Analiza korelacije nivoa ukupnog bilirubina u odnosu na promotorske varijante *UGT1A1* kod pacijenata sa sindromom β -talasemija minor

Statističkom obradom dobijenih rezultata uočava se da distribucija nivoa ukupnog bilirubina nije ista kod svih genotipova promotorskih varijanti za *UGT1A1* gen (Slika 28), kao i da je najviša kod genotipa koji u homozigotnom stanju ima varijantu *UGT1A1**28 sa 7TA ponovaka u svom promotorskom regionu. Ovaj genotip ima najnižu ekspresiju *UGT1A1* gena, a samim tim i najnižu aktivnost *UGT1A1* enzima.



Slika 28. Medijana i interkvartilni opseg nivoa bilirubina u tri grupe pacijenata sa β -talasemijom minor u odnosu na njihove genotipove promotorskih varijanti za *UGT1A1* gen. 6/6 – homozigoti za nemutiranu varijantu *UGT1A1**1; 6/7- heterozigotni nosioci *UGT1A1* *1/*28; 7/7 – homozigotni nosioci varijante *UGT1A1**28.

Kada se posmatra standardna devijacija kod ovako formiranih grupa pacijenata sa β -talasemijom minor, gde se u razmatranje uzima i sposobnost svakog pojedinca da metabolizira bilirubin, uočava se da su vrednosti standardne devijacije manje nego u slučaju kada grupu pacijenata sa β -talasemijom minor posmatramo kao homogenu.

Rezultati ove studije pokazali su da se *UGT1A1* gen može tretirati kao gen modifikator kod beta-talasemijskih sindroma.

4.5.2. β -talasemija minor prikrivena kliničkom slikom Žilberovog sindroma

U grupi pacijenata kod kojih je na osnovu kliničkih pregleda, testova i parametara postavljena sumnja na ŽS bilo je 20% pacijenata kod kojih genetičkim testom za promotorske varijante *UGT1A1* nije potvrđen ŽS. Daljim genetičkim analizama pokušalo se utvrditi genetička osnova hiperbilirubinemije. Kod jednog pacijenta (od 10 ispitivanih) kod kojeg nije potvrđen ŽS, a koji je imao genotip 6/7 TA, utvrđeno je da je nosilac β -talasemije minor, te da je visok nivo bilirubina ustvari posledica hemolize.

4.6. Učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C

Dugotrajna infekcija virusom hepatitisa C, dovodi do teških oštećenja jetre, kao i do njene fibroze što rezultira smanjenom funkcijom jetre i jetrenih enzima. Jedan od osnovnih parametara koji ukazuje na stepen fibroze i ciroze jetre je i nivo bilirubina u krvi (Čajld-Puova klasifikacija) (Degoricija, 2004). S obzirom da je do sada malo poznat značaj genetičkih faktora koji se mogu povezati sa teškim oštećenjima jetre i virusološkim relapsom kod pacijenata sa HHC, u ovoj studiji smo pokušali da rasvetlimo ulogu i značaj promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u pojavi teške fibroze jetre. Ispitali smo učestalost genotipova i odnos nivoa ukupnog bilirubina u odnosu na genotip promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod 24 pacijenata sa HHC kod kojih je došlo do značajne fibroze jetre (Tabela 17).

Tabela 17. Uporedni prikaz vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na genotip promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata sa HHC

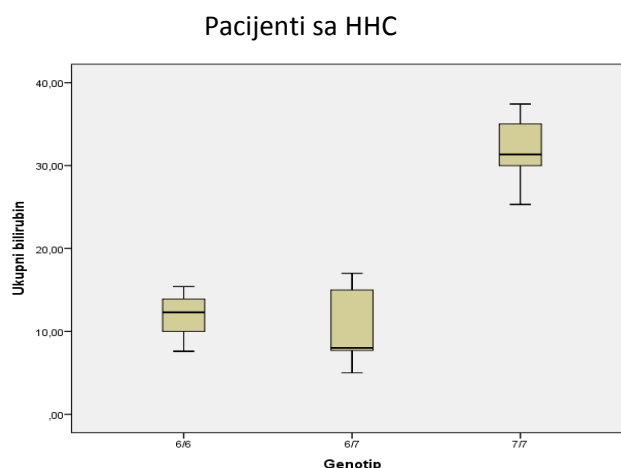
	Ukupni bilirubin(μ mol/l)	Medijana	Std. devijacija	Broj ispitanika sa HHC (%)	Broj zdravih ispitanika (%)
6/6	11,83	12,30	2,6949	9 (37,5)	37 (37)
6/7	10,5667	8,00	4,68802	9 (37,5)	47 (47)
7/7	31,7333	31,3350	4,19784	6 (25)	16 (16)

Homozigotnih nosilaca nemutirane *UGT1A1* promotorske varijante sa 6TA ponovaka bilo je 9 (37,5%). Isto toliko je bilo i heterozigotnih nosilaca, dok je homozigotnih nosilaca varijante

sa 7TA ponovaka bilo 6 (25%). Ako se uporede ove vrednosti sa učestalošću genotipova zdravih ispitanika iz opšte populacije, uočava se veća zastupljenost 7/7 TA genotipa kod pacijenata sa HHC (25%) nego u zdravoj kontrolnoj grupi (16%), dok je učestalost 6/6 TA genotipa ista u obe grupe ispitanika.

4.6.1. Analiza korelacije nivoa nekonjugovanog bilirubina u odnosu na promotorske varijante *UGT1A1* kod pacijenata sa hroničnim hepatitisom C

Srednje vrednosti ukupnog bilirubina kod pacijenata koji su imali 6/6 TA i 6/7 TA genotip su bile približno iste i nisu odstupale od referentnih vrednosti. Kod pacijenata sa 7/7 TA genotipom vrednosti ukupnog bilirubina su bile oko 3 puta više u odnosu na 6/6 i 6/7 TA genotipove. Srednja vrednost ukupnog bilirubina kod genotipa 6/7 TA bila je 10,5667 μ mol/l, dok je medijana bila 8, što ukazuje na to da je polovina ispitanika imala niske vrednosti bilirubina, dok je u drugoj polovini bilo većih odstupanja od srednje vrednosti (Slika 29).



Slika 29. Medijana i interkvartilni opseg nivoa bilirubina u tri grupe pacijenata sa hroničnim hepatitisom C (HHC) u odnosu na njihove genotipove promotorskih varijanti za *UGT1A1* gen. 6/6 – homozigoti za nemutiranu varijantu *UGT1A1**1; 6/7- heterozigotni nosioci *UGT1A1* *1/*28; 7/7 – homozigotni nosioci varijante *UGT1A1**28.

Visoke vrednosti bilirubina kod pacijenata sa teškom fibrozom jetre i 7/7TA genotipom ukazuju da oštećenje jetre virusnom infekcijom udruženo sa genetički uslovljenom smanjenom ekspresijom *UGT1A1* gena, rezultiraju hiperbilirubinemijom. Mora se uzeti i u obzir i da se preporuča za prekid lečenja ribavirinom, koji se koristi u lečenju HHC, daje za vrednosti bilirubina veće od 5mg/dL (85 μ mol/L) (<https://mediately.co/hr/drugs>).

4.7. Uporedni prikaz vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor i HHC

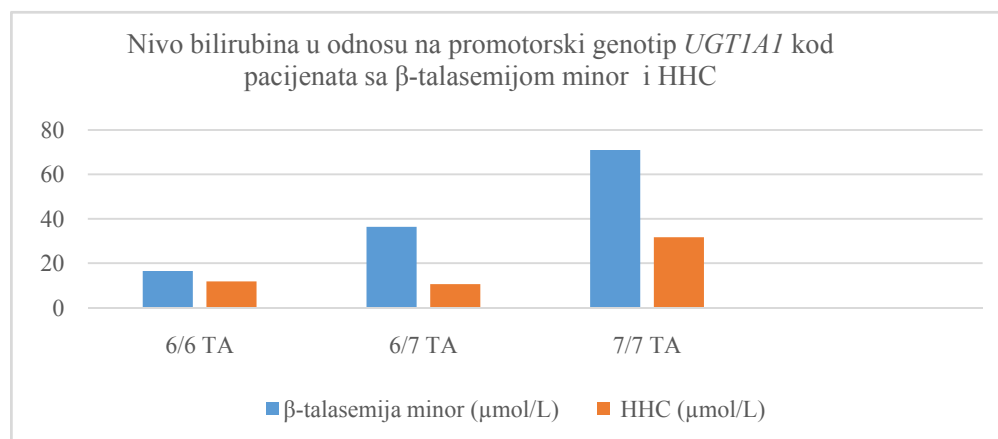
Analizom nivoa ukupnog bilirubina kod dve ispitivane grupe pacijenata u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gena uočava se da su više vrednosti bilirubina kod pacijenata sa β -talasemijom minor kod kojih je prisutna hemoliza nego kod pacijenata sa HHC sa teškom fibrozom jetre (Tabela 18).

Tabela 18. Ukupni bilirubin u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gen kod pacijenata sa β -talasemijom minor i HHC

	Ukupni bilirubin kod pacijenata sa β -talasemijom minor ($\mu\text{mol/L}$)	Ukupni bilirubin kod pacijenata sa HHC ($\mu\text{mol/L}$)
6/6 TA	16,52	11,83
6/7 TA	36,41	10,5667
7/7 TA	71,00	31,7333

Ukoliko rezultate iz Tabele 18 predstavimo histogramskim dijagramom još je očiglednija ta razlika (Slika 30).

Nivo bilirubina kod pacijenata sa β -talasemijom minor udruženom sa 7/7 TA genotipom je za 2,2 puta viši nego kod pacijenata sa HHC koji imaju 7/7 TA genotip.



Slika 30. Uporedni prikaz nivoa bilirubina u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gena kod dve grupe pacijenata, pacijenti sa β -talasemijom minor i pacijenti sa HHC

4.8. Populacione studije učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena

Na osnovu pregleda iz literature uočena je široka varijabilnost u distribuciji promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kroz populacije. Kako do sada nisu vršena istraživanja o učestalosti ovih varijanti u populaciji Republike Srbije i Republike Srpske kao jedan od zadataka ove studije bio je da se utvrde ove učestalosti i proceni farmakogenetički značaj *UGT1A1**28 varijante za ove dve populacije.

