

Genetski vidiki indirektne hiperbilirubinemije pri novorojenčku

Pregledni članek /
Review article

Genetic aspects of indirect hyperbilirubinaemia in newborns

Katja Jarc Georgiev, Manca Velkavrh

Izvleček

Nekonjugirana hiperbilirubinemija je v neonatalnem obdobju pogost pojav. Vzroki zanj so številni, od prekomerne produkcije bilirubina, motenega privzema v jetrih in motene konjugacije bilirubina do povečane enterohepatične cirkulacije. Če s preiskavami ne opredelimo njenega vzroka, se poslužimo genetskega diagnosticiranja. Genetska osnova nekonjugirane hiperbilirubinemije je široka in obsega veliko število genov. Najpogostejši in najbolj raziskani so hemolitični vzroki in motnje v konjugaciji bilirubina. V zadnjem času je vse več podatkov tudi o polimorfizmu genov kot vzroku nekonjugirane hiperbilirubinemije.

Ključne besede: nekonjugiran bilirubin, konjugacija, hemoliza, sekvenciranje naslednje generacije, novorojenček.

Abstract

Indirect hyperbilirubinaemia is a common finding in the neonatal period. There are numerous causes of neonatal indirect hyperbilirubinemia, from excessive bilirubin production, impaired hepatic bilirubin uptake or bilirubin conjugation and increased enterohepatic circulation. Genetic testing is increasingly used when investigations do not determine the cause of unconjugated hyperbilirubinaemia. The genetic basis of indirect hyperbilirubinaemia is broad and encompasses a large number of genes. The most commonly encountered and researched are haemolytic causes of hyperbilirubinaemia and disorders of bilirubin conjugation. Recently, however, there is growing evidence of gene polymorphism as a cause of unconjugated hyperbilirubinaemia in the neonatal period.

Key words: indirect hyperbilirubinaemia, conjugation, haemolysis, next-generation sequencing, newborn.

Uvod

Nekonjugirana hiperbilirubinemija (NH) je med novorojenčki zelo pogosta, saj je v prvem tednu življenja prisotna pri več kot 60 % donošenih in 80 % nedonošenih novorojenčkov (1–4). Rumena obarvanost kože je posledica kopičenja nekonjugiranega, v vodi netopnega endogenega pigmenta bilirubina in se pri novorojenčku klinično izrazi, ko je presežena serumska koncentracija bilirubina 85 $\mu\text{mol/l}$ (3–5).

Zaradi novorojenčku lastne fiziologije so ti bolj dovzetni za razvoj visokih vrednosti nekonjugiranega bilirubina. Tako je na eni strani ob višjih koncentracijah hemoglobina in krajši življenjski dobi rdečih krvnic celic (RKC) povečana sinteza bilirubina, zaradi še neučinkovitih mehanizmov privzema bilirubina v jetra in njegove konjugacije pa je moteno njegovo izločanje (6). Visoke vrednosti bilirubina predstavljajo tveganje dolgoročnih nevroloških okvar (2,7). Ob visokih serumskih vrednostih bilirubina se lahko razvije klinična slika akutne bilirubinske encefalopatije in njenih poznih sekvel s horeoatetotično obliko cerebralne paralize, okvaro sluha in paralizo očesnih mišic (2,8–10). Zato moramo pri vsakem novorojenčku slediti razvoju zlatenice ter oceniti njeno stopnjo in nujnost zdravljenja (3,5).

Pri kliničnem delu se večkrat srečujemo z visokimi vrednostimi nekonjugiranega bilirubina, a kljub številnim preiskavam etiologije ne uspemo pojasniti. Za genetsko pogojeno NH so značilni etiološka raznolikost, vplivi okolja in interakcija številnih genskih lokusov. Tako je etiološki razpon pomembne neonatalne hiperbilirubinemije širok, od patološke mutacije v posameznem genu (npr. Crigler Najjar tipa I in hereditarne hemolitične anemije) do medsebojne interakcije več ikterogenih genetskih variant. Čeprav vsaka posamezna varianta le minimalno vpliva na razvoj povišanih vrednosti bilirubina, pa ob soizražanju lahko povzročijo izrazito hiperbilirubinemijo (11–15).

V preglednem prispevku predstavljamo genetske vzroke NH pri novorojenčku in možnosti genetskega diagnosticiranja s poudarkom na metodi sekvenciranja naslednje generacije (*angl.* next generation sequencing, NGS).

Vzroki nekonjugirane hiperbilirubinemije

Spol in rasa

Številni avtorji ugotavljajo višjo pojavnost NH, višje vrednosti celokupnega serumskega bilirubina in pogostejše bolnišnične obravnave pri novorojenčkih moškega spola (11,16–20). Novorojenčki naj bi bili tudi dvakrat bolj dovzetni za razvoj nevroloških okvar kot novorojenke (8,11,21,23–25). K večji razširjenosti NH in njenih zapletov pri moškem spolu naj bi vsaj delno prispevala večja pojavnost pomanjkanja encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, na X-vezane recesivne presnovne bolezni, in Gilbertovega sindroma pri moških (11,26–30). Glede na rezultate raziskav na živalskih modelih, kjer so v področju cerebeluma in možganskega debla pri moškem spolu ugotavljali dvakrat višje vrednosti bilirubina ob primerljivih serumskih koncentracijah bilirubina med spoloma, bi lahko pomembno vlogo pri razvoju kernikterusa imeli tudi spolni hormoni (11,31).

