

Phát hiện đột biến gen *UGT1A1* gây hội chứng Gilbert ở bệnh nhân Việt Nam

Nguyễn Thị Thanh Hoa¹, Đậu Quang Liêu², Nguyễn Đăng Tôn^{1,3},
Nguyễn Hải Hà^{1,3*}, Trần Ngọc Ánh²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, VAST

Ngày nhận bài 28/12/2020; ngày chuyển phản biện 30/12/2020; ngày nhận phản biện 25/1/2021; ngày chấp nhận đăng 28/1/2021

Tóm tắt:

Hội chứng Gilbert (GS) là một rối loạn chuyển hóa bilirubin di truyền phổ biến nhất, không gây hại, được tìm thấy trong khoảng 3-12% dân số. Các biến thể di truyền của gen mã hóa UDP-glucuronosyltransferase1A1 (*UGT1A1*) có thể làm giảm hoạt động phiên mã của gen và mức độ biểu hiện của enzyme này, từ đó ảnh hưởng đến khả năng liên hợp glucuronide hóa ở gan. Nghiên cứu này nhằm phát hiện biến thể gen *UGT1A1* ở hai nam bệnh nhân là anh em ruột, nhập viện với các biểu hiện vàng da nghi do rối loạn chuyển hóa bilirubin. Mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân (GS1) và anh trai (GS2) được sử dụng để tách chiết ADN tổng số, giải trình tự toàn bộ vùng enhancer, promoter và toàn bộ 5 exon của gen *UGT1A1*. Hai biến thể c.-3279T>G trong mô đun tăng cường đáp ứng phenobarbital của enhancer và A(TA)₇TAA tại hộp TATA trong vùng promoter của gen đã được phát hiện. Đây là các biến thể gen gây bệnh thường gặp trên đối tượng có nồng độ bilirubin máu cao đã công bố trước đây. Kết quả thu được hỗ trợ cho việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, đồng thời đưa ra cảnh báo cho bệnh nhân cần thận trọng với việc sử dụng được phẩm trong tương lai.

Từ khóa: gen *UGT1A1*, hội chứng Gilbert, vàng da.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Hội chứng Gilbert là một rối loạn chuyển hóa bilirubin di truyền phổ biến nhất, không gây hại, được đặc trưng bởi tăng bilirubin máu không liên hợp nhẹ khoảng 1-5 mg/dl, mạn tính trong trường hợp không có bất thường về chức năng gan hoặc tan huyết và được tìm thấy trong khoảng 3-12% dân số [1, 2]. Các biến thể di truyền của gen UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) có thể làm giảm hoạt động phiên mã của gen và nồng độ enzyme *UGT1A1*, ảnh hưởng đến khả năng liên hợp (glucuronide hóa gan), cuối cùng dẫn đến hội chứng Gilbert [2]. Liên quan đến tình trạng bilirubin không liên hợp trong máu cao do di truyền còn có hội chứng Crigler-Najjar type II (CN-2) với tỷ lệ mắc là khoảng 0,6-1 phần triệu dân số [3]. Thông thường, đường giới hạn giữa Gilbert và CN-2 là 6,0 mg/dl (102,6 μM), điều này có thể gây khó khăn trong chẩn đoán phân biệt Gilbert và CN-2 ngay cả sau giai đoạn sơ sinh, bởi vì một số lượng đáng kể bệnh nhân có nồng độ bilirubin huyết thanh trung gian giữa hai hội chứng. Do đó, các tiêu chuẩn chẩn đoán cho chứng tăng bilirubin không liên hợp nên được xem xét lại dựa trên các biểu hiện lâm sàng và phân tích kiểu gen của *UGT1A1* [4].

