

8. Gennaio

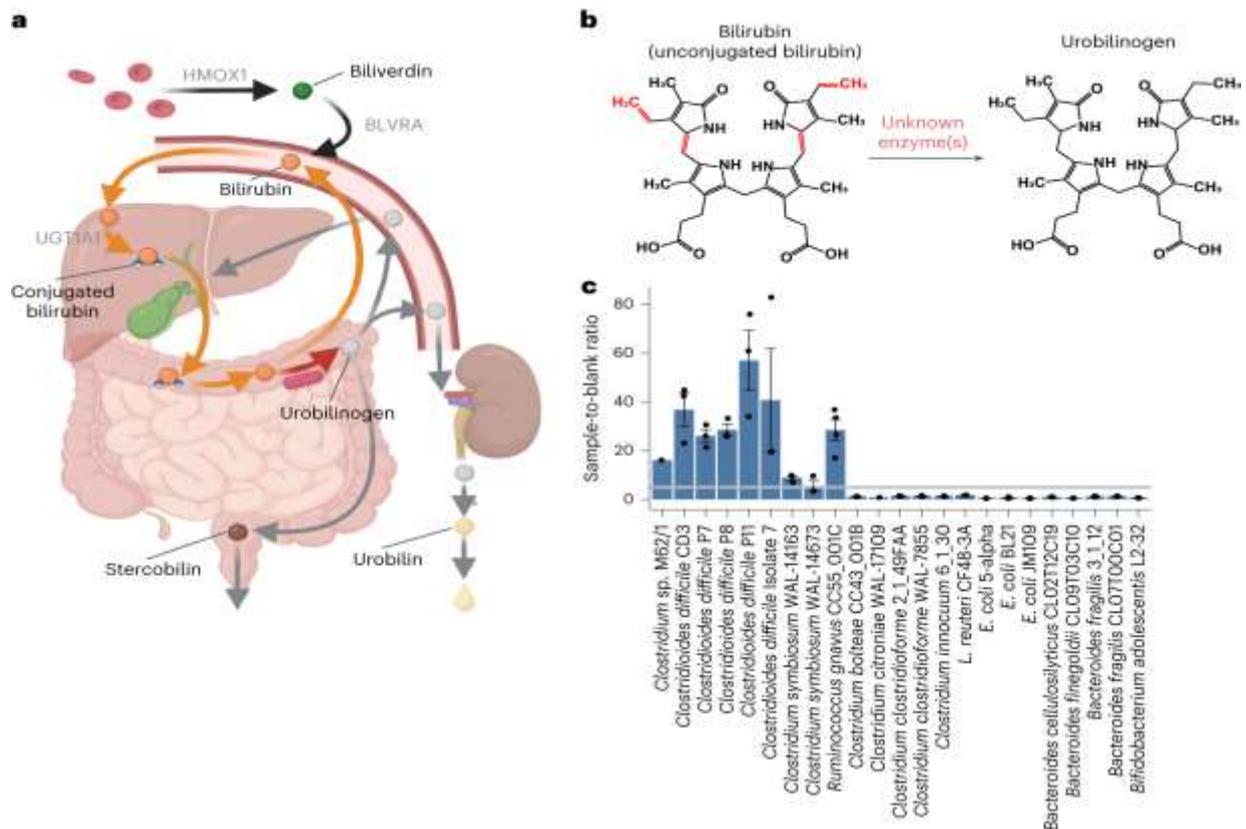
Scoperto l'enzima che rende l'urina gialla

*Il giallo brilla.
 Brilla di gialli diversi;
 gialli cedrini, arancioni e verdi
 sbocciano sulla buccia.
 Wallace Stevens*

La bilirubina, un intermedio del percorso di degradazione dell'eme, svolge un ruolo fondamentale nella fisiologia umana attraverso l'asse intestino-fegato. Insieme ad altre molecole organiche presenti nella bile come il colesterolo e gli acidi biliari, la bilirubina diglucuronide (bilirubina coniugata) viene secreta nell'intestino dove viene escreta o riassorbita.