Pojavnost NH se med rasami razlikuje (14). Pri temnopoltih novorojenčkih ugotavljajo nižje vrednosti bilirubina kot pri belih (14,32), medtem ko je NH pogostejša pri novorojenčkih vzhodnoazijskega in japonskega porekla ter Indijancih Navajo (14,32–34). Prav tako se pojavnost NH razlikuje med predstavniki iste rase, ki so pripadniki različnih etičnih skupin, predvsem če so geografsko izolirane (14,35). NH se pogostejše pojavlja znotraj iste družine, pri čemer je tveganje zlatenice pri sorojencu 12,5-krat višje kot pri novorojenčkih, ki v neonatalnem obdobju niso razvili NH (14). Najpogostejši

vzrok NH je neskladje v krvnih skupinah med materjo in novorojenčkom (14,36).

Hereditarne hemolitične anemije

Izraz hereditarne hemolitične anemije (HHA) obsega heterogeno skupino motenj, za katere je značilna krajša življenjska doba RKC (37). Ob tem klinična slika HHA lahko variira od popolnoma brezsimptomne do življenje ogrožajoče hemolitične anemije. Genetska etiologija HHA je raznolika in zajema mutacije v 30–80 genih, ki so povezani s produkcijo, citoskeletom in encimi RKC ter s sintezo ali funkcijo hemoglobina (38).

Okvare membrane rdečih krvnic celic

Okvare membrane RKC lahko razdelimo v dve večji skupini – intrinzične okvare RKC in motnje pri uravnavanju volumna RKC. V prvo skupino uvrščamo hereditarno sferocitozo, hereditarno eliptocitozo (HE) in hereditarno piropoikilocitozo (HPP). Mutacije, ki so najpogostejše povezane z razvojem membranskih defektov RKC, so v genih, ki kodirajo ankirin-1 (*ANK*), beta-spektrin (*SPTB*), anionski izmenjevalni protein-1 (*SLC4A1*), protein 4.2 (*EPB42*) in alfa-spektrin (*SPTA1*) (38).

V evropski populaciji je najpogostejša hereditarna sferocitoza s pojavnostjo 1/1000–1/3000, pri kateri je najpogostejše vzrok mutacija v genu *ANK1* (40–65 %). Hereditarna sferocitoza se v 75 % deduje avtosomno dominantno (38–41).

HE in HPP naj bi na podlagi molekularnega diagnosticiranja predstavljali dve entiteti istega spektra, pri katerih najpogostejše ugotavljamo mutacije v genih *SPTA1*, *SPTB* in *EPB41*. Medtem ko gre pri HE najpogostejše za heterozigotno mutacijo z blago klinično sliko, je pri HPP posameznik največkrat sestavljen heterozigot ali homozigot, ki ima klinično sliko zmerne do hude hemolitične anemije z izrazito anizopoikilocitozo (38).

Opisani so aleli, ki lahko povzročijo le blago zmanjšanje v izražanju genov, povezanih z okvaro membrane RKC. Predhodno so identificirali dva alela v genu za alfa-spektrin, imenovana alfa-LELY in alfa-LEPRA (38,42,43). Alfa-LELY je alel, ki je sestavljen iz treh variant (c.5572C>G, c.6531-12C>T in c.6549-12G>A) v genu *SPTA1*. Ima ga približno 20–30 % splošne populacije in samostojno ni povezan s hemolizo (37,38). V primeru dodatne mutacije v genu *SPTA1* na drugem alelu lahko alfa-LELY povzroči zmerno do hudo hemolitično anemijo (37,44). Podobno prisotnost alela alfa-LEPRA, ki povzroči premik bralnega okvira in predčasni zaključek translacije alfa spektrina (37, 45), samostojno verjetno ni zadosten vzrok za razvoj hemolize, a lahko v kombinaciji z drugo mutacijo v genu *SPTA1*, podobno kot alfa-LELY, povzroči zmerno do hudo hemolizo (37,38)

Motnje v uravnavanju volumna RKC lahko v grobem glede na stopnjo dehidracije RKC razdelimo na prekomerno hidrirane (*angl.* overhydrated) stomatocitoze in na dehidrirane stomatocitoze. Obe obliki sta posledici spremenjenja prepustnosti membrane RKC za monovalentne katione (38). Dehidrirana stomatocitoza, znana tudi kot hereditarna kserocitoza (*angl.* hereditary xerocytosis), se klinično izrazi kot hemolitična anemija različne stopnje z nepojasnjanim kopičenjem železa (38). Najpogostejše okvarjen je gen *PIEZO1* (38,46,47). Okvare RKC, pri katerih pride do prekomerne hidracije, so izredno redke, saj je do sedaj opisanih le približno 100 posameznikov, pri katerih je bil najpogostejša najdena heterozigotna mutacija v genu za Rh-vezan glikoprotein (*angl.* Rh-associated glycoprotein) (38,48).

Okvare encimov v rdečih krvnic celic

Mutacije encimov v RKC, udeleženi v glikolitični, pentoza-fosfatni in glutationski poti, lahko povzročijo hemolitično anemijo s heterogeno klinično sliko, ki je odvisna od okvarjenega encima in stopnje rezidualne encimske aktivnosti (37,49).

Pomanjkanje encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) v RKC je eno najpogostejših pomanjkanj encimov v svetovni populaciji. Prizadelo naj bi približno 400 milijonov ljudi in je samostojno najpogostejši vzrok kernikterusa pri novorojenčkih (11,26,50,51). Pogostejše se pojavlja pri temnopolnih in pri osebah mediteranskega, srednjeazijskega in jugovzhodnoazijskega porekla (50–52). V RKC je G6PD udeležena v pentoza-fosfatni poti in katalizira NADP v njeno reducirano obliko – NADPH. Zmanjšana produkcija NADPH poveča občutljivost RKC za oksidativni stres, ki lahko skrajša njihovo življenjsko dobo (50,53).