Gen *UGT1A1* nằm tại vị trí 2q37.1 của nhiễm sắc thể số 2 với chiều dài 13052 bp gồm 5 exon mã hóa cho phân tử

protein chứa 533 acid amin. Cho đến nay, có hơn 130 đột biến đã được xác định trên gen *UGT1A1*, trong đó có khoảng 8 đột biến (6,1%) nằm trên vùng không mã hóa như promoter, enhancer và các intron [5]. Phổ biến nhất là 2 đột biến chèn TA trong hộp TATA [A(TA)₇TAA] (*UGT1A1**28) và thay đổi nucleotide c.211G>A (p.G71R) trong exon 1 (*UGT1A1**6) [6]. Các đột biến gây hội chứng Gilbert làm giảm 30% hoạt động của enzyme *UGT1A1* so với bình thường. Mức độ chuyển hóa bilirubin thấp của enzym cũng có thể làm tăng tác dụng phụ của một số loại thuốc vì nó tham gia đào thải các loại thuốc này khỏi cơ thể. Những loại thuốc này gồm có irinotecan (Camptosar) dùng phổ biến trong liệu pháp hóa trị ung thư và một số chất ức chế protease được sử dụng để điều trị HIV...[7]. Phân tích kiểu gen *UGT1A1* nhằm xác định nguyên nhân gây vàng da do hội chứng Gilbert, nhờ đó hạn chế các xét nghiệm/thủ tục không cần thiết khác như sinh thiết gan, đồng thời là yếu tố quan trọng cho dự đoán và phòng ngừa tác dụng phụ bất lợi ở những người này [8]. Các kỹ thuật đã được sử dụng để xác định đột biến gen gây hội chứng Gilbert bao gồm: giải trình tự gen trực tiếp, biến tính sắc ký lỏng hiệu suất cao, phản ứng chuỗi polymerase (PCR) kết hợp điện di gel polyacrylamide, phân tích đường cong nóng chảy có độ phân giải cao (HRM) và Realtime PCR [2, 9-12]. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenhaiha@igr.ac.vn

Identifying *UGT1A1* gene mutations in Vietnamese patients with Gilbert syndrome

Thi Thanh Hoa Nguyen¹, Quang Lieu Dau²,
Dang Ton Nguyen^{1,3}, Hai Ha Nguyen^{1,3*}, Ngoc Anh Tran²

¹Institute of Genome Research,
Vietnam Academy of Science and Technology

²Hanoi Medical University Hospital

³Graduate University of Science and Technology,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 28 December 2020; accepted 28 January 2021

Abstract:

Gilbert's syndrome (GS) is the most common inherited disorder of bilirubin metabolism, non-lethal, affecting 3-12% of the population. The genetic variants of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) gene might reduce the gene transcription activity and its enzyme expression, which affects the ability to conjugate glucuronidation in the liver. This study aimed to identify genetic variants of *UGT1A1* in two Vietnamese sibling brothers with jaundice manifestations suspected GS. The peripheral blood samples of patients were used to extract genome DNA and sequence the enhancer, promoter, and coding all five exons of *UGT1A1*. Two pathogenic variants c.-3279T>G located in the phenobarbital responsive enhancer module (gtPBREM) and A(TA)₇TAA of the TATA box in the promoter region were identified. They are twice common pathogenic variants that were reported in almost hyperbilirubinemia individuals from different populations. The obtained results improved the accuracy of medical diagnosis and warned the patients to be cautious in case they have to use medical drugs in the future.

Keywords: Gilbert syndrome, jaundice, *UGT1A1* gene.

Classification number: 3.5

để xác định đột biến tại gen *UGT1A1* trên hai nam thanh niên Việt Nam có đặc điểm lâm sàng của hội chứng Gilbert.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Hai nam thanh niên là anh em ruột quê ở Thái Bình, khám tại Khoa Nội tổng hợp, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, chẩn đoán trên lâm sàng và cận lâm sàng hướng tới mắc hội chứng Gilbert. Bệnh nhân được tư vấn xét nghiệm di truyền liên quan đến rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh. Sau khi được giải thích và tư vấn, bệnh nhân đã đồng ý cung cấp mẫu máu để xét nghiệm gen và tình nguyện tham gia nghiên cứu này.

Phân tích gen được tiến hành tại Viện Nghiên cứu hệ gen, thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong năm 2018. Kết quả xét nghiệm gen và đánh giá tương quan với kiểu hình được thực hiện bởi các thành viên tham gia nghiên cứu này.