Quando la bilirubina diglucuronide viene deconiugata dalle beta-glucuronidasi umane o batteriche in bilirubina non coniugata, può essere facilmente riassorbita nella circolazione enteroepatica o ulteriormente metabolizzata tramite reazioni di riduzione da parte di microrganismi intestinali nei metaboliti più escrebili urobilinogeno e stercobilinogeno.

Il riassorbimento della bilirubina aumenta i livelli di bilirubina nel siero, mentre l'escrezione sotto forma di urobilinogeno e stercobilinogeno nelle feci e nelle urine facilita la sua eliminazione, completando il percorso di degradazione dell'eme



a, Rappresentazione illustrata del percorso di degradazione dell'eme. Gli enzimi umani chiave sono etichettati con testo grigio.

b, Diagramma delle strutture della bilirubina e dell'urobilinogeno. I legami ridotti durante la riduzione della bilirubina sono mostrati in rosso.

c, Risultati dello screening del test di fluorescenza di ceppi batterici. Le misurazioni da n = 3 repliche biologiche indipendenti sono mostrate come punti neri. Le barre mostrano i rapporti tra la fluorescenza dei campioni e un corrispondente campione di terreno abiotico con aggiunta di bilirubina. Le barre di errore indicano 1 se sopra e sotto i valori medi.

La linea grigia indica un rapporto pari a 5, al di sopra del quale il campione è stato considerato positivo per la riduzione della bilirubina. *Clostridium* sp. M62/1 e *Clostridium citroniae* WAL-17109 sono rappresentati da singoli punti dati.

La disregolazione della riduzione della bilirubina microbica intestinale influisce sui livelli di bilirubina sierica, che può avere implicazioni sostanziali per la salute. In concentrazioni moderate, la bilirubina funge da importante antiossidante con potenziali benefici per la salute

Osiak W et al. Two Faces of Heme Catabolic Pathway in Newborns: A Potential Role of Bilirubin and Carbon Monoxide in Neonatal Inflammatory Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2020 Aug 18;2020:7140496.

Tuttavia, elevate concentrazioni di bilirubina nel siero possono diventare tossiche, causando ittero e, in casi estremi, kernittero, un tipo di danno neurologico indotto dalla bilirubina

Kapitulnik J et al. An endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. Mol Pharmacol. 2004 Oct;66(4):773-9.

Allo stesso modo, l'urobilinogeno può essere riassorbito ed è stato associato a molteplici malattie, evidenziando il ruolo chiave della riduzione della bilirubina nell'omeostasi di molteplici metaboliti

Kipp ZA et al. Bilirubin Levels Are Negatively Correlated with Adiposity in Obese Men and Women, and Its Catabolized Product, Urobilin, Is Positively Associated with Insulin Resistance. Antioxidants (Basel). 2023 Jan 11;12(1):170..

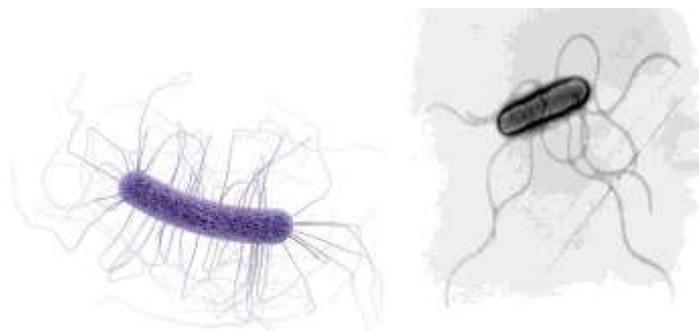
Sebbene l'importanza della circolazione enteroepatica della bilirubina per i livelli di bilirubina sierica sia stata suggerita negli anni '60 e '70, è stata ampiamente sottovalutata fino a quando gli studi nei primi anni 2000 hanno mostrato l'impatto diretto del metabolismo della bilirubina microbica sui livelli di bilirubina sierica nei ratti

Vitek L et al. J. The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels. J Hepatol. 2005 Feb;42(2):238-43.