Gen za G6PD se nahaja na subtelermski regiji dolgega kraka kromosoma X (Xq28), vsebuje trinajst eksonov in kodira 515 aminokislin. Znanih je več kot 220 mutacij, ki se pojavljajo preko celotne kodirajoče regije (38,54). Skoraj vse različice G6PD so posledica substitucije posamezne aminokislinske. Najpogostejši varianti sta G6PD A- in G6PD-Mediterranean (*angl.* G6PD Mediterranean). Pri prvi obliki gre za kombinacijo mutacij c.202G>A in c.376 A>G na istem kromosomu, kar je znano kot G6PD A-alel in je najpogostejša različica G6PD v subsaharski Afriki, stopnja rezidualne encimske aktivnosti pa je približno 12 % (38,55). Različica G6PD-Mediterranean (c.563C>T) je najpogostejše prisotna v populacijah južne Italije, Grčije, Španije in Srednjega vzhoda. Zanj je značilno hudo pomanjkanje encima, saj je rezidualna encimska aktivnost manj kot 1 % (38,55).

Čeprav je pomanjkanje G6PD na X-vezana recesivna bolezen (50,56,57), za katero pretežno zbolevalo moški, so opisani primeri bolezni tudi med ženskami (50,57). Slednje je najverjetneje posledica naključne inaktivacije kromosoma X z nastankom dveh populacij RKC pri heterozigotih, tistih z normalno in tistih z znižano encimsko aktivnostjo G6PD. Razmerje med njima določa stopnjo izražnosti fenotipa in s tem pomanjkanja G6PD (14,58,59). Številni avtorji poudarjajo, da je doda-

ten ključni dejavnik stopnje izražanja NH v primeru heterozigotne mutacije za G6PD prisotnost polimorfizma UGT promotorja, ki ga predstavljamo v nadaljevanju (14).

Tipično je pomanjkanje G6PD povezano z epizodami hude hemolize, ki se klinično izrazi kot zlatenica in anemija. Običajno se klinična slika pojavi 24–48 ur po izpostavitvi sprožilnemu dejavniku. To so lahko določena zdravila (antimalariki, sulfonamidi, zeliščni pripravki), okužbe ali določene stročnice (*angl.* fava bean). Opisani so tudi primerni hemolitičnih kriz pri novorojenčkih, katerih matere so uživale omenjene stročnice in so tako z njimi prišli v stik preko materinega mleka (14,60) oziroma posteljice (14,61). Večkrat vzroka hemolitičnih kriz pri posamezniku ne ugotovimo (14). Pri novorojenčkih lahko zlatenica nastopi akutno in nepredvidljivo. Ob tem so lahko hematološki parametri hemolize (zmanjšanje vrednosti hemoglobina/hematokrita in povečanje vrednosti retikulocitov) odsotni, zato so v številnih raziskavah dokazali, da je v primeru pomanjkanja G6PD določanje karboksihemoglobina najboljši kazalnik hemolize (14,62–64).

Pomanjkanje piruvat kinaze (PK) je najpogostejše pomanjkanje encima v glikolitični poti. PK sodeluje pri pretvorbi fosfoenolpiruvata v piruvat in hkrati s fosforilacijo ATP zagotavlja RKC s približno polovico za homeostazo potrebne ATP. Znani sta podenota R (RKC) in podenota L (v jetrih), ki ju kodira skupni gen *PKLR*. Slednji se nahaja na kromosomu 1q21. Gen *PKLR* je sestavljen iz 12 eksonov in do sedaj je opisanih več kot 260 različnih mutacij, ki so povezane z razvojem hemolitične anemije (38,65). Med njimi so najpogostejše točkovne mutacije (več kot 70 %), pri čemer je c.1529G>A najpogostejša v Severni Ameriki in Evropi, c.1465C>T v Južni Evropi in c.1468C>T v Aziji (38, 66). Pomanjkanje piruvat kinaze se deduje na avtosomno recesiven način, opisani pa so tudi primeri sestavljenih heterozigotov (38). Klinična slika s hudo anemijo in hiperbilirubinemijo je najbolj

izrazita v neonatalnem obdobju, opisani so tudi primeri kernikterusa (14,38). V kasnejši dobi naj bi bile težave manj izrazite (38).

Hemoglobinopatije

Hemoglobinopatije so med najpogostejšimi oblikami HHA. Zanje je značilna spremenjena in neuravnotežena sinteza hemoglobinskih verig (npr. pri talasemiji α in talasemiji β) ali strukturno spremenjenih hemoglobinskih variantah (npr. pri anemiji srpastih eritrocitov) (50,67,68).

Ocenjujejo, da naj bi se na leto rodilo približno 300.000 novorojenčkov s klinično pomembno hemoglobinopatijo (50,69), med katerimi je za razvoj hiperbilirubinemije v neonatalni dobi najpomembnejša talasemija α . Pri talasemiji α je motena sinteza verig α -globina (50,70) in je posledica delecije enega ali več genov (od skupaj štirih genov) za α -globin. Klinična slika je odvisna od števila okvarjenih genov in variira od brezsimptomnega prenašalstva (izguba enega gena) do talasemije major s tvorbo hemoglobina Barts (γ_4), fetalnega hidropsa in pogosto smrtjo zarodka (50). Zaradi visoke stopnje homologije med geni ter duplikacij in variacij števila kopij je analiza sekvenciranja naslednje generacije pri diagnosticiranju hemoglobinopatij kompleksna, zato številni avtorji priporočajo uporabo drugih metod (sekvenciranje po Sangerju, od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (*angl.* multiplex ligation of dependent probe amplification, MLPA), tekočinska kromatografija itd.) (37,38).