Tách chiết ADN tổng số

Mẫu máu ngoại vi của các bệnh nhân sau khi lấy vô trùng được đưa vào ống chứa mẫu tiêu chuẩn có EDTA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Bộ sinh phẩm EZNA blood DNA mini (Promega, Hoa Kỳ) được sử dụng để tách chiết ADN tổng số từ máu ngoại vi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN sau khi tách chiết đã được điện di kiểm tra trên gel agarose và đo nồng độ để kiểm tra chất lượng trước khi giữ ở -20°C.

Phản ứng khuếch đại gen (PCR)

Các cặp mồi sử dụng được thiết kế dựa trên trình tự chuẩn của gen *UGT1A1* mang accession number NG_033238.1 trong ngân hàng GenBank. Mồi được tổng hợp tại Công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam). Trình tự mồi và kích thước sản phẩm PCR theo tính toán tương ứng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thông tin về các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm (bp)
gtPBREM_F	CTGGGGATAAACATGGGATG	606
gtPBREM_R	CACCACCACTTCTGGAACCT	
E1F	TCCTTGCTACCTTTGTGGAC	1096
E1R	GCTTGCTCAGCATATATCTGGG	
E2F	ACACGCATGCCTTTAATCA	363
E2R	GCAGGGAAAAGCCAAATCTA	
E3F	CAAACAAGATGCCGGAAGT	450
E3R	TTACTCACATGCCCTTGCAG	
E4F	TGGGGTATCTCAACCCACAT	469
E4R	GAAACAACGCTATTAATGCTACG	
E5F	TTCTTAAGCAGCCATGAGCA	643
E5R	CTGTCTGCACGTCCTCTGAA	

Mỗi phản ứng khuếch đại gen (20 μ l) bao gồm các thành phần: 10 μ l taq 2X master Mix của New England Biology (Anh); 0,5 μ l mỗi loại mồi (10 pM/ μ l); 1 μ l ADN (20 ng/ μ l) và 8 μ l nước. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: 95°C 2 phút; 38 chu kỳ (95°C 30 giây, 58°C hoặc 60°C 30 giây, 68°C 30-60 giây), 68°C 5 phút; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 1,2% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng UV. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit JETTM PCR purification (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thực hiện giải trình tự chuỗi ADN

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với Bigdye Terminator V3.1 từ Applied Biosystems (Hoa Kỳ), theo chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, biến tính trong Hi-Di formamide ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự ADN được đọc bằng máy ABI PRISM 3100 Genetics Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích bằng phần mềm sinh học Bioedit.

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm lâm sàng của hai bệnh nhân

Bệnh nhân thứ nhất là người em trai (GS1), sinh năm 1996, nhập viện với dấu hiệu mệt mỏi, biểu hiện vàng da và mắt nặng hơn thấy rõ. Nồng độ bilirubin toàn phần trong máu đo được là 91,8 μ mol/l, bilirubin gián tiếp là 54,7 μ mol/l. Trước đó, tại cơ sở y tế tuyến tỉnh, bệnh nhân đã được khám và xét nghiệm loại trừ các viêm gan virus bao gồm HBV, HCV, HAV, HEV và một số loại virus gây tổn thương gan hiếm gặp như HSV, EBV cũng như viêm gan tự miễn, viêm gan ứ mật tiên phát..., thậm chí đã được tiến hành sinh thiết gan. Tiếp cận với trường hợp tăng bilirubin, bệnh nhân được tiến hành làm xét nghiệm men gan (GOT/GPT) và photphatase kiềm (ALP). Với trường hợp men gan và ALP bình thường, các nguyên nhân tổn thương gan và đường mật được loại trừ. Mặt khác, bệnh nhân tăng chủ yếu bilirubin gián tiếp, gợi ý các nguyên nhân bao gồm: tan máu, các rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh, và trường hợp ít gặp hơn là bệnh Wilson. Xét nghiệm sâu hơn cho thấy bệnh nhân không có thiếu máu, thậm chí xét nghiệm Coomb trực tiếp và gián tiếp tìm bằng chứng tan máu đều âm tính, xét nghiệm thăm dò bệnh lý Wilson hoàn toàn bình thường. Bước tiếp cận tiếp theo chúng tôi đặt ra là thăm dò các đột biến gen hiếm gặp, gây ra các rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh.