I microrganismi intestinali sono gli unici responsabili della riduzione della bilirubina a urobilinogeno, utilizzando potenzialmente la molecola come accettore terminale di elettroni nella respirazione anaerobica.

Nonostante il ruolo riconosciuto dei microrganismi intestinali nella riduzione della bilirubina, l'enzima microbico intestinale che riduce la bilirubina a urobilinogeno, di seguito chiamato bilirubina reduttasi, è rimasto da scoprire

Sono stati identificati numerosi batteri che riducono la bilirubina, inclusi ceppi di *Clostridioides difficile*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*, ma gran parte di questo lavoro è stato eseguito prima che il sequenziamento del genoma fosse ampiamente disponibile, rendendo difficile sapere quali ceppi fossero studiati.



Clostridium perfringens e Bacteroides fragilis

Senza la conoscenza del gene che codifica per la bilirubina reduttasi, è difficile trarre conclusioni su come il metabolismo microbico intestinale influenzi l'omeostasi della bilirubina sierica, lasciando un'importante lacuna nella nostra comprensione del percorso di degradazione dell'eme.



Nonostante l'identificazione dell'urobilina come pigmento giallo nelle urine più di 125 anni fa grazie agli studi di Archibald Edward Garrod (vedi allegato), l'enzima responsabile della sua produzione è rimasto un mistero

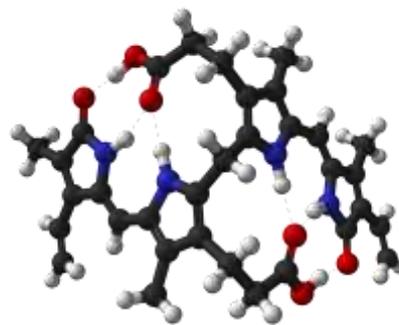
Garrod AE. Note on the Origin of the Yellow Pigment of Urine. J Physiol. 1897 Mar 17;21(2-3):190-1.

Sebbene in precedenza si pensasse che più enzimi fossero coinvolti nella riduzione della bilirubina, il recente report

Il team del Dipartimento di biologia cellulare e genetica molecolare, Università del Maryland coordinato da Brantley Sala nel preprint