Motnje v presnovi bilirubina

V procesu izločanja bilirubina so pomembni štirje koraki: i) privzem in skladiščenje nekonjugiranega bilirubina v hepatocitih, ii) konjugacija bilirubina, iii) izločanje bilirubina z žolčem in iv) ponovni privzem konjugiranega bilirubina v hepatocite (6). Dedne vzroke predstavljamo pri vsakem od opisanih korakov in se lahko izrazijo v obdobju novorojenčka od klinično nepomemb-

nih do stanj s hudo nevrološko okvaro ali smrtnim izidom (6). V nadaljevanju predstavljamo najpogostejše okvare z dedno osnovo pri privzemu, skladiščenju in konjugaciji bilirubina.

Motnje v privzemu bilirubina in njegovega skladiščenja v hepatocitih

Motnje v privzemu bilirubina in njegovega skladiščenja so v literaturi (6,71) opisane redko, njihova klinična vrednost pa je še nepopolno raziskana. Glede na rezultate nekaterih raziskav je polimorfizem v genih za družino glutation-S-tranferaze, med katere uvrščamo tudi ligandin citoplazmatski transportni protein, na katerega je vezan bilirubin, morda povezan z večjim tveganjem neonatalne hiperbilirubinemije (6,72).

Motnje v konjugaciji bilirubina

Konjugacija je proces tvorbe v vodi topne oblike bilirubina v hepatocitih. Edini encim, ki katalizira proces konjugacije, je transmembranski encim uridindifosfat glukuronozil transferaza 1A1 (UGT1A1), ki ga kodira gen *UGT1A1* (6). Mutacije v omenjenem genu povzročajo motnjo v konjugaciji bilirubina in motnjo v izločanju bilirubina.

Trenutno je znanih več kot 130 mutacij (v kodirajoči in nekodirajočih regijah) v genu *UGT1A1*, ki zmanjšajo delovanje encima (6,73). Nasprotno lahko preko t. i. distalnega fenobarbitalnega ojačevalnega zaporedja (*angl.* distal phenobarbital response enhancer element) z uporabo fenobarbitala spodbudimo izražanje gena (6,74).

V nadajevanju predstavljamo tri sindrome, povezane z motnjo konjugacije: sindrom Crigler-Najjar tipa I, sindrom Crigler-Najjar tipa II in Gilbertov sindrom.

Sindrom Crigler-Najjar tipa I

Za sindrom Crigler-Najjar tipa I je značilna odsotna ali skoraj odsotna aktivnost encima UGT1A1 (6,75). Sindrom

se deduje avtosomno recesivno, pri čemer so lahko posamezniki homozigoti ali sestavljeni heterozigoti. Opisane so mutacije tako v vseh petih eksonih gena *UGT1A1* (6,73) kot tudi v intronskih regijah (6,76). Zlatenica se izrazi neposredno po rojstvu z vrednostmi CSB, ki so višje od 342 $\mu\text{mol/l}$. Ob odsotnosti zdravljenja s fototerapijo oziroma z izmenjevalno transfuzijo lahko nastopa bilirubinska encefalopatija in smrt (6,77). Bolniki potrebujejo fototerapijo vse življenje, a se sčasoma njena učinkovitost zmanjšuje. Tudi tveganje zlatenice je povečano vse življenje.

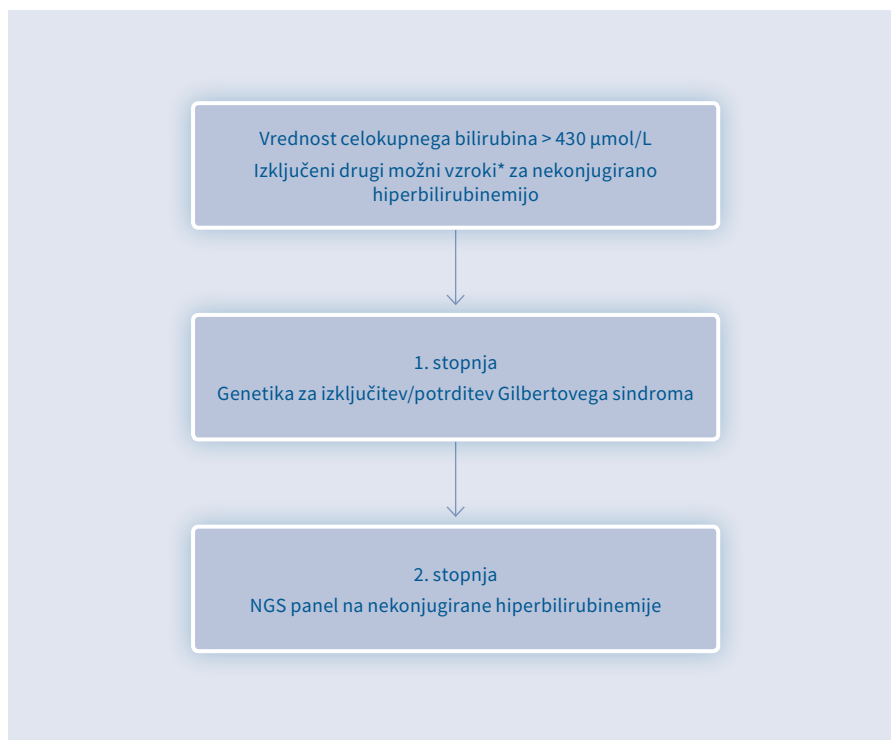
Sindrom je najpogostejše posledica mutacije tipa "non-sense" in tvorbe stop kodona v genu *UGT1A1*. Zaradi narave mutacije uporaba fenobarbitala za spodbujanje izražanja gena ni učinkovita. Trenutno je edino trajno zdravljenje presaditev jeter, razvijajo pa tudi nove metode genskega zdravljenja (6,78–80).