4.8.1. Učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u populaciji Republike Srbije

Za populacionu studiju učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena ispitano je 100 zdravih ispitanika iz opšte populacije Republike Srbije, i to 63 ispitanika muškog pola (63%) i 37 ispitanika ženskog pola (37%). Srednja dob ispitanika je bila 12,75 godina, u rasponu od 1,25 do 83 godine.

U kontrolnoj grupi zdravih ispitanika detektovana su tri različita genotipa za promotor *UGT1A1*. Prva grupa su homozigoti za promotor koji u sebi sadrži 6 TA ponovaka - 6/6 TA), drugu grupu čine heterozigotni nosioci, kod kojih jedan alel ima promotor sa 6 TA ponovaka, a drugi alel ima promotor sa 7 TA ponovaka – 6/7 TA. U trećoj grupi su ispitanici koji su homozigotni nosioci promotorske varijante sa 7 TA ponovaka – 7/7 TA.

Distribucija *UGT1A1*(TA)_n promotorskih genotipova u zdravoj kontrolnoj grupi populacije Republike Srbije prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19. Učestalost promotorskih *UGT1A1*(TA)_n genotipova u grupi zdravih ispitanika iz opšte populacije Republike Srbije

<i>UGT1A1</i> (TA) _n	N (n=100)	%
6/6	37	37
6/7	47	47
7/7	16	16
7/8	0	0

Učestalost 6/6 TA se javlja kod 37% ispitanika opšte populacije. Heterozigotni nosioci promotorskih varijanti 6/7 TA su zastupljeni u 47%, dok se homozigotni nosioci za alel sa 7 TA ponovaka u promotorskom regionu – 7/7 TA javljaju sa učestalošću od 16%. U opštoj populaciji nije detektovan ni jedan slučaj heterozigotnog nosioca 7/8 TA *UGT1A1* genotipa.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se *UGT1A1**28 alel u opštoj populaciji Republike Srbije javlja sa učestalošću od 0,40.

UGT1A1 (*TA*)_n promotorski genotipovi detektovani u kontrolnoj grupi bili su u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži (χ^2 test, $p=0,87$; exact test, $p=1$).

4.8.2. Biobanka populacije Republike Srpske

Za potrebe ove studije, u zdravstvenim ustanovama administrativnih centara svake regije Republike Srpske, prikupljen je 121 uzorak venske krvi zdravih ispitanika iz populacije Republike Srpske. U ovoj grupi ispitanika bilo je 90 ženskih (74,38%) i 31 muški ispitanik (25,62%). Srednja dob ispitanika bila je 51,07 godina, u rasponu od 6 do 81 godine. Svi ispitanici su potpisali Informisani pristanak i dali svoju saglasnost za učešće u genetičkim testiranjima za potrebe ovog ispitivanja. U okviru informisanog pristanka učesnici su imali mogućnost da se izjasne i daju saglasnost da se njihov biološki i genetički materijal sačuva u biobanci populacije Republike Srpske.

Na osnovu datih saglasnosti, od 121 ispitanika, sačuvan je genetički materijal od njih 105. Biološki i genetički materijal ispitanika koji nisu dali saglasnost za čuvanje uzoraka je uništen o čemu je napravljen i zapisnik, u skladu sa Članom 22. Zakona o prevenciji i dijagnostici genetičkih bolesti, genetički uslovljenih anomalija i retkih bolesti (Službeni glasnik RS, br.8/2015).

Biobanku populacije Republike Srpske čini 105 uzoraka krvi i DNK izolata donora iz opšte zdrave populacije, koji nisu u srodničkim vezama. Svi donori su Evropskog porekla. Biobanka Republike Srpske se čuva na Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Uzorci koji su pohranjeni u biobanku biće dostupni za populacione studije za Republiku Srpsku. U skladu sa Članom 8. Zakona o prevenciji i dijagnostici genetičkih bolesti, genetički uslovljenih anomalija i retkih bolesti, uzorci se čuvaju anonimno. Obeleženi su brojevima za koje je vezana informacija o polu, dobi i regiji stanovanja ispitanika.

4.8.3. Učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u populaciji Republike Srpske

U ovoj studiji prvi put je sprovedeno neko genetičko testiranje za celu populaciju Republike Srpske. Na osnovu podataka sa poslednjeg popisa stanovništva iz 2013. iz svake regije je nasumično uzet broj uzoraka proporcionalan broju stanovnika te regije, te smo bili u mogućnosti da pratimo učestalost promotorskih *UGT1A1(TA)_n* genotipova po regijama (Tabela 20).

Tabela 20. Učestalost promotorskih *UGT1A1(TA)_n* genotipova u grupi zdravih ispitanika iz opšte populacije Republike Srpske po regijama

	TA6/6 n (%)	TA6/7 n (%)	TA7/7 n (%)	<i>UGT1A1</i>*28	Σ
Krajina	18 (34,61)	18 (34,61)	16 (30,77)	0,36	52
Posavina	14 (63,63)	4 (18,18)	4 (18,18)	0,27	22
Semberija	3 (23,07)	8 (61,53)	2 (15,38)	0,46	13
Podrinje I (Zvornik)	3 (25)	6 (50)	3 (25)	0,50	12
Podrinje II (Foča)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	0,62	4
Sarajevsko- Romanijski	1 (11,11)	5 (55,55)	3 (33,33)	0,61	9
Istočna Hercegovina	5 (55,55)	3 (33,33)	1 (11,11)	0,28	9
Ukupno n (%)	45 (37,19)	45 (37,19)	31 (25,60)	0,44	121

Uočena je široka varijabilnost u distribuciji promotorskih genotipova *UGT1A1*. U Krajini, Sarajevsko Romanijskoj regiji i u Podrinju (Podrinje I i Podrinje II, zbirno) prisutne su izuzetno visoke učestalosti 7/7 TA genotipa od 30,77%, 33,33% i 31,25% respektivno. Najniža učestalost 7/7 TA genotipa je u I. Hercegovini, Semberiji i Posavini (11,11%, 15,38% i 18,18% respektivno). Genotip 6/6 TA zastupljen je sa najvišom učestalošću u I. Hercegovini sa 63,63% i Posavini sa 55,55%.

Učestalosti distribucije *UGT1A1**28 alela predstavljene su po regijama Republike Srpske. U Sarajevsko Romanijskoj regiji i Podrinju II – Foča *UGT1A1**28 alel se javlja sa ekstremno visokom učestalošću od oko 0,60, zatim slede Podrinje I – Zvornik i Semberija sa visokim učestalostima od 0,50 i 0,46. Najniža učestalost je u Posavini i I. Hercegovini od 0,27 i 0,28.

Krajina predstavlja regiju sa najbrojnijom i najheterogenijom populacijom u Republici Srpskoj i u toj regiji je prisutna relativno ravnomerna distribucija genotipova, dok je učestalost *UGT1A1**28 alela od 0,36.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se *UGT1A1**28 alel u opštoj populaciji Republike Srpske javlja sa učestalošću od 0,44.

4.9. *UGT1A128 kao farmakogenetički marker za populaciju Republike Srbije i Republike Srpske**

S obzirom na rezultat da se *UGT1A1**28 alel u opštoj populaciji Republike Srbije javlja sa učestalošću od 0,40, a u opštoj populaciji Republike Srpske sa učestalošću od 0,44 dolazimo do procene značajnosti *UGT1A1**28 kao farmakogenetičkog markera u ispitivanim populacijama. S obzirom na izuzetno visoku učestalost ovog alela u obe populacije i na klinički značaj *UGT1A1**28 markera, preporuka ove studije je da se farmakogenetičko testiranje na *UGT1A1**28 varijantu uvede u kliničku praksu naročito prilikom određivanja terapije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom kod kojih se planira terapija irinotekanom.

5. DISKUSIJA

Uridin difosfatglukuronozil transferaza 1A1 je enzim koji ekskluzivno vrši glukuronidaciju bilirubina i obzirom da ne postoji alternativni metabolički put za uklanjanje bilirubina iz organizma ima izuzetan značaj za čoveka. Bilirubin u visokim koncentracijama u serumu, ispoljava izrazito neurotoksično dejstvo. Aktivnost ovog enzima može biti smanjena zbog smanjene ekspresije genakao kod Žilberovog sindroma (ŽS) ili zbog aminokiselinskih zamena nastalih kao posledica nukleotidnih izmena u kodirajućim regionima genakod Krigler-Najarovog sindroma tipa 2. Mutacije koje vode ka stvaranju nefunkcionalnog enzima ili do prekida sinteze UGT1A1 proteina nisu kompatibilne sa životom i tada je prisutan Krigler-Najarov sindrom tip 1. Najčešći uzrok smanjene ekspresija *UGT1A1* gena je povećanje broja TA ponovaka u promotorskom TATA regionu, od normalnih 6TA ponovaka do 7 ili 8 TA ponovaka, što dovodi do pojave ŽS.

5.1. Analiza primenjenih metoda u dijagnostici Žilberovog sindroma i *UGT1A1* promotorskog genotipa

U ovoj studiji broj TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1* gena, određen metodom PCR amplifikacije i poliakrilamidne gel elektroforeze bojene srebro-nitratom, kod pedijatrijskih pacijenata sa ŽS i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika, proveren je i potvrđen metodom fragment analize. Deset posto rezultata je potom provereno i potvrđeno metodom sekvenciranja DNK po Sangeru. Sve upotrebljene metode su dale isti rezultat i pokazale se kao pouzdane i tačne. PCR/akrilamidna gel elektroforeza zahteva više vremena ali je finansijski najisplativija. Fragment analiza je brza i precizna, ali prilično skupa. Sekvenciranje je najpouzdanije, ali zahteva dosta vremena i najskuplje je. Uzorci za koje je sekvenciranjem pokazano da su nosioci *UGT1A1* 6/6 TA i 7/7 TA genotipova su korišćeni kao kontrolni u poliakrilamidnoj gel elektroforezi, čime je metoda PCR/akrilamidna gel elektroforeza zadovoljila dijagnostičke zahteve za preciznim, relativno brzim i finansijski prihvatljivim analizama u rutinskoj laboratorijskoj upotrebi.