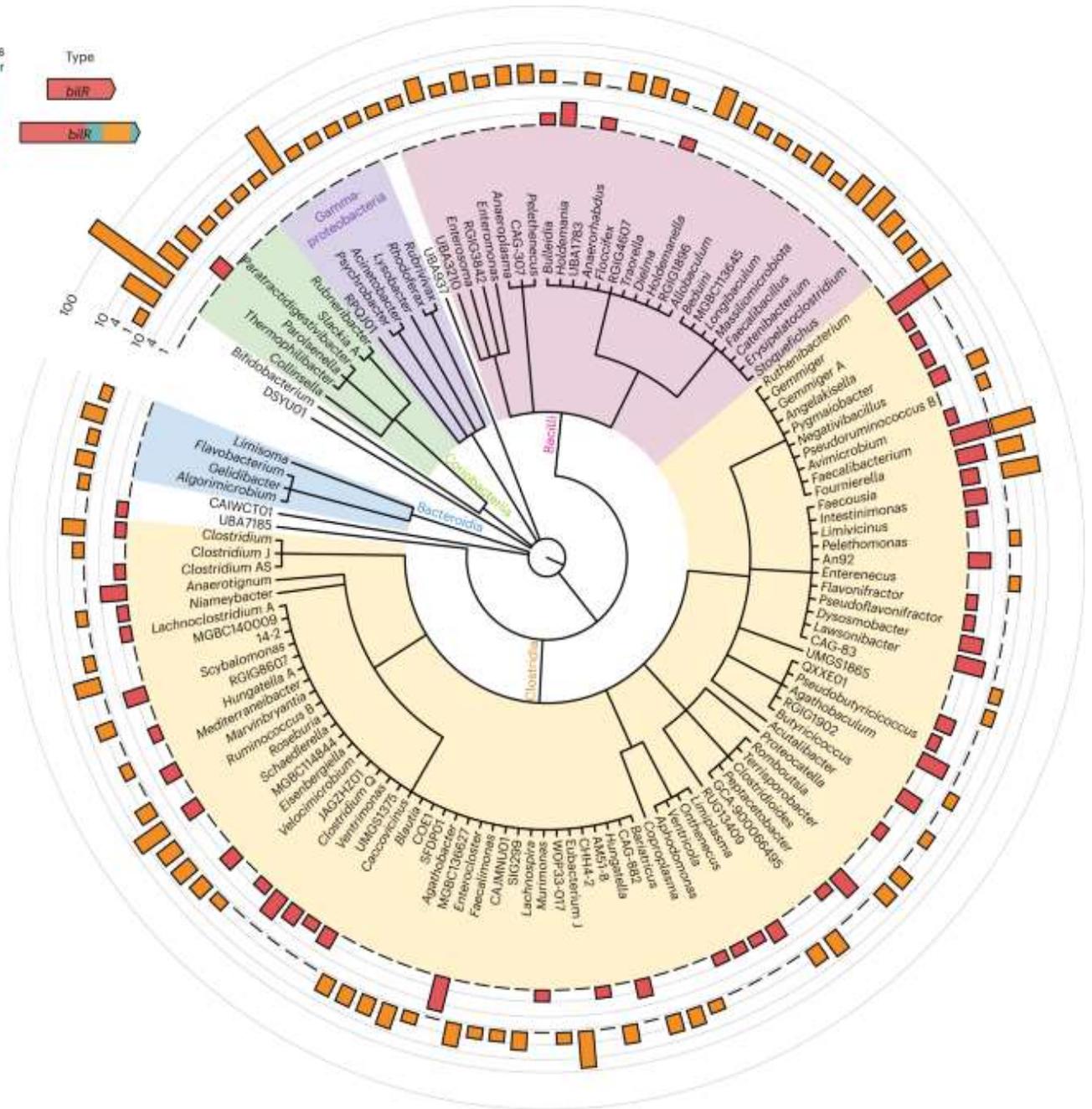
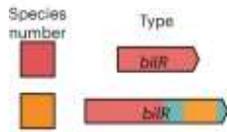
BilR is a gut microbial enzyme that reduces bilirubin to urobilinogen

Ritengono che un singolo enzima la Bilirubina reduttasi BilR esegue la riduzione della bilirubina a urobilinogeno