Bệnh nhân thứ 2 (GS2) là anh trai của bệnh nhân GS1,

đến khám với biểu hiện vàng da nhẹ hơn GS1. Chỉ số bilirubin toàn phần và gián tiếp của bệnh nhân là 97,6 và 48,5 μ mol/l. Chỉ số này cũng cao tương đương chỉ số của bệnh nhân GS1. Ngoài ra, các chỉ số sinh hóa và huyết học khác của bệnh nhân đều bình thường. Bệnh nhân âm tính với virus viêm gan B và C. Các xét nghiệm cho 2 bệnh nhân được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xét nghiệm cận lâm sàng của bệnh nhân.

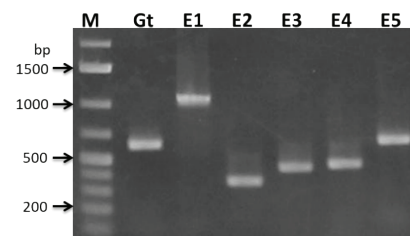
Xét nghiệm	GS1	GS2	Giá trị tham chiếu
GOT (U/l)	17	17	<40
GPT (U/l)	20	19	<41
ALP (U/l)	79	-	25-100
GGT (U/l)	42	32	8-61
Bilirubin toàn phần (μ mol/l)	91,8	97,6	<24
Bilirubin gián tiếp (μ mol/l)	54,7	48,5	<12,7
Hồng cầu (T/l)	5,07	5,38	4-5,9
Hemoglobin (g/l)	157	159	125-175
Ceruloplasmin (μ mol/l)	15	-	5-40
Đông niệu (ug/l)	9,79	-	10-60

Số in đậm trong bảng chỉ các chỉ số tăng bất thường.

Thiết kế các cặp mồi và khuếch đại gen UGT1A1

Một cặp mồi được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng ADN chứa yếu tố tăng cường của gen *UGT1A1* nằm cách vị trí của gen hơn 3000 bp. Năm cặp mồi khác cho phép khuếch đại đặc hiệu 5 exon của gen, trong đó đoạn chứa exon 1 bao gồm cả vùng điều khiển chính của gen.

ADN tổng số được tách từ máu ngoại vi của hai bệnh nhân GS1 và GS2 có nồng độ tương ứng là 35 μ g/ μ l và 37,5 ng/ μ l được sử dụng làm khuôn để nhân gen. Điều kiện PCR đã được xác lập để khuếch đại đặc hiệu vùng enhancer, promoter và toàn bộ 5 exon của gen *UGT1A1* với các cặp mồi đặc hiệu. Các phản ứng PCR cho bằng đặc hiệu tương ứng với các sản phẩm có kích thước từ 363 đến 1096 bp (hình 1). Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch cho các phản ứng giải trình tự tiếp theo.



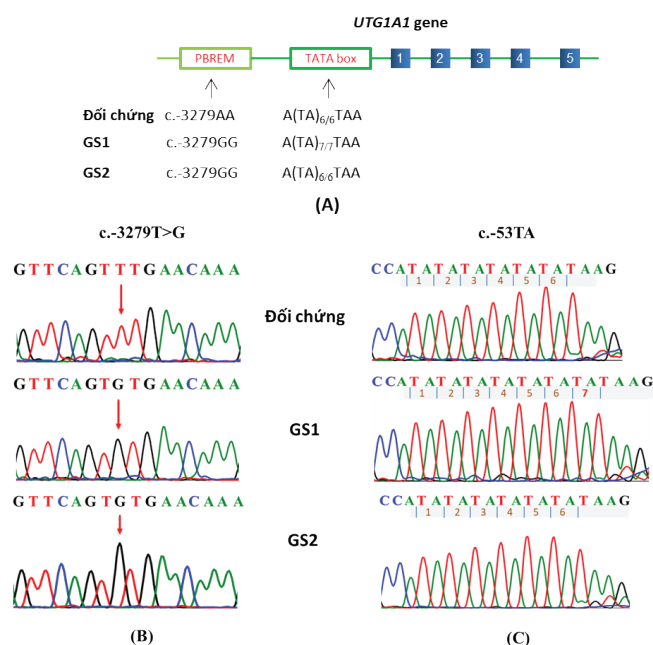
Hình 1. Hình ảnh khuếch đại các đoạn gen UGT1A1 bằng PCR.