5.2. Analiza *UGT1A1* promotorskih genotipova kod pacijenata sa Žilberovim sindromom

Učestalost ŽS u opštoj populaciji iznosi od 4% do 16%, u različitim populacijama. Najčešće se otkriva u pubertetu kada dolazi do hormonskih promena koje utiču na metabolizam bilirubina (Thoguluva Chandrasekar et John, 2019). Kod muškaraca se ŽS javlja 2-7 puta češće nego kod žena, najverovatnije kao posledica veće produkcije bilirubina kod muškaraca, kao i inhibitorynog dejstva testosterona na UGT1A1 enzim. U našoj grupi pedijatrijskih pacijenata

sa ŽS kod kojih na osnovu kliničkih i biohemijskih parametara uspostavljena dijagnoza ŽS, dečaka je bilo 1,7 puta više nego devojčica što je u odnosu na podatke dostupne u literaturi nešto niža učestalost od očekivane. S obzirom na srednju dob od 16 godina, možemo zaključiti da se promena hormonskog statusa u doba puberteta i u našoj studiji može smatrati glavnim faktorom za fenotipskim ispoljavanjem genetičke predispozicije.

Rizičnim genotipom za razvoj ŽS smatra se genotip koji u homozigotnom stanju ima 7TA ponovaka u promotorskom regionu, odnosno varijanta *UGT1A1**28 se smatra najznačajnijom za razvoj ŽS. Takođe, *UGT1A1* heterozigotni genotip 7/8 TA koji se u kavkaskoj grupi naroda javlja veoma retko značajno doprinosi nastanku ŽS. U ovoj studiji pokazano je da je, kao što je bilo i očekivano, učestalostrizičnog *UGT1A1* 7/7 TA promotorskog genotipa (*UGT1A1**28/*28 genotip) u grupi pedijatrijskih pacijenata sa ŽS je bila najviša i iznosila je 76,47%. Osim toga, kod 2 pacijenta (3,92%) otkriveno je prisustvo rizičnog *UGT1A1* 7/8 TA genotipa, tako da je ukupna učestalost rizičnih genotipova kod pacijenata sa ŽS bila je 80,39%.

U Rumunskoj kohort studiji osoba sa ŽS utvrđeno je da je učestalost *UGT1A1* 7/7 TA genotipa u ispitivanoj grupi bila 32,33%, zatim 6/7 TA genotip sa najvišom učestalošću od 57,64% i 6/6TA genotip sa 7,36% (Radoi et al., 2017). S druge strane, značajno viša učestalost *UGT1A1* 7/7 TA genotipa kod pacijenata sa ŽS u prisutna je u populaciji Valensije i iznosi 84,21% (Torres et al., 2017).

U grupi pacijenata sa ŽS, homozigotni genotip za nemutirani alel sa *UGT1A1* 6TA ponovaka (*UGT1A1**1/*1 genotip) bio je prisutan samo kod 2 pacijenta (3,92%), a heterozigotni 6/7 TA genotip, koji se takođe ne smatra rizičnim, u ovoj grupi pacijenata bio je 15,87%. Dakle, možemo reći da je kod približno 20% pacijenata, kod kojih je klinički bila uspostavljena dijagnoza ŽS, detektovan nerizični promotorski genotip *UGT1A1* gena (6/6 TA i 6/7 TA genotip). Iz ovih saznanja proizilazi da je vrednost *UGT1A1**28/*28 genotipa kao dijagnostičkog markera za ŽS u ovoj studiji bila 80%, tako da genotipizacija *UGT1A1**28 alela nije dovoljno pouzdan genetički test za dijagnozu ŽS i ne može zameniti standardne testove koji se u kliničkoj praksi koriste, hipokalorijski i fenobarbitonski test.

Pokušali smo da utvrdimo genetičku osnovu ŽS kod 10 pacijenata sa kliničkom dijagnozom ŽS koji nisu bili nosioci *UGT1A1* 7/7 TA genotipa tako što smo analizu proširili na kodirajuće regione *UGT1A1* gena i tako učinili testiranje *UGT1A1* gena pouzdanijim. Sekvencirani su kodirajući regioni *UGT1A1* gena sa intron-egzon graničnim regionima kao i prvi varijabilni

egzon. Kod jednog pacijenta su otkrivene dve nukleotidne zamene u intronskim regionima u heterozigotnom stanju, i obe ove promene nisu dosada prijavljene u javno dostupnim bazama podataka niti je poznato da li imaju značaja u etiologiji ŽS. *In silico* analiza ove dve intronske *UGT1A1* varijante (c.997-82T>C i c.1084+12G>A) je pokazala da se nukleotidna promena i u jednom i u drugom slučaju ukida mesta vezivanja određenih transkripcionih regulatora i uvodi mesta vezivanja za druge. Konkretno, za nemutiranu varijantu u intronu 2, c.997-82T>C, vezuju se AT-vezujući TF1 i alternativno iskrajana varijanta FOXP1 transkripcionog faktora (eng. forkhead box protein P1), aktivirana u embrionalnim matičnim ćelijama. Za mutiranu varijantu se mesta vezivanja za ova dva transkripciona faktora se ukidaju i uvodi se mesto vezivanja transkripcionog faktora AMV v-Myb. Za varijantu u trećem intronu c.1084+12G>A vezuju se: LSTM element, SP1 i KLF7 transkripcioni faktori i transkripcioni faktor iz familije cinkanih prstića tipa BED sa 4 GC-bogata regiona. Za mutiranu varijantu ukidaju se mesta prepoznavanja sva pomenuta 4 transkripciona faktora, a uvodi se mesto prepoznavanja za autoimuni regulator AIRE.

Funkcionalnim esejima moglo bi se proveriti da li su ovako predviđena mesta vezivanja zapravo vezuju ove transkripcione regulatore i da li doprinose bolesti kod ovog pacijenta. Funkcionalne analize kao što je CAT-assay i esej usporene elektroforetske pokretljivosti bi trebalo da pokažu da li ove varijante mogu doprineti biohemijском fenotipu ovog pacijenta tj. hiperbilirubinemiji.

Iako postoji visoka korelacija genetičkih i kliničkih testova, sama genotipizacija promotorskih varijanti *UGT1A1* gena nije dovoljno precizna za dijagnozu ŽS.

S obzirom da smo u grupi zdravih ispitanika detektovali 16% nosilaca rizičnog genotipa *UGT1A1* 7/7 TA, koji fenotipski nisu davali sliku ŽS i nisu imali medicinsku istoriju ŽS, možemo zaključiti da penetrabilnost ovog genotipa nije potpuna. Rezultati pokazuju da nosioci rizičnih genotipova za ŽS imaju 21 puta veću šansu za pojavu ŽS od nosilaca nerizičnih genotipova, ali neće svi nosioci rizičnih genotipova ispoljiti fenotip ŽS.

5.3. Analiza korelacije nivoa serumskog bilirubina sa promotorskim varijantama *UGT1A1* gena kod pacijenata sa ŽS

Naši rezultati su pokazali da je kod pacijenata sa rizičnim genotipom za ŽS (*UGT1A1* 7/7 TA i *UGT1A1* 7/8 TA) pri dijagnozi nivo nekonjugovanog bilirubina u serumu bio statistički značajno veći od nivoa bilirubina kod pacijenata sa nerizičnim genotipom (*UGT1A1* 6/6 TA i *UGT1A1* 6/7 TA). Nakon hipokalorijske dijeta kod pacijenata sa rizičnim genotipom za ŽS nivo nekonjugovanog bilirubina je porastao 2,91 puta, a kod pacijenata sa nerizičnim genotipom za 2,52 puta. Ovo povećanje nije u korelaciji sa promotorskim *UGT1A1* genotipom. Trodnevni hipokalorijski test se i dalje smatra veoma važnom dijagnostičkom procedurom za određivanje ŽS. Odstupanje vrednosti bilirubina preko 100% od referentnih vrednosti nakon testa gladovanja jeste značajno kao dijagnostička potvrda ŽS. Manje odstupanje je prisutno i kod pacijenata sa nerizičnim *UGT1A1* promotorskim genotipom. Nedavna studija nije potvrdila asocijaciju genetičkih *UGT1A1* testiranja i trodnevnog testa gladovanja (Torres et al, 2017).

Trodnevni fenobarbitonski test je doveo do smanjenja nivoa nekonjugovanog bilirubina za 27,4% u grupi sa rizičnim genotipom za ŽS, dok je u nerizičnoj grupi to smanjenje iznosilo 6,4%. Smanjenje nekonjugovanog bilirubina nakon fenobarbitonskog testa u odnosu na nivo bilirubina pre testa bilo je u korelaciji sa promotorskim *UGT1A1(TA)_n* genotipom. Nivo bilirubina opada brže i više u grupi sa rizičnim genotipom nego u grupi sa nerizičnim genotipom. Iako činjenica da rizični genotip doprinosi hiperbilirubinemiji više nego nerizični, tretman fenobarbitonom ujednačava ove razlike dovodeći do normalnih vrednosti nekonjugovanog bilirubina.

5.4. Analiza korelacije nivoa bilirubina u odnosu na dijagnoze β-talasemije minor i hroničnog hepatitisa C

Nivo bilirubina u serumu je važan dijagnostički parametar za brojna stanja i bolesti. Neconjugovana hiperbilirubinemija i žutica javljaju se kada razgradnja hemoglobina u bilirubin premaši sposobnost jetre da stvara bilirubin glukuronid i izlučivanje bilirubina putem žuči. Ubrzani katabolizam bilirubina povišava sterkobilinogen u stolici, urobilinogen u mokraćnoj bešici, a ponekad uzrokuje i pojavu žučnih kamenaca. Povišeni nivoi bilirubina ukazuju na sumnju da u organizmu postoji pojačana hemoliza koja može biti izazvana poremećajima unutar eritrocita (hereditarna eliptocitoza i sferocitoza, urođena eritropoetska

porfirija, manjak G6PD, poremećaji sinteze hemoglobina (talasemije), Hb-C, HbS-C i HBE bolest) ili izvan eritrocita (hipersplenizam, autoimune i traumatične hemolitične anemije, kao i infekcije pri kojima toksini bakterija razaraju eritrocite (Clostridium, β -hemolitički streptokok, meningokoki) ili se patogeni razvijaju unutar eritrocita (Plasmodium i Bartonella spp)) (www.msd-prirucnici.placebo.hr). Takođe, oštećenja jetre i njena smanjena aktivnost usled fibroze i ciroze izazvane toksičnim (alkohol, hemijski agensi i lekovi) ili infektivnim agensima (virusi hepatitisa B i hepatitisa C) mogu dovesti do smanjene sposobnosti jetre da vrše glukuronidaciju bilirubina. Stoga je određivanje ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina, kao i pravilno tumačenje nalaza u skladu sa drugim medicinskim znacima i parametrima od izuzetnog značaja za diferencijalnu dijagnozu, kao i za pravilan tok lečenja.