Bilirubina reduttasi BilR verso Bilurobilinas

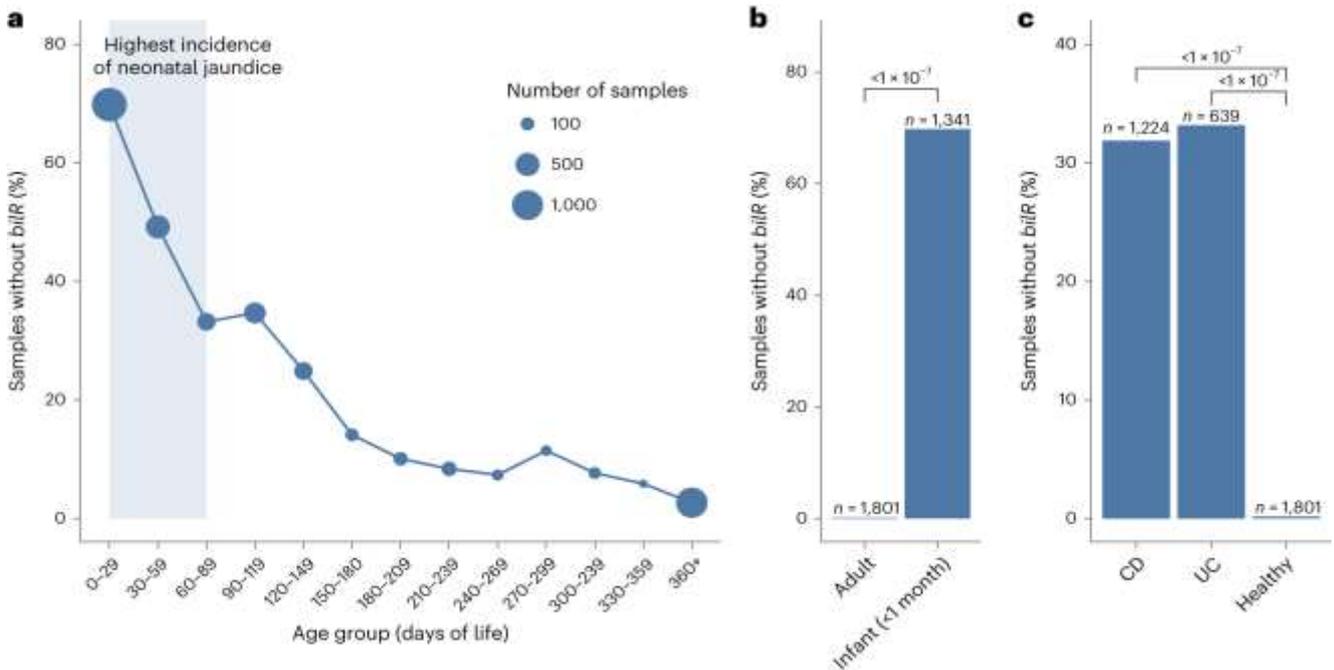
L'identificazione della bilirubina reduttasi ha permesso di profilare la sua abbondanza in 7.960 metagenomi,



Distribuzione tassonomica della bilirubina reduttasi. Il cladogramma mostra le relazioni tra diversi taxa con i geni della bilirubina reduttasi rilevati. Gli anelli esterni mostrano la presenza del gene *bilR* corto (rosso) e del gene *bilR* lungo (arancione).

dimostrando che la riduzione della bilirubina è una caratteristica fondamentale di un microbioma umano adulto sano e che ai neonati spesso manca la bilirubina reduttasi durante il periodo di massima incidenza di ittero neonatale.

Inoltre, è stato dimostrato che la prevalenza della bilirubina reduttasi è diminuita nei pazienti con IBD.



a, Percentuale di metagenomi intestinali infantili privi di *bilR* durante il primo anno di vita. Il periodo di massima suscettibilità all'ittero è indicato da un'area blu ombreggiata sul grafico.

b, Confronto dell'assenza di *bilR* in campioni di adulti sani e neonati nel primo mese di vita. **c**, Confronto della percentuale di campioni senza *bilR* rilevati da adulti sani e adulti con IBD (morbo di Crohn (CD) o colite ulcerosa (UC)).

Il numero di campioni metagenomici inclusi in ciascun set di dati è indicato sopra ciascuna barra. I valori *P* per ciascun confronto mostrano i risultati di un test di proporzioni uguali per determinare se la frazione di campioni senza *bilR* rilevato era diversa tra i gruppi, senza aggiustamento per test multipli.

I risultati dimostrano che la **bilirubina reduttasi** può eseguire la riduzione completa della bilirubina a urobilinogeno e ha il potenziale di agire su molteplici substrati, ponendo questo singolo enzima in un ruolo centrale nell'omeostasi della bilirubina.

L'importanza di questo processo è ulteriormente evidenziata dalla limitata capacità dell'enzima UGT1A1 nel fegato di coniugare la bilirubina sierica, un passaggio limitante la velocità della degradazione dell'eme [30](#).

Chen S et al. Humanized UGT1 Mice, Regulation of UGT1A1, and the Role of the Intestinal Tract in Neonatal Hyperbilirubinemia and Breast Milk-Induced Jaundice. Drug Metab Dispos. 2018 Nov;46(11):1745-1755.