M: thang marker chuẩn (1 kb plus); Gt: vùng enhancer chứa mô đun tăng cường đáp ứng phenobarbital; E1: vùng promoter và exon 1; E2-E5: các exon từ 2 đến 5.

Xác định đột biến gen *UGT1A1* bằng giải trình tự trực tiếp

Toàn bộ vùng enhancer, promoter và 5 exon của gen *UGT1A1* đã được giải trình tự thành công. Trình tự gen thu được của 2 bệnh nhân nghi ngờ mắc GS được so sánh với trình tự chuẩn của gen *UGT1A1* lưu trong ngân hàng gen với mã số NG_033238.1 và trình tự gen người chuẩn (GRCh37/hg19).

Kết quả phân tích cho thấy, cả 2 bệnh nhân GS1 và GS2 đều mang 1 biến thể gen ở dạng đồng hợp tử, tại vị trí c.-3279A>G, nằm trong yếu tố tăng cường enhancer tham gia điều khiển mức độ biểu hiện gen. Biến thể này được định danh là *UGT1A1**60. Ngoài ra, mẫu GS1 còn mang cả biến thể gen A(TA)₇TAA dạng đồng hợp tử tại hộp TATA trong vùng promoter của gen. Biến thể này được định danh là *UGT1A1**28. Ở người mang gen kiểu dại, trình tự hộp TATA thường có 6 cặp nucleotide TA lặp lại liên tiếp, ký hiệu A(TA)₆TAA. Vị trí các biến thể này trên sơ đồ gen và hình ảnh sắc ký đồ giải trình tự gen được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Kết quả giải trình tự trên các mẫu nghiên cứu. (A) Vị trí các biến thể gen phát hiện ở 2 bệnh nhân; PBREM: yếu tố phản ứng thuốc phenobarbital nằm trong vùng enhance; TATA box: vùng điều khiển lõi của gen (promoter); các hộp ký hiệu 1-5: các exon; mũi tên chỉ vị trí của hai biến thể gen phát hiện được. (B, C) Ảnh sắc ký đồ giải trình tự gen vị trí c.-3279 và vùng promoter của gen *UGT1A1*; đối chứng: mẫu của người khỏe mạnh mang gen kiểu dại.

Xác định kiểu gen *UGT1A1* là bước chẩn đoán di truyền hiệu quả, cho phép xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh của các đối tượng nghi mắc hội chứng Gilbert, nhờ đó hạn chế các xét nghiệm không cần thiết khác như sinh

thiết gan, đồng thời là yếu tố quan trọng cho dự đoán và phòng ngừa tác dụng phụ bất lợi ở những người này [13]. Cho đến nay, chưa có công bố nào về việc đánh giá kiểu gen *UGT1A1* cho những bệnh nhân được chẩn đoán trên lâm sàng hướng tới GS ở Việt Nam. Hai biến thể gen phát hiện được trong nghiên cứu này đã được phát hiện phổ biến ở các đối tượng có nồng độ bilirubin máu cao trên thế giới [14, 15]. Đối với các nghiên cứu trên người châu Âu và châu Phi [16], hầu như tất cả các bệnh nhân GS đều mang kiểu gen đồng hợp tử của *UGT1A1**28. Trong khi đó khu vực Đông Á, bao gồm Nhật Bản, Trung Quốc và Hàn Quốc thì kiểu gen *UGT1A1**60 và *UGT1A1**6 (p.G71R) đồng hợp tử và một số đột biến sai nghĩa khác ít gặp hơn như *UGT1A1**7, *UGT1A1**27 là nguyên nhân chủ yếu gây ra GS [17].