Sindrom Crigler-Najjar tipa II

Pri sindromu Crigler-Najjar tipa II je encimska aktivnost UGT1A1 znižana, a ne odsotna, pri čemer je aktivnost encima manj kot 10 % normalne vrednosti (6,81). Indirektna hiperbilirubinemija je prisotna pri novorojenčkih v prvih dneh življenja, a redko preseže 342 $\mu\text{mol/l}$ (77) in tudi kernikterus se razvije redko. Pri starejših otrocih in odraslih lahko prehodni porast vrednosti bilirubina povzroči bolezen ali stres (6). Najpogostejše so z razvojem sindroma Crigler-Najjar tipa II povezane točkaste mutacije, ki povzročajo substitucijo aminokisline (73). Izražanje gena za UGT1A1 lahko spodbudimo s fenobarbitalom, saj po zdravljenju lahko zaznamo zmanjšanje vrednosti CSB za 30 % (81). Napoved izida bolezni je ugodna (6).

Gilbertov sindrom

Gilbertov sindrom je pogosta prirojena motnja konjugacije bilirubina, pri kateri je aktivnost izoencima UGT1A1 znižana za 70 % ali več (11,82). Čeprav



SLIKA 1. OBRAVNAVA OTROKA Z VISOKO NEKONJUGIRANO ZLATENICO.

FIGURE 1. MANAGEMENT OF THE CHILD WITH SEVERE UNCONJUGATED JAUNDICE.

*hemolitična bolezen novorojenčka zaradi neskladja v krvnih skupinah, okužba, hipotiroza, krvavitev, policitemija ...

se najpogosteje deduje avtosomno recesivno (83), so opisani primeri avtosomno dominantnega dedovanja (84–86). Način dedovanja je posledica variabilne penetrance in izražanja (82) ter je odvisen od variante prisotnega alela *UGT1A1*, soizražanja modifikirajočih alelov in prisotnosti okoljskih dejavnikov (11). Do danes je opisanih več kot 16 variant alelov *UGT1A1*, ki so povezane s klinično sliko Gilbertovega sindroma. V evropski populaciji je najpogosteje prisotna varianta *UGT1A1**28, kjer je v promotorski regiji gena *UGT1A1* v t. i. TATAA box prisotno dodatno dinukleotidno zaporedje TA. V večini raziskav ugotavljajo, da prisotnost variante *UGT1A1**28 samostojno ne pomeni povečanega tveganja NH (12,84,87,88), medtem ko naj bi se tveganje povečalo ob dodatnih ikterogenih dejavnikih, kot so mutacije v genu *UGT1A1*, dojenje in hemolitična bolezen (11). Slednje je prvič opazil Kaplan s sodelavci, ko je med novorojenčki moškega spola s prisotnostjo variante *UGT1A1**28 in pomanjkanjem G6PD ugotavljal višje vrednosti celokupnega bilirubina (89).

Nekonjugirana hiperbilirubinemija, povezana z dojenjem

V več raziskavah na japonski populaciji novorojenčkov so pokazali, da je lahko polimorfizem genov *UGT1A1* 211G>A, *UGT1A1*, *SLCO1B1* in *SLCO1B3* dejavnik tveganja NH pri zmanjšanju telesne teže za več kot 10 %. Neizadostno dojenje povzroči povečanje vrednosti nekonjugiranega bilirubina, ki je lahko večje in bolj ogrožajoče, če je novorojenček nosilec polimorfizma v omenjenih genih (33,90).

Soizražanje polimorfizmov ikterogenih genov

K razvoju hiperbilirubinemije pri novorojenčku lahko prispeva tudi soizražanje polimorfizmov v genih, ki povečujejo produkcijo bilirubina ter zmanjšujejo privzem bilirubina v jetra, njegovo konjugacijo in izločanje (12,87,91). Opisani sta dve možnosti izražanja –

sestavljen heterozigot in sinergijski heterozigot (*angl.* synergistic). V prvem primeru posameznik od vsakega od staršev podeduje spremenjen alel znotraj istega gena (11), medtem ko gre v drugem primeru za heterozigotnost v različnih genih, ki se skupaj lahko izrazijo v različni stopnji hiperbilirubinemije (92). Tako je Zangen s sodelavci opisal primer fatalnega kernikterusa pri novorojeni deklici, ki je bila heterozigot za G6PD mediteransko mutacijo in varianto *UGT1A1*28* Gilbertovega sindroma (93).

Molekularno diagnosticiranje indirektna hiperbilirubinemije

Molekularno diagnosticiranje genetskih bolezni je bilo v preteklosti s sekvenciranjem po Sangerju omejeno na sekvenciranje najverjetnejšega mutiranega gena ali na predhodno znane družinske mutacije (38). Tako je pri večini novorojenčkov z dokumentirano ekstremno (CSB 427 $\mu\text{mol/l}$ ali več) ali nevarno visoko (*angl.* hazardous) hiperbilirubinemijo (CSB 512 $\mu\text{mol/l}$) in kernikterusom etiologija pogosto ostala nepojasnjena (6,21,22). Johnson s sodelavci je v pilotnem registru kernikterusa v Združenih državah Amerike (*angl.* US Pilot Kernicterus Registry) ugotovil, da je idiopatskih primerov ekstremne ali nevarno visoke hiperbilirubinemije kar 43 % (22).