Inoltre, si può desumere (ipotizzare) che la bilirubina coniugata venga facilmente deconiugata dai microrganismi intestinali, e l'attività dei microrganismi sulla bilirubina coniugata ha dimostrato di essere limitata, suggerendo che **la riduzione della bilirubina è il passaggio chiave** che determina il grado in cui i sottoprodotti della degradazione dell'eme vengono eliminati, riassorbito o escreto.

La scoperta della **bilirubina reduttasi** mette in luce una lacuna chiave nella nostra comprensione dei passaggi rilevanti per la salute dell'escrezione dell'eme, tuttavia ci sono ulteriori aspetti del percorso che richiedono chiarimenti. Innanzitutto, mentre è probabile che la bilirubina venga deconiugata dalle beta-glucuronidasi prima di essere ridotta da BilR, sono necessari ulteriori esperimenti con la **bilirubina diglucuronide** per confermare l'ordine del percorso

C'è ancora un ulteriore passaggio nel percorso a valle della riduzione della bilirubina effettuato dal microbioma intestinale dove l'enzima è ancora sconosciuto: la riduzione dell'urobilinogeno a stercobilinogeno. Similmente alla bilirubina, l'urobilinogeno può fungere da accettore terminale di elettroni per i microrganismi che codificano per queste reduttasi, fornendo loro un vantaggio competitivo nell'ambiente anaerobico dell'intestino.

Con la conoscenza delle specie, dei geni e degli enzimi coinvolti nella riduzione della bilirubina, la ricerca futura può ora concentrarsi sulla misura in cui il metabolismo della bilirubina microbica intestinale influisce sull'omeostasi della bilirubina sierica e sul ruolo della riduzione della bilirubina nella salute e nella malattia.

Il dato che la **bilirubina reduttasi** è spesso assente nei neonati supporta l'ipotesi che **l'ittero neonatale** sia esacerbato dall'assenza o dalla scarsa abbondanza di microrganismi che riducono la bilirubina nell'intestino

Molteplici fattori legati sia all'ospite che al microbioma contribuiscono indubbiamente allo sviluppo dell'ittero. Per affrontare questi fattori, saranno necessari nuovi studi di coorte che misurino simultaneamente la bilirubina sierica, gli urobilinoidi fecali e l'abbondanza assoluta di batteri che riducono la bilirubina nei neonati per districare il loro ruolo in questa malattia.



Il team di **Libor Vitek** del **4° Dipartimento di Medicina Interna e Istituto di Biochimica Clinica e Diagnostica di Laboratorio, Università di Praga**, ritiene che oltre l'ittero neonatale, la riduzione della bilirubina da parte dei microrganismi intestinali è importante per la salute generale poiché è stato osservato che le concentrazioni di bilirubina nel siero sono inversamente correlate con l'adiposità e le malattie cardiovascolari

Vitek L et al. The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis. Cerebrovasc Dis. 2006;21(5-6):408-14.

Le concentrazioni di urobilina hanno anche un impatto sulla salute umana, poiché sono correlate positivamente con la resistenza all'insulina e l'insufficienza cardiaca

Kipp ZA et al. Bilirubin Levels Are Negatively Correlated with Adiposity in Obese Men and Women, and Its Catabolized Product, Urobilin, Is Positively Associated with Insulin Resistance. Antioxidants (Basel). 2023 Jan 11;12(1):170.

Ciò evidenzia ulteriormente la complessità e l'importanza del percorso di degradazione dell'eme, confermando il ruolo chiave che la **bilirubina reduttasi** svolge nel determinare l'equilibrio di molteplici metaboliti rilevanti per la salute.