U ovoj studiji pratili smo nivo bilirubina u serumu kod pacijenata sa β -talasemijom minor i sa teškom fibrozom jetre uzrokovanom hroničnim hepatitisom C. Izmerena vrednost ukupnog bilirubina kod pacijenata sa talasemijom je bila visoka i za 3,86 puta je bila veća nego vrednosti kod kontrolne grupe. Kod pacijenata sa HHC vrednost ukupnog bilirubina je bila veća za 1,7 puta od vrednosti iz kontrolne grupe. Na osnovu standardnih devijacija kod obe grupe, uočavamo da su izmerene vrednosti bilirubina imale daleko veće varijacije u grupi pacijenata sa talasemijom u odnosu na grupu pacijenata sa HHC. Kod pacijenata sa β -talasemijom minor, anatomija i funkcija jetre je bila očuvana, bez medicinskih izveštaja o oštećenju. Razlike u izmerenim vrednostima bilirubina u ove dve grupe pacijenata ukazuju na to da hemolitički procesi dovode do značajnijeg povećavanja vrednosti bilirubina, nego smanjenje funkcija jetre. Kod izrazito povećanog stvaranja bilirubina, jetra iakonormalnih fizioloških funkcija, ne može dovoljno brzo da metaboliše sav nastali bilirubin. S druge strane, iako se kod pacijenata sa HHC, usled fibroze javlja smanjena funkcija jetre, ovaj organ ipak zadržava sposobnost konjugacije bilirubina, te ukoliko je razgradnja hemoglobina u fiziološkim granicama nivo bilirubina u serumu će pokazivati umereniji porast vrednosti nego kod hemolitičkih procesa.

5.5. Analiza učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor

Učestalost promotorskih genotipova *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA, u grupi pacijenata sa β -talasemijom minor je bila 36%, 41% i 23% respektivno, što je slično učestalostima istih genotipova u opštoj populaciji Republike Srbije od 37%, 47% i 16%, respektivno. S obzirom da *UGT1A1* gen nema udela u nastanku talasemijskih sindroma sasvim je očekivano da su učestalosti *UGT1A1* promotorskih genotipova u ovoj grupi pacijenata jednake učestalostima iz opšte populacije. Najverovatnije je da bi sa povećanjem broja ispitanika sa talasemijom došlo još približnije do izjednačavanja ovih vrednosti.

5.5.1. Analiza korelacije nivoa ukupnog bilirubina u odnosu na promotorske varijante *UGT1A1* kod pacijenata sa sindromom β -talasemija minor

Kod pacijenata sa talasemijskim sindromima intenzivna hemoliza doprinosi povećanju nivoa bilirubina. Nivo bilirubina u serumu zavisi u velikoj meri i od aktivnosti UGT1A1 enzima. U ovoj studiji posmatrali smo nivo bilirubina kod pacijenata sa β -talasemijom minor. Rezultati su pokazali da su najniže vrednosti bilirubina prisutne kod pacijenata sa β -talasemijom minorhomozigotnih nosilaca nemutiranog promotorskog *UGT1A1* alela sa 6TA ponovaka koji imaju najvišu aktivnost UGT1A1 enzima. Vrednosti bilirubina kod heterozigotnih nosilaca su se značajno povisile za 2,2 puta u odnosu na homozigotne wt, dok su kod homozigotnih nosilaca mutiranog alela sa 7TA ponovaka u promotorskom regionu *UGT1A1* gena bile izrazito, čak za 4,3 puta veće nego kod pacijenata sa *UGT1A1* 6/6 TA genotipom.

Iako kod svih pacijenata sa sindromom β -talasemija minor dolazi do intenzivne hemolize, rezultati ove studije su pokazali da nisu svi imali istu sposobnost i efikasnost izlučivanja viška bilirubina. Klirens bilirubina je bio u direktnoj zavisnosti od promotorskog genotipa *UGT1A1* gena. Kod pacijenata sa sindromom β -talasemije minor udruženim sa ŽS, kao što je bilo i očekivano, prisutne su najviše vrednosti bilirubina prvenstveno zbog smanjenog klirensa bilirubina, a ne zbog intenzivne hemolize. Takođe je uočeno da se pacijenti sa β -talasemijom minor, ne mogu posmatrati kao homogena grupa prilikom analize nivoa bilirubina u serumu kao dijagnostičkog parametra, nego se mora uzeti u razmatranje i genetička sposobnost svakog pojedinca da metaboliše bilirubin.

S obzirom na sve do sada razmatrane činjenice, možemo reći da su rezultati ove studije pokazali da se *UGT1A1* gen može tretirati kao gen modifikator kod beta-talasemijskih sindroma. Gen modifikator se može definisati kao gen koji ima uticaj na fenotipsku ekspresiju

drugog gena, pri čemu taj uticaj može biti toliko značajan da nekada izmeni klinički tok bolesti pacijenta (Klassen, 2015). Kod pacijenata sa β -talasemijom minor koji imaju i *UGT1A1* 7/7 TA genotip, klinička slika hiperbilirubinemije mogla bi se ublažiti stimulacijom ekspresije *UGT1A1* gena ili upotrebom fenobarbitona ili korigovanom ishranom uz povećan unos kupusnjača i citrusnog voća.

Jedan pedijatrijski pacijent, kod kojeg je na osnovu biohemijskih parametara i kliničkih testova (hipokalorijski i fenobarbitonski test) postavljena dijagnoza ŽS, a koja nije potvrđena genetičkim testom odnosno analizom promotorskog regiona *UGT1A1* gena kao ni sekvenciranjem kodirajućih regiona ovog gena, imao je u stvari sindrom β -talasemije minor. Ovaj slučaj je ukazao na to da sindrom β -talasemije minor, kada nije udružen sa rizičnim *UGT1A1* genotipom, klinički može da ostavi sliku ŽS i da ostane neprepoznat. Genetičko testiranje promotorskih varijanti *UGT1A1* gena moglo poslužiti za diferenciranje dijagnoze i davanja smernica za dalje dijagnostičke procedure. Takođe je i u nekim prethodnim studijama pokazano da se pri kliničkoj ekspresiji hiperbilirubinemije kod pacijenata sa talasemijskim sindromima moraju uzeti u razmatranje i genetičke varijante *UGT1A1* gena (Dabke et al, 2014, Tzetis et al, 2001) s obzirom da se pokazalo da ovaj gen ima ulogu modifikatora na kliničku heterogenost monogenских oboljenja (Dabke et al, 2014).

5.6. Analiza učestalost promotorskih varijanti *UGT1A1* gena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C

Samo nekoliko radova do sada se bavilo ispitivanjem korelacije promotorskog genotipa *UGT1A1* gena sa stepenom fibroze jetre kod pacijenata sa HHC. Urbanek i sar. su 2011. objavili učestalosti *UGT1A1* 7/7 TA genotipa kod pacijenata sa HHC od 15,7%, dok je De Souza, 2017. u jednoj većoj studiji dobio rezultate za učestalost ovog genotipa kod HHC pacijenata od 10,4% (Urbanek et al, 2011, de Souza et al, 2017). U našoj grupi pacijenata je utvrđeno da je učestalost *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA genotipova bila 37,5%, 37,5% i 25%, respektivno. Učestalost od 25% za 7/7 TA genotipa u ovoj grupi pacijenata je izuzetno visoka u odnosu na dosada objavljene rezultate u sličnim studijama. Ipak, mora se imati u vidu i to, da je u opštoj populaciji zdravih ispitanika u našoj studiji učestalost *UGT1A1* 7/7 TA genotipa takođe visoka i iznosi 16%.

Nivo bilirubina kod pacijenata sa HHC udruženo sa *UGT1A1* 7/7 TA genotipom, bio je 3 puta veći nego kod pacijenata sa nemutiranim ili heterozigotnim (*UGT1A1* 6/7 TA) genotipom. Međutim, kako je nivo bilirubina kod pacijenata sa HHC samo 1,7 puta veći od onog u

kontrolnoj grupi zdravih ispitanika, možemo konstatovati da su visoke vrednosti bilirubina u serumu kod teške fibroze jetre izazvane hroničnom infekcijom virusom hepatitisa C, u asocijaciji sa genetički uslovljenom smanjenom ekspresijom *UGT1A1* gena odnosno prisustva *UGT1A1* 7/7 TA genotipa. Ovaj nalaz je značajan jer omogućava da HHC pacijenti sa ŽS nosioci *UGT1A1* 7/7 TA genotipom mogu biti lečeni po standardnom protokolu i tako im se omogući da postignu kontinuirani virusološki odgovor, obzirom da kod njih visok nivo bilirubina nije poreklom od fibroze jetre i komplikacije HHC.

S druge strane, ne može se potvrditi značajna asocijacija između prisustva *UGT1A1* 7/7 TA genotipa i pojave fibroze jetre kod pacijenata sa HHC (Jordovic et al., 2017; Urbanek et al., 2011). Fibroza jetre kod pacijenata sa HHC zavisi od više faktora kao što su genetički faktori, oksidativni stres, apoptoza i poremećaji imunog sistema, dok se *UGT1A1* 7/7 TA genotip ni u jednoj studiji do sada nije pokazao kao faktor značajan za razvoj fibroze jetre.

5.7. Analiza uporednog prikaza vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gena kod pacijenata sa β -talasemijom minor i HHC

Kod pacijenata sa β -talasemijom minor dolazi do intenzivne hemolize i posledično tome razgradnje hemoglobina što se očitava porastom nivoa bilirubina u serumu, dok se kod pacijenata sa HHC kod kojih je došlo do teške fibroze jetre kao posledice dugotrajne virusne infekcije, smanjuje funkcionalnost jetrenog tkiva, što se takođe pokazuje porastom serumskog bilirubina. Upoređivanjem ovih vrednosti kod ove dve grupe pacijenata u odnosu na promotorski genotip *UGT1A1* gena, uočavamo da je nivo bilirubina u sve tri grupe promotorskih genotipa viši kod pacijenata sa talasemijom nego sa HHC. Ako uporedimo vrednosti bilirubina kod pacijenata sa talasemijom koji su nosioci *UGT1A1* 6/6 TA genotipa sa vrednostima bilirubina kod pacijenata sa HHC sa istim genotipom uočavamo da je nivo bilirubina za 1,4 puta viši kod pacijenata sa talasemijom. Kod pacijenata sa talasemijom i *UGT1A1* 6/7 TA genotipom nivo bilirubina je viši za 3,4 puta nego kod pacijenata sa *UGT1A1* 6/7 genotipom i HHC, dok nosioci *UGT1A1* 7/7 TA genotipa i β -talasemije minor imaju za 2,2 puta veće vrednosti bilirubina nego HHC pacijenti sa fibrozom jetre nosioci *UGT1A1* 7/7 TA genotipa. Pokazalo se da smanjena aktivnost *UGT1A1* enzima koja je posledica varijanti u promotorskom *UGT1A1* TA genotipu ima daleko značajniji uticaj na nivo bilirubina kod pacijenata sa hemolizom zbog β -talasemije minor nego kod pacijenata sa smanjenom funkcijom jetre koja se javlja kao posledica fibroze jetre kod pacijenata sa HHC.