Đối với bệnh nhân GS1 mang kiểu gen *UGT1A1**28 cũng cần thận trọng hết sức khi sử dụng một số loại thuốc điều trị bệnh trong tương lai. Một ví dụ điển hình là thuốc điều trị ung thư phổ biến irinotecan. Enzyme *UGT1A1* tham gia chuyển hóa irinotecan thành chất ký hiệu SN-38G tại gan, và cá nhân mang kiểu gen *UGT1A1**28 có nguy cơ cao gặp phản ứng phụ khi sử dụng thuốc trên. Một nghiên cứu đã chỉ ra: khoảng 10% dân số Bắc Mỹ mang kiểu gen *UGT1A1**28 đồng hợp tử và có nguy cơ cao mắc bệnh tiêu chảy và giảm bạch cầu sau khi tiêm irinotecan [18]. Tỷ lệ giảm bạch cầu nặng ở bệnh nhân có kiểu gen *UGT1A1**28 đồng hợp tử cao tới 36% và có liên quan chặt chẽ với tỷ lệ nhập viện cao hơn [19]. Mặt khác, bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử *UGT1A1**28 có khả năng bị giảm bạch cầu trung tính nghiêm trọng gấp 3,5 lần so với các người có kiểu gen kiểu dại [20]. Do đó, bệnh nhân GS1 cần thông báo tình trạng di truyền của mình với bác sỹ trong trường hợp phải sử dụng thuốc này. Nghiên cứu này chưa kiểm tra chính xác kiểu gen *UGT1A1* của bố mẹ 2 bệnh nhân do việc thu mẫu không thể thực hiện được bởi yếu tố khách quan. Tuy vậy, nguồn gốc kiểu gen *UGT1A1**28 và *60 xuất hiện ở 2 bệnh nhân có khả năng cao là do được truyền lại từ cha mẹ của họ.

Kết luận

Đây là báo cáo đầu tiên về chẩn đoán di truyền cho bệnh nhân nghi mắc hội chứng Gilbert tại Việt Nam. Cả hai bệnh nhân đều mang các biến thể gen gây hội chứng rối loạn chuyển hóa bilirubin thể di truyền. Đó là các biến thể c.-3279T>G trong enhancer và A(TA)₇TAA trong vùng promoter của gen *UGT1A1*. Kết quả chẩn đoán gen này giúp bác sỹ khẳng định chính xác nguyên nhân gây hội chứng Gilbert vốn rất khó để phân biệt trên lâm sàng, đồng thời hạn chế các xét nghiệm/thăm dò không cần thiết khác. Ngoài ra, đối với bệnh nhân GS1, chúng tôi cũng đã đưa ra khuyến cáo với bệnh nhân cần thông báo với bác sỹ điều trị