Z razmahom in dostopnostjo je NGS postalo pomembna metoda v diagnostičnem algoritmu opisanih vzokov indirektna hiperbilirubinemije (37,38). Tehnologija NGS omogoča sekvenciranje celotnega genoma (*angl.* whole genome sequencing, WGS) in sekvenciranje celotnega eksoma (*angl.* whole exome sequencing, WES) ali pa so vzročni geni zbrani v panele, pri čemer število v panelih zajetih genov v različnih raziskavah variira od 28 do 70 (37,38,94). V genetskem laboratoriju Pediatrične klinike pri diagnosticiranju neonatalne indirektna hiperbilirubi-

nemije uporabljamo metodo sekvenciranja naslednje generacije, s katero sekvenciramo celotni eksom. Ob ekstremno visoki zgodnji zlatenici predlagamo najprej določitev genetike na Gilbertov sindrom, v primeru negativnega rezultata pa se odločimo za NGS panel za nekonjugirane hiperbilirubinemije (Slika 1).

Zaključek

Čeprav je nekonjugirana hiperbilirubinemija (NH) v novorojenčkovem obdobju pogosta, so primeri ekstremne in nevarno visoke NH ter posledično bilirubinske encefalopatije redki. V omenjenih primerih se pogosto zgodi, da etiologija NH ostane nepojasnjena, zato bo pri diagnosticiranju, zdravljenju in predvsem preprečevanju NH v prihodnosti pomembno vlogo igralo genetsko diagnosticiranje.

Literatura

- Holtrop PC, Maisels MJ. Hyperbilirubinemia in Intensive Care of the Fetus and Neonate. Philadelphia, PA: Mosby-Year Book, 1996; 888–98.
- McGillivray A, Evans N. Severe neonatal jaundice: is it a rare event in Australia? J Paediatr Child Health 2012; 48(9): 801–7.
- Furlan D, Ilijaš Trofenik A, Ostanek B, Flec Z, Bratanič B. Patološka zlatenica donošenih novorojenčkov in Gilbertov sindrom. Zdrav Vestn 2011; 80: 188–93.
- Furlan BJ, Kliegman RM. Digestive System Disorders: Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman RE, Klienman RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 588–99.
- Lee Ng V, Balisteri W. Manifestations of liver disease. In: Behrman RE, Klienman RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 1308–25.
- Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. Pediatr Res 2016; 79(3): 378–86.
- Maisels MJ. Neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus – not gone but sometimes forgotten. Early Hum Dev 1996; 85: 727–32.
- Manning D, Todd P, Maxwell M, Platt MJ. Prospective surveillance study of severe hyperbilirubinaemia in the newborn in the UK and Ireland. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2007; 92: F342–6.
- Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. Pediatr Neurol 2003; 29: 410–21.
- American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of

gestation. Pediatrics 2004; 114: 297–316.

- Watchko JF. The contribution of genetic factors to hyperbilirubinemia and kernicterus risk in neonates: a targeted update. Pediatr Med 2021; 4: 17.
- Watchko JF, Lin Z, Clark RH, et al. Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. Pediatrics 2009; 124: e868–77.
- Kaplan M, Hammerman C, Maisels MJ. Bilirubin genetics for the nongeneticist: hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation. Pediatrics 2003; 111: 886–93.
- Kaplan M, Hammerman C. Bilirubin and the genome: the hereditary basis of unconjugated neonatal hyperbilirubinemia. Current Pharmacogenomics 2005; 3: 21–42.
- Watchko JF, Lin Z. Exploring the genetic architecture of neonatal hyperbilirubinemia. Semin Fetal Neonatal Med 2010; 15: 169–75.
- Maisels MJ, Gifford K, Antle CE, et al. Jaundice in the healthy newborn infant: a new approach to an old problem. Pediatrics 1988; 81: 505–11.
- Maisels MJ, Kring E. Length of stay, jaundice and hospital readmission. Pediatrics 1998; 101: 995–8.
- Žaja O, Tiljak MK, Stefanovic M, et al. Correlation of UGT1A1 TATA-box polymorphism in breastfed newborns – early presentation of Gilbert's syndrome. J Matern Fetal Neonatal Med 2014; 27: 844–50.
- Abdel Fattah M, Ghany EA, Adel A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and red cell pyruvate kinase deficiency in neonatal jaundice cases in Egypt. Pediatr Hematol Oncol 2010; 27: 262–71.
- Adekunle-Ojo AO, Smitherman HF, Parker R, et al. Managing well-appearing neonates with hyperbilirubinemia in the emergency department observation unit. Pediatr Emerg Care 2010; 26: 343–48.
- Bhutani VK, Johnson LH, Maisels MJ, et al. Kernicterus: epidemiologic strategies for its prevention through systems-based approaches. J Perinatol 2004; 24: 650–62.
- Johnson L, Bhutani VK, Karp K, et al. Clinical report from the Pilot US Kernicterus Registry (1992 to 2004). J Perinatol 2009; 29: S25–S45.
- Gamaleldin R, Iskander I, Seoud I, et al. An evaluation of risk factors for neurotoxicity in newborns with severe neonatal hyperbilirubinemia. Pediatrics 2011; 128: e925–31.
- Donneborg ML, Hansen BM, Vandborg PK, et al. Extreme neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus spectrum disorder in Denmark during the years 2000–2015. J Perinatol 2020; 40: 194–202.
- Du L, Ma X. International Perspectives: Hyperbilirubinemia and Kernicterus in Neonates in China. NeoReviews 2012; 13: e141.
- Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and severe neonatal hyperbilirubinemia: a complexity of interactions between genes and environment. Semin Fetal Neonatal Med 2010; 15: 148–56.
- Preisig D, Bircher J, Preisig R. Positive diagnosis of Gilbert syndrome. Retrospective analysis of 59 cases with special reference to the nicotinic acid test. Schweiz Med Wochenschr 1982; 112: 1122–9.
- Sieg A, Arab L, Schlierf G, et al. Prevalence of Gilbert's syndrome in Germany. Dtsch Med Wochenschr 1987; 112: 1206–8.
- Sun L, Li M, Zhang L, Teng X, et al. Differences in UGT1A1 gene mutations and pathologic liver changes between Chinese patients with Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. Medicine (Baltimore) 2017; 96: e8620.
- Mi XX, Yan J, Ma XJ, et al. Analysis of the UGT1A1 genotype in hyperbilirubinemia patients: differences in