5.8. Analiza rezultata populacionih studija učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena

Populaciono farmakogenetičke studije pokazale su da je od izuzetne važnosti proučavanje genetičkih markera u različitim populacijama. Do sada je prikupljen veliki broj podataka o učestalostima klinički važnih genomičkih varijanti u populacijama širom sveta, uključujući tu i farmakogenomičke markere. Ovi podaci se mogu upotrebiti kako za kreiranje medicinskih vodiča, tako i za brže uvođenje preventivnih farmakogenomičkih testova u kliničku praksu i farmakogenomike u zdravstvene sisteme (Viennas et al., 2017). Jedan od važnih farmakogenetičkih markera je promotorska varijanta *UGT1A1* gena sa 7 TA ponovaka – *UGT1A1**28 koja je odgovorna za smanjenu aktivnost UGT1A1 enzima. Uočena je izražena varijabilnost učestalosti ovog alela kroz različite rase, etničke grupe i populacije.

Najviša učestalost *UGT1A1**28 alela je prijavljena na afričkom kontinentu i iznosi oko 43% , zatim kod evropskih naroda od 29% do 39%, a najniža učestalost je kod azijskih naroda i iznosi svega 16% (Beutler et al.,1998; Premawardhena et al. 2003).

5.8.1 . Analiza učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u populaciji Srbije

U našoj studiji pokazano je da su učestalosti za *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA genotipove iznosile 37%, 47% i 16% respektivno, dok je učestalost *UGT1A1**28 alela bila 40%. Ovi rezultati pokazuju da su učestalosti *UGT1A1* 6/7 TA i 7/7 TA genotipova među najvišim prijavljenim vrednostima u Evropskim populacijama, pa je i učestalost od 40% za *UGT1A1**28 među najvišima.

Učestalosti *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA genotipova u populaciji Makedonije su 50%, 37,5% i 12,5% respektivno (Bajro et al., 2012, Kapedanovksa et al. 2015); kod zdrave predškolske dece u Hrvatskoj ove učestalosti su 38%, 47,9% i 13,7% (Marinković et al., 2007). Vrlo slično podacima za Hrvatsku populaciju, je i kod njihovih suseda Slovenaca, i te vrednosti iznose 38,1% za *UGT1A1* 6/6 TA, 47,9% za 6/7 TA i 13,6% za 7/7 TA (Mlakar et al.,2011; Ostanek et al., 2007).

Ako pratimo rezultate i za druge evropske narode uočavaju se značajne oscilacije. Najniže učestalosti *UGT1A1* 7/7 TA genotipa su u Velikoj Britaniji – 5%, zatim u Grčkoj - 8,5% i u Turskoj – 9,3%. Najviše učestalosti *UGT1A1* 7/7 TA genotipa su u Francuskoj – 17% , u Poljskoj 16,7% i u Italiji 16%. Najveći postotak *UGT1A1* 6/6 TA genotipa je u Turskoj, čak 56,3%; zatim V.Britaniji – 50,8% i u Grčkoj – 48,9%. Najsličniji rezultati našim dobijeni su u

Poljskoj i to u dve nezavisne studije (Moczulski et al., 2007; Rawa et al., 2012). Naime, učestalosti za *UGT1A1* 6/6 TA bile od 33,3% do 36%, za *UGT1A1* 6/7 TA 45% do 50% i za *UGT1A1* 7/7 TA 16,7% do 18,7%, dok je učestalost alela *UGT1A1**28 u populaciji Poljske prisutna sa čak 42%.

5.8.2 . Analiza učestalosti promotorskih varijanti *UGT1A1* gena u populaciji Republike Srpske

U populaciji Republike Srpske rezultati ispitivanja učestalosti promotorskih *UGT1A1* varijanti su vrlo specifični u odnosu na dosada razmatrane vrednosti iz drugih populacija. Učestalosti *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA i 7/7 TA genotipova su 37,2%, 37,2% i 25,6%. Ako uporedimo ove rezultate sa rezultatima dobijenim u Republici Srbiji, uočićemo da je učestalost od 37% za *UGT1A1* 6/6 TA genotip ista u obe populacije. U Republici Srpskoj je značajno manja učestalost heterozigotnih nosilaca *UGT1A1* 6/7 TA i iznosi 37,2% u odnosu na učestalost od 47% u Srbiji. Posledično tome učestalost homozigotnog *UGT1A1* 7/7 TA genotipa iznosi izuzetno visokih 25% u odnosu na 16% u Srbiji. Takođe, učestalost varijantnog *UGT1A1**28 alela u Republici Srpskoj od 44%, je najveća vrednost od prijavljenih vrednosti u Evropskim populacijama.

Razmatranjem učestalosti po regionima Republike Srpske, možda možemo donekle da rasvetlimo ovako dobijene rezultate. Naime, uočeno je da je učestalost *UGT1A1* promotorskih genotipova po regijama izrazito različita, tako da je *UGT1A1* 7/7 TA genotip najzastupljeniji u Podrinju II –Foča sa 50%, zatim Sarajevsko-Romanijskoj regiji sa 33,3% , Krajini sa 30,7%, Podrinju I – Zvornik sa 25%, Posavini sa 18%, Semberiji sa 15% i najmanja zastupljenost je u Istočnoj Hercegovini sa 11%. Najviša zastupljenost nemutiranog *UGT1A1* 6/6 TA genotipa je u Posavini i iznosi 63,6% Istočnoj Hercegovini 55,5%, Krajini 34,6%, Podrinje I i II sa po 25%, Semberija sa 23 % i najmanja zastupljenost nemutiranog *UGT1A1* 6/6 TA genotipa je u Sarajevsko-Romanijskom regionu i iznosi 11,1%. Heterozigotni *UGT1A1* 6/7 TA genotipovi su najučestaliji u Semberiji sa 61,53%, Sarajevsko Romanijskoj regiji 55,55%, Podrinju I – Zvornik sa 50%, Krajini sa 34,61%, zatim I.Hercegovini 33,3% i Konačno Podrinje II 25% i Posavina sa 18%.

Učestalosti *UGT1A1**28 varijantnog alela po regijama se takođe značajno razlikuje, te je u Podrinju II-Foča i Sarajevsko-Romanijskom regionu ovaj alel prisutan sa izuzetno visokom učestalošću od preko 60%, u Podrinju I – Zvornik ova učestalost je 50%, u Semberiji 46%, Krajini 36%, a u Posavini i I.Hercegovini oko 27%.

Populacije iz Podrinja II, Sarajevsko- Romanijske i Istočno Hercegovačke regije su brojno male populacije, koje nastanjuju slabije razvijene i geografski izolovanije delove Republike Srpske, te je u ovim populacijama došlo i do značajnijih migracija u razvijenije delove, što je moglo dovesti do disbalansa u distribuciji ispitivanih promotorskih *UGT1A1* genotipova i poremećaja Hardi-Vajnbergove ravnoteže. Krajina sa Banja Lukom kao administrativnim centrom, nastanjena gotovo polovinom stanovništva Republike Srpske, ekonomski je najrazvijeniji deo Republike i prisutan je konstantni priliv stanovništva iz svih regija. Sve ove činjenice mogu objasniti rezultate da se u Krajini učestalost *UGT1A1* promotorskih genotipova javljaju sa gotovo jednakim vrednostima. Genotipovi *UGT1A1* 6/6 TA i 6/7 TA u ovoj regiji prisutni su sa jednakom zastupljenošću od 34,6% , dok je genotip *UGT1A1* 7/7 TA prisutan sa 30,8%.

Nije populacija Republike Srpske jedina u kojoj se javljaju kontroverzni podaci o učestalostima *UGT1A1* promotorskih genotipova. U Španiji sprovedena studija je pokazala značajne oscilacije u učestalostima alela u nekim lokalnim zajednicama koje su geografski bliske. Kod Katalonaca je *UGT1A1* 7/7 TA genotip prisutan sa učestalošću od 6,5%, dok je kod Baskijaca prisutan sa 14,8% (Premawardhena et al, 2003), a u Valensiji sa 11,33% (Torres et al, 2017).

5.9. *UGT1A128 kao farmakogenetički marker u Populaciji Republike Srbije i Republike Srpske**

Promotorska varijanta *UGT1A1**28 se pokazala kao važan farmakogenetički marker. *UGT1A1* enzim učestvuje u metabolizmu značajnih lekova. Odstupanje od normalne aktivnosti ovog enzima može da dovede do sporijeg metabolizma lekova ili njihovih intermedijera, a samim tim i do produženog dejstva leka i njegovog sporijeg izlučivanja iz organizma. Lekovi koji se koriste u terapiji karcinoma su posebno značajni iz razloga što su često njihovi neželjeni efekti izuzetno izraženi i teški. Prilikom odabira terapije i određivanja doze leka neophodno je u vidu imati i metabolički put leka, znanje o značajnim enzimima i genima koji učestvuju u metabolizmu potencijalnog leka, zatim genetičku varijabilnost svakog pojedinca, kao i informaciju o karakterističnim farmakogenetičkim markerima za datu populaciju. Do sada je otkriveno preko 130 varijanti gena *UGT1A1*. Kao populaciono specifični i populaciono značajni farmakogenetički markeri izdvojile su se dve varijante *UGT1A1**28 i *UGT1A1**6. Varijanta *UGT1A1**28 je promotorska varijanta koja se od nemutirane varijante razlikuje po

broju TA ponovaka u promotorskom TATA regionu. Promotorske varijante češće javljaju u evropskim i afričkim populacijama. *UGT1A1**6 je varijanta karakteristična za azijske populacije.