về tình trạng di truyền của mình khi cần sử dụng các thuốc chuyển hóa qua gan trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn các bệnh nhân đã tham gia nghiên cứu này. Chúng tôi cũng cảm ơn sự hỗ trợ của Viện Nghiên cứu hệ gen, VAST và Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Elísio Costa, Emília Vieira, Marcia Martins, Jorge Saraiva, Eugénia Cancela, Miguel Costa, Roswitha Bauerle, Teresa Freitas, João R. Carvalho, Ermelinda Santos-Silva, José Barbot, Rosário dos Santos (2006), "Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert and Crigler-Najjar syndromes", *Blood Cells Mol. Dis.*, **36(1)**, pp.91-97.
- [2] P.J. Bosma, J.R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B.A. Oostra, D. Lindhout, G.N. Tytgat, P.L. Jansen, R.P. Oude Elferink, et al. (1995), "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome", *N. Engl. J. Med.*, **333(18)**, pp.1171-1175.
- [3] P. Berk and A. Wolkoff (2001), "Bilirubin metabolism and the hyperbilirubinemias", *Harrison's Principles of Internal Medicine 15th*, New York: McGraw-Hill, pp.1715-1720.
- [4] Yoshihiro Maruo, Sayuri Nakahara, Takahide Yanagi, Akitaka Nomura, Yu Mimura, Katsuyuki Matsui, Hiroshi Sato, Yoshihiro Takeuchi (2016), "Genotype of *UGT1A1* and phenotype correlation between Crigler-Najjar syndrome type II and Gilbert syndrome", *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **31(2)**, pp.403-408.
- [5] G. Canu, A. Minucci, C. Zuppi, E. Capoluongo (2013), "Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) gene mutation database", *Blood Cells Mol. Dis.*, **50(4)**, pp.273-280.
- [6] W.T. Foulk, H.R. Butt, C.A. Owen, F.F. Whitcomb, H.L. Mason (1959), "Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease): its natural history and related syndromes", *Medicine (Baltimore)*, **38(1)**, pp.25-46.
- [7] I.M. Arias and I.M. London (1957), "Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease", *Science*, **126(3273)**, pp.563-564.
- [8] P.J. O'Dwyer and R.B. Catalano (2006), "Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (*UGT*)1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy", *J. Clin. Oncol.*, **24(28)**, pp.4534-4538.
- [9] N. Marziliano, E. Pelo, B. Minuti, I. Passerini, F. Torricelli, L. Da Prato (2000), "Melting temperature assay for a *UGT1A* gene variant in Gilbert syndrome", *Clin. Chem.*, **46(3)**, pp.423-425.
- [10] J.R. Harraway and P.M. George (2005), "Use of fully denaturing HPLC for *UGT1A1* genotyping in Gilbert syndrome", *Clin. Chem.*, **51(11)**, pp.2183-2185.
- [11] C.S. Huang, G.A. Luo, M.L. Huang, S.C. Yu, S.S. Yang (2000), "Variations of the bilirubin uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene in healthy Taiwanese", *Pharmacogenetics*, **10(6)**, pp.539-544.
- [12] F.L. Wong, M.K. Wang, N.Y. Boo, N.H. Hamidah, B.O. Ainoon (2007), "Rapid detection of the *UGT1A1* single nucleotide polymorphism G211A using real-time PCR with Taqman minor groove binder probes", *J. Clin. Lab. Anal.*, **21(3)**, pp.167-172.
- [13] K.H. Wagner, R.G. Shiels, C.A. Lang, N. Seyed Khoei, A.C. Bulmer (2018), "Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **55(2)**, pp.129-139.
- [14] Yoshihiro Maruo, Carlos D'Addario, Asami Mori, Masaru Iwai, Hiroko Takahashi, Hiroshi Sato, Yoshihiro Takeuchi (2004), "Two linked polymorphic mutations (A(TA)_nTAA and T-3279G) of *UGT1A1* as the principal cause of Gilbert syndrome", *Hum. Genet.*, **115(6)**, pp.525-526.
- [15] Junko Sugatani, Kasumi Yamakawa, Kouichi Yoshinari, Takashi Machida, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori, Satoru Kakizaki, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, Masao Miwa (2002), "Identification of a defect in the *UGT1A1* gene promoter and its association with hyperbilirubinemia", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292(2)**, pp.492-497.
- [16] G. Monaghan, M. Ryan, R. Seddon, R. Hume, B. Burchell (1996), "Genetic variation in bilirubin UPD-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome", *Lancet*, **347(9001)**, pp.578-581.
- [17] Y. Maruo, H. Sato, T. Yamano, Y. Doida, M. Shimada (1998), "Gilbert syndrome caused by a homozygous missense mutation (Tyr486Asp) of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene", *J. Pediatr.*, **132(6)**, pp.1045-1047.
- [18] D. Hall, G. Ybazeta, G. Destro-Bisol, M.L. Petzl-Erler, A. Di Rienzo (1999), "Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates", *Pharmacogenetics*, **9(5)**, pp.591-599.
- [19] M.C. Etienne-Grimaldi, J.C. Boyer, F. Thomas, S. Quaranta, N. Picard, M.A. Lorient, C. Narjoz, D. Poncet, M.C. Gagnieu, C. Ged, F. Broly, V. Le Morvan, R. Bouquié, M.P. Gaub, L. Philibert, F. Ghiringhelli, C. Le Guellec (2015), "*UGT1A1* genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice", *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **29(3)**, pp.219-237.
- [20] G.E. Palomaki, L.A. Bradley, M.P. Douglas, K. Kolor, W.D. Dotson (2009), "Can *UGT1A1* genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? an evidence-based review", *Genet. Med.*, **11(1)**, pp.21-34.