- allele frequency and distribution. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 6272174.
31. Cannon C, Daoud MJ, O'Day TL, et al. Sex-specific regional brain bilirubin content in hyperbilirubinemic Gunn rat pups. *Biol Neonate* 2006; 90: 40–5.
32. Linn S, Schoenbaum SC, Monson RR, Rosner B, Stubblefield PG, Ryan KJ. Epidemiology of neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 1985; 75: 770–4.
33. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 103: 1224–7.
34. Fischer AF, Nakamura H, Uetani Y, Vreman HJ, Stevenson DK. Comparison of bilirubin production in Japanese and Caucasian infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 7: 27–9.
35. Valaes T, Karaklis A, Stravarakakis D, Bavela-Stravarakakis K, Perakis A, Doxiadis SA. Incidence and mechanism of neonatal jaundice related to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1969; 3: 448–55.
36. Plotz RD. Familial occurrence of hemolytic disease of the newborn due to AO blood group incompatibility. *Hum Pathol* 1985; 16: 113–6.
37. Agarwal AM, Nussenzweig RH, Reading NS, Patel JL, Sangle N, Salama ME, Prchal JT, Perkins SL, Yaish HM, Christensen RD. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 2016; 174(5): 806–14.
38. Retz A, Clayton AL, Christensen RD, Agarwal AM. Molecular diagnostic update in hereditary hemolytic anemia and neonatal hyperbilirubinemia. *International Journal of Laboratory Hematology* 2019; 41(S1): 95–101.
39. Peters LL, Lux SE. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin Hematol* 1993; 30(2): 85–118.
40. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2013; 27(4): 167–78.
41. Miraglia del Giudice E, Nobili B, Francese M, et al. Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2001; 112(1): 42–47.
42. Wilmutte R, Marechal J, Delaunay J. Mutation at position -12 of intron 45 (c->t) plays a prevalent role in the partial skipping of exon 46 from the transcript of allele alphaLELY in erythroid cells. *Br J Haematol* 1999; 104(4): 855–9.
43. Wilmutte R, Harper SL, Ursitti JA, Marechal J, Delaunay J, Speicher DW. The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid alpha-spectrin and heterodimer formation. *Blood* 1997; 90(10): 4188–96.
44. Randon J, Boulanger L, Marechal J, Garbarz M, Vallier A, Ribeiro L, Tamagnini G, Dherym D, Delaunay J. A variant of spectrin low-expression allele alpha LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *British Journal of Haematology* 1994; 88: 534–40.
45. Wichterle H, Hanspal M, Palek J, Jarolim P. Combination of two mutant alpha spectrin alleles underlies a severe spherocytic hemolytic anemia. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 2300–7.
46. Albuissou J, Murthy SE, Bandell M, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Commun* 2013; 4: 1884.
47. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood* 2013; 121(19): 3925–35.
48. Glogowska E, Gallagher PG. Disorders of erythrocyte volume homeostasis. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(Suppl 1): 85–91.
49. Prchal JT, Gregg XT. Red cell enzymes. *Hematology American Society Hematology Education Program* 2005; 1: 19–23.
50. Morioka I, Morikawa S, Yusoff S, Harahap I, Nishimura N, Yokoyama N, Matsuo M, Rostenberg H, Nishio H. Genetic disorders associated with neonatal jaundice. *Eastern Journal of Medicine* 2010; 15: 155–62.
51. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 371: 64–74.
52. Luzzatto L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 1979; 54: 961–76.
53. Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J* 1995; 14: 5209–15.
54. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2012; 48(3): 154–65.
55. Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A. Biochemical mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(4): 1979–83.
56. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1277–82.
57. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21: 267–83.
58. Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammerman C, Levy-Lahad E, Renbaum P, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygotes. *Pediatrics* 1999; 104: 68–74.
59. Fairbanks VF, Fernandez MN. The identification of metabolic errors associated with hemolytic anemia. *JAMA* 1969; 208: 316–20.
60. Kaplan M, Vreman HJ, Hammerman C, Schimmel MS, Abrahamov A, Stevenson DK. Favism by proxy in nursing glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient neonates. *J Perinatol* 1998; 18: 477–9.
61. Mentzer WC, Collier E. Hydrops fetalis associated with erythrocyte G-6-PD deficiency and maternal ingestion of fava beans and ascorbic acid. *J Pediatr* 1975; 86: 565–7.
62. Slusher TM, Vreman HJ, McLaren DW, Lewison LJ, Brown A, Stevenson DK. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and carboxyhemoglobin concentrations associated with bilirubin-related morbidity and death in Nigerian infants. *J Pediatr* 1995; 126: 102–8.
63. Necheles TF, Rai US, Valaes T. The role of haemolysis in neonatal hyperbilirubinemia as reflected in carboxyhaemoglobin levels. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65: 361–7.
64. Kaplan M, Vreman HJ, Hammerman C, Leiter C, Abramov A, Stevenson DK. Contribution of haemolysis to jaundice in Sephardic Jewish glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates. *Br J Haematol* 1996; 93: 822–7.
65. Canu G, De Bonis M, Minucci A, Capoluongo E. Red blood cell PK deficiency: an update of PKLR gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis* 2016; 57: 100–9.
66. Grace RF, Zanella A, Neufeld EJ, et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am J Hematol* 2015; 90(9): 825–30.
67. Weatherall DJ. Thalassemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 625–31.
68. Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de Pediatria* 2008; 40–51.
69. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 704–12.
70. Steiner LA, Gallagher PG. Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin Perinatol* 2007; 31: 254–61.
71. Metreau JM, Dhumeaux D, Gisselbrecht C, Preaux AM, Berthelot P. Constitutional unconjugated hyperbilirubinemia. *Lancet* 1977; 1: 1319.
72. Muslu N, Dogruer ZN, Eskandari G, Atici A, Kul S, Atik U. Are glutathione S-transferase gene polymorphisms linked to neonatal jaundice? *Eur J Pediatr* 2008; 167: 57–61.
73. Canu G, Minucci A, Zuppi C, Capoluongo E, Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50: 273–80.
74. Sugatani J, Kojima H, Ueda A, et al. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* 2001; 33: 1232–8.
75. Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *J Clin Invest* 1992; 90: 150–5.
76. Gantla S, Bakker CT, Deocharan B, et al. Splice-site mutations: a novel genetic mechanism of Crigler-Najjar syndrome type I. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 585–92.
77. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 16: 297–306.
78. Blaschke TF, Berk PD, Scharschmidt BF, Guyther JR, Vergalla JM, Waggoner JG. Crigler-Najjar syndrome: an unusual course with development of neurologic damage at age eighteen. *Pediatr Res* 1974; 8: 573–90.
79. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 1969; 47: 395–409.
80. Van der Veere CN, Sinaasappel M, McDonagh AF, et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type I: report of a world registry. *Hepatology* 1996; 24: 311–5.
81. 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.
82. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1171–5.
83. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003; 38: 107–17.
84. Long J, Zhang S, Fang X, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia with uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms: Meta-analysis. *Pediatr Int* 2011; 53: 530–40.
85. Yu Z, Zhu K, Wang L, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia with UGT1A1 gene polymorphisms: A meta-analysis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 3104–14.
86. Mehrad-Majd H, Haerian MS, Akhtari J, et al. Effects of Gly71Arg mutation in UGT1A1 gene on neonatal hyperbilirubinemia: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019; 32: 1575–85.