Da bi se bilo koji farmakogenetički marker smatrao značajnim u određenoj populaciji, neophodno je poznavati i učestalost tog markera u datoj populaciji. U našoj studiji smo pokazali da je varijanta *UGT1A1**28 prisutna u populaciji Republike Srbije i Republike Srpske sa izuzetno visokom učestalošću od 0,40 i 0,46 respektivno. Pokazalo se da su ove učestalosti među najvišima u Evropi i svetu. Ovo saznanje kandiduje varijantni alel *UGT1A1**28 kao farmakogenetički marker izuzetnog značaja u populacijama Republike Srbije i Republike Srpske, te se preporučuje da se u rutinskoj kliničkoj praksi uvede farmakogenetičko testiranje za ovaj marker kao obavezno pre uvođenja u terapiju svih lekova za koje je pokazano da imaju veze sa metabolizmom UGT1A1 enzima.

6. ZAKLJUČCI

1. Optimizovane su pouzdane i efikasne metode za molekularnu detekciju *UGT1A1* (TA)_n varijante: PCR/akrilamidna gel elektroforeza, fragment analiza i sekvenciranje po Sangeru. Metoda izbora za rutinsku laboratorijsku praksu je PCR/akrilamidna elektroforeza.
2. U našoj studiji pacijenata sa Žilberovim sindromom (ŽS), β-talasemijom minor, hroničnim hepatitisom C (HHC), i zdravih ispitanika iz Republike Srbije i Republike Srpske detektovana su 4 različita promotorska TA genotipa *UGT1A1* gena: *UGT1A1* 6/6 TA, 6/7 TA, 7/7 TA i 7/8 TA.
3. U grupi pacijenata sa ŽS ukupna učestalost rizičnih genotipova (*UGT1A1* 7/7 TA i 7/8 TA) bila je 80%: *UGT1A1* 7/7 TA genotip je zastupljen sa 76,47% i *UGT1A1* 7/8 TA genotip sa 3,92%.
4. Pacijenti sa rizičnim genotipom za ŽS (*UGT1A1* 7/7 TA i 7/8 TA) pri dijagnozi imaju značajno viši nivo nekonjugovanog bilirubina u serumu od pacijenata sa nerizičnim genotipom (*UGT1A1* 6/6 TA i 6/7 TA).
5. Nosioци rizičnih genotipova za ŽS (*UGT1A1* 7/7 TA i 7/8 TA) imaju 21 puta veću šansu za pojavu ŽS od nosilaca nerizičnih genotipova, ali neće svi nosioци rizičnih genotipova ispoljiti fenotip ŽS. Validnost *UGT1A1**28 varijante kao dijagnostičkog markera za ŽS u ovoj studiji bila je 80%.
6. Nivo bilirubina u serumu kod pacijenata sa β-talasemijom minor je oko 4 puta veći nego kod zdravih ispitanika. Najviše vrednosti bilirubina u serumu kod pacijenata sa β-talasemijom minor javljaju se kod nosilaca *UGT1A1* 7/7 TA genotipa. *UGT1A1* gen se može smatrati genom modifikatorom kod β -talasemijskih sindroma.
7. Nivo bilirubina u serumu kod pacijenata sa hroničnim hepatitisom C je oko 1,7 puta veći nego kod zdravih ispitanika. Povišen nivo bilirubina kod pacijenata obolelih od HHC je u korelaciji sa rizičnim *UGT1A1* 7/7 genotipom.
8. Zastupljenost *UGT1A1* 7/7 TA genotipa u populaciji Republike Srbije je 16%.
9. Zastupljenost *UGT1A1* 7/7 TA genotipa u populaciji Republike Srpske je 25%.
10. Zastupljenost *UGT1A1**28 varijantnog alela u populaciji Republike Srbije je 40%.
11. Zastupljenost *UGT1A1**28 varijantnog alela u populaciji Republike Srpske je 44%.

12. S obzirom na relativno visoku učestalost *UGT1A1**28 alela u populacijama Republike Srbije i Republike Srpske (40% i 44%), preporučuje se uvođenje prediktivnog farmakogenetičkog testiranja *UGT1A1**28 varijante u rutinsku kliničku praksu pre uvođenja terapije lekova u čijem metabolizmu učestvuje UGT1A1 enzim.

7.LITERATURA

-
- Alam N, Angeli MG, Greenblatt DJ. Mechanism of in vitro inhibition of UGT1A1 by paritaprevir. *J Pharm Pharmacol*, 2017;69:1794–801.
 - Arias IM, Wolfson S, Lucey JF, McKay RJ Jr. Transient Familial Neonatal hyperbilirubinemia. *J Clin Invest*, 1965; 44:1442–50
 - Arias IM, Gartner LM, Seifter S, Furman M. Prolonged Neonatal Unconjugated Hyperbilirubinemia Associated with Breast Feeding and a Steroid, Pregnane-3(Alpha), 20(Beta)-Diol, in Maternal Milk That Inhibits Glucuronide Formation in Vitro. *J Clin Invest*, 1964; 43:2037–47.
 - Babaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006; 98(4): 377-380.
 - Barbier O, Belanger A. Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferases in the human prostate. *Clin endocrinology&Metabolism*. 2008; Volume 22, Issue 2, Pages 259-270.
 - Belanger AS, Tojcic J, Harvey M, Guillemette C. Regulation of *UGT1A1* and *HNF1* transcription factor gene expression by DNA methylation in colon cancer cells. *BMC Mol Biol*. 2010; 11: 9.
 - Bellemare J, Rouleau M, Harvey M, Tetu B, Guillemette C. Alternative-splicing forms of the major phase II conjugating UGT1A gene negatively regulate glucuronidation in human carcinoma cell lines. *Pharmacogenomics J*. 2010; 10:431–441.
 - 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.
 - 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 disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol*. 2003; 38:107–17.
 - Bosma P, Scowdhury JR, Jansen PH. Genetic inheritance of Gilbert's syndrome. *Lancet* 1995; 346:314-5
 - Briz O, Serrano MA, MacIas RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J*. 2003; 371:897–905
 - Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Oct;14(10):960-6
 - Burchell, B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase. Implications in disease and drug glucuronidation. *Am.J.Pharmacogenomics*, 2003; 3:37-52.

-
- Cao L, Greenblatt DJ, Kwara A. Inhibitory effects of selected antituberculosis drugs on common human hepatic cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2017;45:1035–43.
 - Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites *Bioinformatics* 21, 2933-42
 - Cheng X, Lv X, Qu H, Li D, Hu M, Guo W, et al. Comparison of the inhibition potentials of icotinib and erlotinib against human UDP-glucuronosyltransferase1A1. *Acta PharmSinB.* 2017;7:657–64.
 - Choi EJ, Park JB, Yoon KD, Bae SK. Evaluation of the in vitro/in vivo potential of five berries (bilberry, blueberry, cranberry, elderberry, and raspberry ketones) commonly used as herbal supplements to inhibit uridinediphospho-glucuronosyl transferase. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:13–9.
 - Chowdhury JR, Wolkoff AW, Chowdhury NR, Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II.* (8thed.) New York: McGraw-Hill (pub.) 2001. Pp. 3063-3101.
 - Ciotti M, Yeatman MT, Sokol RJ, Owens IS. Altered coding for a strictly conserved di-glycine in the major bilirubin UDP-glucuronosyltransferase of a Crigler-Najjar type I patient. *Journal of Biological Chemistry*, 1995.
 - Crigler JF Jr, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus; a new clinical entity. *American Journal of Diseases of Children.* 1959; **83** (2): 259–60.
 - Dabke PS, Colah RB, Ghosh KK, Nadkarni AH Role of co-inherited Gilbert syndrome on hyperbilirubinemia in Indian beta thalassemia patients. *Hematology.* 2014 Oct;19(7):388-92.
 - Degoricija, V. (2004). Uloga sekundarnog hiperaldosteronizma i atrijskog natriuretskog peptida u održavanju ravnoteže soli i ishodu bolesti u cirozi jetre. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Preuzeto 10.06.2013. sa: <http://medlib.mef.hr/348/1/degoricija.pdf>
 - De Souza M, Vaisberg V, Abreu R, Ferreira A, da SilvaFerreira C, Nasser P, et al. UGT1A1*28 relationship with abnormal total bilirubin levels in chronic hepatitis C patients: Outcomes from a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(11): e6306.
 - Dluzen DF, Sun D, Salzberg AC, Jones N, Bushey RT, Robertson GP, LazarusP. Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Expression and Activity by MicroRNA 491-3p. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Mar; 348(3): 465–477.
 - Dodge JA, Lugar CW, Cho S, Short LL, Sato M, Yang NN, Spangle LA, Martin MJ, Phillips DL, Glasebrook AL, Osborne JJ, Frolik CA, Bryant HU. Evaluation of the major metabolites of raloxifene as modulators of tissue selectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61: 97–106.
-

-
- Ekblom K, Marklund SL, Jansson JH, Osterman P, Hallmans G, Weinehall L, et al. Plasma bilirubin and UGT1A1*28 are not protective factors against first-time myocardial infarction in a prospective, nested case-referent setting. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010; 3:340–347
 - Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology.* 2014; 146:1625–38
 - FDA News. FDA Approves New Uses for Evista. U.S. Department of Health & Human Services, 200 Independence Avenue, S.W. Washington, D.C. 20201, Sept. 2007
 - Foulk WT, Butt HR, Owen CA Jr, Whitcomb FF Jr, Mason HL. Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease): its natural history and related syndromes. *Medicine.* 1959; 38: 25-46.
 - Fujita KI, Sugiyama M, Akiyama Y, Ando Y, Sasaki Y. The small- molecule tyrosine kinase inhibitor nilotinib is a potent on competitive inhibitor of the SN-38 glucuronidation by human UGT1A1. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2011;67:237–41.
 - Girard H, Levesque E, Bellemare J, Journault K, Caillier B, Guillemette C. Genetic diversity at theUGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additionalUGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. *Pharmacogenet Genomics.*2007; 17:1077–1089.
 - Gourley GR. Disorders of bilirubin metabolism. In: Walker AW, Durie PR, Hamilton RJ, Walker-Smith JA, Watkins JB, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease.* Hamilton: Bc Decker Inc. 2000; p.1048-63.
 - Gong, Q.-H., Cho, J. W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N. K., Kubota, S., Carvalho, S., Pennington, M. W., Owens, I. S., Popescu, N. C. Thirteen UDP-glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 357-368.
 - Guillemette C, De Vivo I, Hankinson SE, Haiman CA, Spiegelman D, Housman DE, et al. Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:711–714.
 - Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 2004; 447:653–65