Le differenze osservate tra i metagenomi di individui sani e quelli di **pazienti con IBD** evidenziano la potenziale interruzione del metabolismo della bilirubina nell'IBD. La ridotta prevalenza di batteri

che riducono la bilirubina nei **pazienti con IBD** ci porta a ipotizzare che l'interruzione del metabolismo della bilirubina combinato con l'aumento precedentemente stabilito degli acidi biliari primari non coniugati nei pazienti **con IBD** potrebbe contribuire all'aumentata incidenza di calcoli biliari di **bilirubinato di calcio** che è stata osservata osservato in questi pazienti .

Zhao X et al. The Relationship between Serum Bilirubin and Inflammatory Bowel Disease. Mediators Inflamm. 2019 Apr 15;2019:5256460.

In sintesi:

Il lavoro colma una lacuna di conoscenze di lunga data, fornendo conoscenze fondamentali che serviranno come base per future indagini sull'importanza del metabolismo della bilirubina nella salute umana.



Archibald Edward Garrod

il padre della medicina di precisione



Archibald Garrod è meglio conosciuto per il suo libro ***Inborn Errors of Metabolism (1909)***, in cui sosteneva che quattro malattie - alcaptonuria, albinismo, cistinuria e pentosuria - erano ereditate come tratti mendeliani autosomici recessivi. Questo lavoro preveggente aprì lo studio delle malattie genetiche e consolidò la reputazione di Garrod come fondatore della genetica medica (biochimica e molecolare).

Ma i risultati di Garrod andarono ben oltre lo studio degli errori congeniti del metabolismo. Qui sottolineiamo le sue notevoli intuizioni riguardo al significato della variazione individuale. Nel 1902, Garrod pubblicò "***The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality***", un articolo che servì come base per ***Inborn Errors of Metabolism*** e un secondo libro, ***The Inborn Factors in Disease (1931)***.

In questo articolo, Garrod suggerisce che ***“l'alcaptonuria non è la manifestazione di una malattia ma ha piuttosto la natura di un corso alternativo del metabolismo”***. Questo punto di vista può essere messo in discussione perché l'accumulo di acido omogentisico e dei suoi metaboliti nei tessuti di individui affetti da alcaptonuria spesso provoca osteoartrosi a esordio precoce e può anche causare altri problemi di salute, ma ha portato Garrod a un'intuizione molto importante: ***“il viene spontaneo pensare che questi [alcaptonuria, albinismo e cistinuria] siano semplicemente esempi estremi di variazioni del comportamento chimico che sono probabilmente presenti ovunque in gradi minori e che proprio come non esistono due individui di una specie che siano assolutamente identici nella struttura corporea, nemmeno i loro processi chimici eseguiti esattamente sulla stessa linea”***.



Garrod ha avanzato ulteriormente l'idea dell'individualità chimica in ***The Inborn Factors in Disease***. (Agli inizi del 1900, “fattore” era un termine comunemente usato per

indicare il gene.) Ha discusso dell'individualità chimica nel contesto della teoria dell'evoluzione di Darwin per selezione naturale e considerando la malattia come un *“agente di evoluzione”*.

Dopo aver richiamato l'attenzione su alcune differenze chimiche tra le specie, scrive *“c'è spazio per un'immensa varietà e per differenze non solo tra specie e generi, ma anche tra individui di una specie”.L'individualità chimica fornisce la base per quella che storicamente era stata chiamata “diatesi” – la “disposizione, o predisposizione, di un individuo a una particolare malattia o gruppo di malattie” Ad esempio, la storia naturale della gotta illustra che “la diatesi è considerata latente, ma la sua presenza è rivelata dalle manifestazioni a cui dà origine di volta in volta”*

Sebbene Garrod fosse personalmente interessato ai *“fattori innati”* che predisponavano le persone a particolari malattie, riconosceva l'importanza delle condizioni ambientali nella manifestazione di errori congeniti del metabolismo. In termini di epidemiologia genetica e salute pubblica, potremmo pensare ai fattori genetici e ambientali che contribuiscono al fenotipo della malattia come *“fattori di rischio”*.

Usando una bella metafora, Garrod scrisse: *“I singoli casi di una particolare malattia... non sono esattamente uguali...; somigliano piuttosto ai disegni realizzati sullo stesso modello da singoli membri di una classe di disegno”*.