87. Watchko JF, Lin Z. Genetics of Neonatal Jaundice. In: Stevenson DK, Maisels MJ, Watchko JF, editors. Care of the Jaundiced Neonate. New York: McGraw Hill; 2012:1–27.
88. Muslu N, Turhan AB, Eskandari G, et al. The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA)₇ polymorphism in newborns and its relation with jaundice. J Trop Pediatr 2007; 53: 64–8.
89. Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, et al. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 12128–32.
90. Sato H, Uchida T, Toyota K, Nakamura T, Tamaiya G, Kanno M, Hashimoto T, Watanabe M, Aoki K, Hayasaka K. Association of neonatal hyperbilirubinemia in breast-fed infants with UGT1A1 or SLCOs polymorphisms.
91. Lin Z, Fontaine J, Watchko JF. Co-expression of gene polymorphisms involved in bilirubin production and metabolism. Pediatrics 2008; 122: e156–e162.
92. Vockley J, Rinaldo P, Bennett MJ, et al. Synergistic heterozygosity: disease resulting from multiple partial defects in one or more metabolic pathways. Mol Genet Metab 2000; 71: 10–8.
93. Zangen S, Kidron D, Gelbart T, et al. Fatal kernicterus in a girl deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase: a paradigm of synergistic heterozygosity. J Pediatr 2009; 154: 616–9.
94. Christensen RD, Nussenzveig RH, Yaish HM, Henry E, Eggert LD, Agarwal AM. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. J Perinatol 2014; 34(8): 616–9.

Katja Jarc Georgiev, dr. med.

Osnovno zdravstvo Gorenjske,
Zdravstveni dom Škofja Loka,
Škofja Loka, Slovenija

Manca Velkavrh, dr. med.

(kontaktna oseba / *contact person*)
Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Pediatrična klinika Ljubljana,
Klinični oddelek za neonatologijo,
Bohoričeva 20, Ljubljana, Slovenija
e-naslov: velkavrhmanca@gmail.com

prispelo / *received*: 6. 7. 2022
sprejeto / *accepted*: 27. 10. 2022

Jarc Georgiev K, Velkavrh M. Genetski vidiki indirektna hiperbilirubinemije pri novorojenčku. Slov Pediatr 2022; 29(3): 135–142. <https://doi.org/10.38031/slovpediatr-2022-3-03>.