-
- Hall D, Ybazeta G, Destro-Bisol G, Petzl-Erler ML, Di Rienzo A: Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates, *Pharmacogenetics* 9. 1999; 591–599.
 - Harbourt DE, Fallona JK, Ito S, Baba T, Ritter JK, Glishe GL, Smith PC. Quantification of Human Uridine-Diphosphate Glucuronosyl Transferase (UGT) 1A Isoforms in Liver, Intestine and Kidney using nanoLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2012; 84(1): 98–105.
 - Herrera, J.L. (2003). Cirrhosis in Chronic Hepatitis C Infection. *HCV Advocate*. Preuzeto 23.05.2013. sa: <http://www.hcvadvocate.org/hcsp/articles/Herrera.html>
 - Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 340–343
 - Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, Lin HH, Lee TC, Chen PJ, Chu HC, Chang WK, Jeng KS, Lai MM, et al. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17:229–236
 - Ideo G, De Franchis R, Del Ninno E, Dioguardi N. Ethanol increases liver uridine diphosphate glucuronosyl transferase. *Experientia* 1971; 27:24-5
 - Ji HY, Lee H, Lim SR, Kim JH, Lee HS. Effect of efavirenzon UDP-glucuronosyltransferase 1A1, 1A4, 1A6, and 1A9 activities in human liver microsomes. *Molecules* 2012;17:851–60.
 - Ji HY, Liu KH, Kong TY, Jeong HU, Choi SZ, Son M, et al. Evaluation of Da-9801, a new herbal drug for diabetic neuropathy, on metabolism-mediated interaction. *Arch PharmRes* 2013;36:1–5.
 - Jordovic J, Bojovic K, Simonovic-Babic J, Gasic V, Kotur N, Zukic B, Vukovic M, Pavlovic S, Lazarevic I, Bekic I, Nikolic N, Urosevic A, Mitrovic N, Delic D. Significance of UGT1A1*28 genotype in patients with advanced liver injury caused by chronic hepatitis C. *J Med Biochem.* 2018; 37:1-8
 - Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Kostic T, Spasovski V, Nikcevic G, Srzentic S, Colovic M, Colovic N, Vidovic A, Antic D, Mihaljevic B, Pavlovic S, Tosic N. Mutational status and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012; 12(4): 252-60.
 - Kardon T, Mile V, Banhegyi G, CsalaM, BurchellB, MandlJ, Braun L. Ethanol-dependent induction of bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in rat liver is mediated by Kupffer cells. *Life Sciences* Volume 70, Issue 10, 2002; Pages 1205-1212.
 - Karlson P. Biokemija za studente kemije i medicine. Školska knjiga Zagreb, 1976.

-
- Kiang, T.K., Ensom, M.H. and Chang, T.K. 'UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions', *Pharmacol. Ther.* 2006; Vol.106, pp. 97–132.
 - Klassen MK. Uticaj varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika i gena modifikatora na fenotip pacijenata sa hiperfenilalaninemijom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. 2015
 - Koeller D. Bilirubin et bile acid metabolism. In: McIntoch N, Helms JP, Smyth LR, editors. *Forfar et Arneil's Textbook of Pediatrics*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2003; p.1195-6.
 - Lee WS, McKiernan PJ, Beath SV, et al. Bile bilirubin pigment analysis in disorders of bilirubin metabolism in early infancy. *Arch Dis Child.* 2001; 85:38–42.
 - Li Y, Buckley D, Wang S, Klaassen CD, Zhong X. Genetic polymorphisms in the TATA box and upstream phenobarbital-responsive enhancer module of the UGT1A1 promoter have combined effects on UDP glucuronosyltransferase 1A1 transcription mediated by constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, or glucocorticoid receptor in human liver. *Drug metabolism and disposition*, 2009. Vol37,No9, Pg(1978-1986)
 - Lin JP, Vitek L, Schwertner HA. Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem.* 2010; 56:1535–1543.
 - LV Xia, Xia Y, Finel M, Wu J, Ge G, Yang L. Recent progress and challenges in screening and characterization of UGT1A1 inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2019.
 - Liu Y, Ramírez J, Ratain MJ. Inhibition of paracetamol glucuronidation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71:917–20.
 - Liu Y, Ramírez J, House L, Ratain MJ. Comparison of the drug–drug interactions potential of erlotinib and gefitinib via inhibition of UDP glucuronosyl transferases. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:32–9.
 - Liu Y, Ramírez J, House L, Ratain MJ. The UGT1A1*28 polymorphism correlates with erlotinib's effect on SN-38 glucuronidation. *Eur J Cancer.* 2010;46(11):2097-103
 - Liu Y, She M, Wu Z, Dai R. The inhibition study of human UDP glucuronosyltransferases with cytochrome P450 selective substrates and inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011; 26(3): 386–393

-
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guimette C, Ikushiro S, Iyanagi T, et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:677-685.
 - Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S. Environmental factors as disease accelerators during chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2008; 48: 657–65.
 - Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: Gene-environment interactions. *Human Genomics*. 2010; Vol4.No4.238-249.
 - McDonald C, Uy J, Hu W, Wirtz V, Juethner S, Butcher D, et al. Clinical significance of hyperbilirubinemia among HIV-1-infected patients treated with atazanavir/ritonavir through 96 weeks in the CASTLE study. *AIDS Patient Care STDS* 2012;26:259–64.
 - Meech R, Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(12):907-15.
 - Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of Bilirubin Clearance. *Pediatr Res*. 2016;79(3):378-386
 - Mendoza Hernández JL, García Paredes J, Larrubia Marfil JR, Casimiro Peytavi C, Díaz-Rubio M. Diagnosis of Gilbert's syndrome: current status of the fasting test. *An Med Interna*. 1997;14(2):57-61
 - Mette L, Mitropoulos K, Vozikis A, Patrinos GP. Pharmacogenomics and public health: implementing 'populationalized' medicine. *Pharmacogenomics*. 2012; 13(7):803–13
 - Miners JO, Chau N, Rowland A, Burns K, McKinnon RA, Mackenzie PI, et al. Inhibition of human UDP- glucuronosyltransferase enzymes by lapatinib, pazopanib, regorafenib and sorafenib: implications for hyperbilirubinemia. *Biochem Pharmacol* 2017;129:85–95.
 - Mitrovic D, Zdravkovic R, Đorđević J, Ćirić D, Miletić E, Bogoslović M, Mladenović M, Milović N, Živulović A, Zlatković A. Žilberov sindrom kod pacijenta školskog uzrasta, prikaz slučaja. *Timočki medicinski glasnik*, 2013. Vol 38, br. 2
 - Mlakar SJ, Ostanek B. Development of a new DHPLC assay for genotyping UGT1A (TA)_n polymorphism associated with Gilbert's syndrome. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011; 21(2): 167-173.
 - Moczulski D, Trombik M, Gawlik B, Gorczynska-Kosiorz S, Drzeszczak W. Sensitivity of genetic testing for Gilbert syndrome in Polish population. *Gastroenterologia Polska* 2007, 14(1):9-11
-

-
- Mohamed ME, Tseng T, Frye RE. Inhibitory effects of commonly used herbal extracts on UGT1A1 enzyme activity. *Xenobiotica* 2010;40:663–9.
 - Mujagić Z, Mujagić H, Biohemija lijekova. Tuzla 2012.
 - Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio*, 51: 263-273.
 - Nagar S, Blanchard R. Pharmacogenetics of Uridine diphospho glucuronosyltransferase (UGT)1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metabolism Reviews* 38:393-409, 2006
 - Ostanek B, Furlan D, Mavec T, Lukac-Bajalo J. UGT1A1(TA)_n promoter polymorphism — A new case of a (TA)₈ allele in Caucasians. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 38(2): 78-82.
 - Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet*. 1975; 12:152–6.
 - Pavlović S. Talasemijski sindromi - molekularna genetika u savremenoj dijagnostici. Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, 2006.
 - Pavlović S, Zukić B, Stojiljković Petrović M. Molecular Genetic Markers as a Basis for Personalized Medicine. *Journal of Medical Biochemistry*. 2014; 33(1): 8-21.
 - Pavlović S, Stojiljković M, Tošić N, Zukić B, Ugrin M, Karan-Djurašević T, Spasovski V. Genomics as a basis for precision medicine. *Biologia Serbica*, 2017; 39(1):46-52
 - Perera, M.A., Innocenti, F. and Ratain, M.J. (2008), 'Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: Are we there yet?', *Pharmacotherapy* Vol. 28, pp. 755–768.
 - Peterson, S., Bigler, J., Horner, N.K., Potter, J.D. et al. 'Cruciferae interact with the UGT1A1*28 polymorphism to determine serum bilirubin levels in humans', *J. Nutr.* 2005. Vol. 135, pp. 1051–1055.
 - Piekuse L, Kreile M, Zarina A, et al. Association between inherited monogenic liver disorders and chronic hepatitis C. *World Journal of Hepatology*. 2014; 6(2): 92–7.

-
- Powell LW, Hemingway E, Billing BH, Sherlock S. Idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome): a study of 42 families. *New Eng. J. Med.* 277: 1108-1112, 1967.
 - Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet.* 2003 Dec 20; 362(9401):2095-100.
 - Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S, Clegg JB, Weatherall DJ. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Vol31, Issue1, 2003, pg 98-10
 - Radlović N, Leković Z, Mladenović M, Ristić D, Radlović V, Lekić V, *et al.* Gilbert's syndrome in children – Our experience. *Srp Arh Celok Lek.* 2007;135(5-6): 317-320.
 - Radlović N, Ristić D, Brdar R, Janić N, Leković Z, Janić D, *et al.* Association of hereditary elliptocytosis and Gilbert's syndrome as the cause of biliary calculus: Case report. *Srp Arh Celok Lek.* 2011;139(5-6): 386-389.
 - Radlovic N. Hereditary Hyperbilirubinemias. *Srp Arh Celok Lek* 2014. 142(3-4):257-260
 - Radoi VE, Ursu RI, Poenaru E, Arsene C, Bohiltea CL, Bohiltea R. Frequency of the UGT1A1*28 polymorphism in a Romanian cohort of Gilbert Syndrome individuals. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2017; 26(1): 25-28.
 - Radu P, Atsom J. Gilbert's syndrome-clinical and pharmacological implications. *Isr Med Assoc J.* 2001;3(8): 593-598.
 - Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija.* Beograd, Data status, 2005
 - Rawa K, Adamowicz-Salach A, Matysiak M, Trzemecka A, Burzynska B. Coexistence of Gilbert syndrome with hereditary haemolytic anaemias. *Journal of Clinical Pathology*, 2012. Vol 65, Issue7
 - Ribrag V, Koscielny S, Casasnovas O, Cazeneuve C, Brice P, Morschhauser F *et al.* Pharmacogenetic study in Hodgkin lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient prognosis. *Blood.* 2009; 113(14): 3307-13.
 - Rodger AJ, Roberts S, Lanigan A, Bowden S, Brown T, Crofts N. Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology.* 2000 Sep;32(3):582-7.
 - Roy CC, Silverman A, Alagille D. Neonatal unconjugated hyperbilirubinemia. In: Roy CC, Silverman A, Alagille D, editors. *Pediatric Clinical Gastroenterology.* St Louis: Mosby; 1995. p.603-19.