Garrod ha ulteriormente sottolineato la necessità di comprendere la variazione individuale della malattia in termini evolutivi e di interpretare queste malattie utilizzando intuizioni evoluzionistiche: *“Per quanto riguarda ciò che costituisce l'idoneità a sopravvivere, l'uomo e la Natura non vedono faccia a faccia... L'intero scopo dell'arte medica , sia terapeutico che preventivo, è stato quello di contrastare le leggi della Natura*

Archibald Garrod è stato l'esempio di ciò che, secondo le parole di oggi, chiameremmo un medico-scienziato. È stato attivamente coinvolto negli studi di laboratorio sui suoi pazienti. Capì che molte variazioni individuali non producevano effetti esteriori e potevano essere riconosciute solo mediante analisi chimiche. Tuttavia, ha ripetutamente sottolineato il valore della medicina clinica. Pertanto, scrisse: *“È in reparto piuttosto che in laboratorio che si deve apprezzare l'importanza dei fattori innati”* Come medico sottolineava la necessità di una comprensione dettagliata e globale dei singoli pazienti, perché

“La costituzione di un uomo è la somma di tutte le sue qualità, la sua forma corporea, la struttura dei suoi tessuti, la sua colorazione, l'altezza, il peso, il sangue pressione e temperatura corporea; ...e trucchi di gesto e di azione. Sotto tutti o alcuni di questi aspetti, ogni uomo differisce da tutti i suoi simili, poiché anche i gemelli uniovulari non sono esattamente uguali”

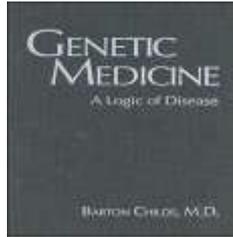
Forse in modo più significativo scrisse che il medico *“si rende conto che ogni [paziente] è un individuo e non semplicemente un membro della razza umana. Il compito del professionista è molto più che applicare le conoscenze fornitegli dai laboratori; lui... fa appello alla sua esperienza per guidarlo su come può meglio aiutare un particolare paziente [a gestire la sua malattia] con il minor danno possibile”*

Questi passaggi potrebbero essere presi come le prime enunciazioni chiare degli obiettivi della medicina di precisione.

Garrod fu uno dei medici più acclamati del suo tempo. Fu eletto Fellow della Royal Society e fu nominato cavaliere. Nel 1920 succedette a William Osler come **Regius Professor di Medicina all'Università di Oxford**. Data la sua posizione di rilievo nella comunità medica, forse sorprende che le sue idee sull'individualità chimica non siano state accettate più rapidamente e più ampiamente. Potrebbero esserci state diverse ragioni per cui il suo lavoro fu a lungo ignorato,

incluso il fatto che la medicina era ancora schiava della teoria dei germi della malattia e quindi i medici si concentravano sui fattori esterni piuttosto che su quelli innati. Infatti, prima che Garrod dimostrasse che l'alcaptonuria era una malattia ereditaria, una teoria diffusa era che fosse il risultato di un'infezione gastrointestinale.

Dai tempi di Garrod, numerosi studi sull'individualità biochimica dimostrazioni elettroforetiche di polimorfismi proteici e, più recentemente, analisi genomiche hanno ampiamente documentato l'ubiquità delle variazioni individuali anche tra le persone sane, con la loro rilevanza clinica saldamente stabilita, ponendo così le basi per il PMI.



In *Genetic Medicine*, Barton Childs mette a confronto le prospettive e l'influenza di Osler e Garrod nella pratica della medicina moderna. Nelle parole di Childs: *“Nessuno negherebbe che Osler sia stato l'eroe della medicina del ventesimo secolo. È probabile che Garrod sarà l'icona del ventunesimo”* Se la medicina di precisione sarà all'altezza delle aspettative dei suoi sostenitori, allora la previsione di Childs potrebbe realizzarsi.