-
- Sambrook J, Russell DW, Cold Spring Harbor L: Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
 - Sane RS, Steinmann GG, Huang Q, Li Y, Podila L, Mease K, et al. Mechanisms underlying benign and reversible unconjugated hyperbilirubinemia observed with faldaprevir administration in hepatitis C virus patients. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;351:403–12.
 - Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA. Biochemistry*. 1977; Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467.
 - Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, et al. Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Clin Invest*. 1994; 94:2385–91
 - Sherlock S, Dooley J. Jaundice. In: Sherlock S, Dooley J, eds. *Diseases of the Liver and Biliary Sistem*. Oxford: Blackwell Science; 1997. p.201-15.
 - Singer JB , Shou Y, Giles F, Kantarjian HM , Hsu Y , Robeva AS , Rae P , Weitzman A , Meyer JM , Dugan M, Ottmann OG. UGT1A1 promoter polymorphism increases risk of nilotinib-induced hyperbilirubinemia. *Leukemia* (2007) 21, 2311–2315
 - Sleisenger MH, Kahn I, Barniville H, Rubin W, Ben-Ezzer J, Arias IM. Nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with hepatic glucuronyl transferase deficiency: a genetic study in four generations. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 1967; 80: 259-266.
 - Sparks R, Ulrich CM, Bigler J, Tworoger SS, Yasui Y, Rajan KB, et al. UDPglucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2004; 6:R488–R498.
 - Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem*. 2000; 275:36164–36171
 - Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. Polymorphic expression of the UDPglucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol*. 1998;54:647–654.

-
- Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24:555–71.
 - Strassburg CP. Gilbert-Meulengracht's syndrome and pharmacogenetics: is jaundice just the tip of the iceberg? *Drug Metab Rev* 2010;42:162–75.
 - Strassburg, CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* Vol. 9. 2008; pp. 703–715.
 - Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong Q, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T. The Phenobarbital Response Enhancer Module in the Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase *UGT1A1* Gene and Regulation by the Nuclear Receptor CAR. *Hepatology.* 2001; Vol 33, No. 5: Pg.1232-1238.
 - Sun XY, Ge GB, Tang H, Wang YQ, Yao XC, Li L. Inhibition of regorafenib against UDP-Glucuronosyltransferases. *Acta PharmSin.* 2017;52:1705–14.
 - Tanner S. Jaundice. In: Tanner S, editor. *Paediatric Hepatology.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989. p.20-49.
 - Thoguluva Chandrasekar V, John S. Gilbert Syndrome. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470200/>
 - Torkamani A, Vaux KK. Irinotecan Toxicity and UGT1A, 2015. preuzeto sa: <https://emedicine.medscape.com/article/1790367-overview>
 - Torres AK, Escartín N, Monzó C, Guzmán C, Ferrer I, González-Munoz C, *et al.* Genetic susceptibility to Gilbert's syndrome in a Valencian population; efficacy of the fasting test. *Rev Clin Esp.* 2017; 217(1): 1-6.
 - Travan L, Lega S, Crovella S, Montico M, Panontin E, Demarini S. Severe neonatal hyperbilirubinemia and UGT1A1 promoter polymorphism. *J Pediatr.* 2014; 165:42–5.
 - Trdan Lusin T, Trontelj J, Mrhar A. Raloxifene glucuronidation in human intestine, kidney, and liver microsomes and in human liver microsomes genotyped for the UGT1A1*28 polymorphism. *Drug Metab Dispos.* 2011 Dec;39(12):2347-54.
 - Trontelj, J., Marc, J., Zavrtnik, A., Bogataj, M. et al. (2009), Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* Vol. 67, pp. 437–444.
 - Tseng CS, Tang KS, Lo HW, et al. UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk and onset age. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1758–63.
-

-
- Tsezou A, Tzetis M, Giannatou E, Gennatas C, Pampanos A, Kanavakis E, et al. Genetic polymorphisms in the UGT1A1 gene and breast cancer risk in Greek women. *Genet Test*. 2007;11:303–306.
 - Tzetis M1, Kanavakis E, Tsezou A, Ladis V, Pateraki E, Georgakopoulou T, Kavazarakis E, Maragoudaki E, Karpathios T, Kitsiou-Tzeli S. Gilbert syndrome associated with beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2001 Dec;18(8):477-84.
 - Urbánek P, Lení~ek M, Muchová L, Subhanová I, DušekL, Kasp íková N, et al. No association of promoter variations of HMOX1 and UGT1A1 genes with liver injury in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2011; 10(4): 445–51.
 - van der Bol, J.M., Mathijssen, R.H., Loos, W.J., Friberg, L.E. et al. Cigarette smoking and irinotecan treatment: Pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia, *J. Clin. Oncol*. 2007; Vol. 25, pp. 2719–2726.
 - Viennas E, Komianou A, Mizzi C, Stojiljkovic M, Mitropoulou C, Muilu J, et al. Expanded national database collection and data coverage in the FINDbase worldwide database for clinically relevant genomic variation allele frequencies. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(D1): D846-D853.
 - Vlaming ML, Pala Z, van Esch A, et al. Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:3084–93.
 - Watchko JF. Genetics and pediatric unconjugated hyperbilirubinemia. *J Pediatr*. 2013 Jun;162(6):1092-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.01.044. Epub 2013 Feb 27.
 - Wen, Z., Tallman, M.N., Ali, S.Y. and Smith, P.C. (2007), ‘UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the principal enzyme responsible for etoposide glucuronidation in human liver and intestinal microsomes: Structural characterization of phenolic and alcoholic glucuronides of etoposide and estimation of enzyme kinetics’, *Drug Metab. Dispos*. Vol. 35, pp. 371–380.
 - Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed, Blackwell Sci., Oxford, 2001.
 - Wisnumurti D, Sribudiani Y, Porsch RM, MaskoenAM, Abdulhamied LI, Rahayuningsih SE, Asni EK, Sleutels F, Kockx CEM, van Ijcken WFJ, Sukadi A, Achmad TH. UGT1A1 Genetic Variations and Haplotype Associated with Neonatal Hyperbilirubinemia in Indonesian Population. *BioMed Research International* Vol 2018.
 - Wolf DC. Cirrhosis. Medscape Reference. 2012; Preuzeto sa: <http://emedicine.medscape.com/article/185856-overview>
 - Wolf RC, Smith G, Smith RL. Pharmacogenetics. *BMJ*. 2000; 320(7240): 987–990.
 - Zakon o prevenciji i dijagnostici geneti~kih bolesti, geneti~ki uslovljenih anomalija i retkih bolesti. *Sl. glasnik RS*. br.8/2015.
-

-
- Zhang D, Chando TJ, Everett DW, Patten CJ, Dehal SS, Humphreys WG. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1729–39.
 - Zhang N, Liu Y, Jeong H. Drug–drug interaction potentials of tyrosine kinase inhibitors via inhibition of UDP-glucuronosyltransferases. *Sci Rep* 2015;5:17778.
 - Zheng YF, Bae SH, Choi EJ, Park JB, Kim SO, Jang MJ, et al. Evaluation of the in vitro/in vivo drug interaction potential of Bst204, a purified dry extract of ginseng, and its four bioactive ginsenosides through cytochrome P450 inhibition/induction and UDP glucuronosyl transferase inhibition. *Food Chem Toxicol* 2014;68:117–27.
 - Zhou J, Tracy TS, Remmel RP. Correlation between Bilirubin Glucuronidation and Estradiol-3-glucuronidation in the presence of model UDP glucuronosyltransferase 1A1 Substrates/Inhibitors. *Drug Metabolism and desposition*, 2010; Vol. 39, No. 2
 - Zucker SD, Qin X, Rouster SD, Yu F, Green RM, Keshavan P, et al. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12671–6.
 - www.genomatix.de/online.
 - www.drugbank.ca
 - <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/UGT1A1-allele-nomenclature.html>
 - <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/anemije-uzrokovane-hemolizom>
 - www.rzs.rs.ba/static/uploads/bilteni/popis/gradovi_opstine_naseljena_mjesta/Rezultati_Popisa_2013_Gradovi_Opstine_Naseljena_Mjesta_WEB.pdf
 - <http://www.stat.gov.rs/sr-Latn/oblasti/stanovnistvo/procene-stanovnistva>
 - <https://mediately.co/hr/drugs>
 - <https://biosistemika.com/workshops>

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Марија Вуковић _____

Број индекса _____ М3007/2008 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Варијанте промотора гена за уридин-дифосфат-глукуронозилтрансферазу 1А1
као модулатори биохемијског фенотипа и популационо фармакогенетички
маркери

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 17.07.2019

Марија Вуковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Марија Вуковић

Број индекса _____ М3007/2008

Студијски програм _____ Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биологија
еукариота

Наслов рада _____ Варијанте промотора гена за уридин-дифосфат-
глукуронозилтрансферазу 1А1 као модулатори биохемијског фенотипа и
популационо фармакогенетички маркери

Ментор _____ др Бранка Зукић, др Соња Павловић

Потписани _____ Марија Вуковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 17.07.2019.

Потпис докторанда

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Варијанте промотора гена за уридин-дифосфат-глукуронозилтрансферазу 1A1 као модулатори биохемијског фенотипа и популационо фармакогенетички маркери

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.07.2019.

Марија Ручић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.