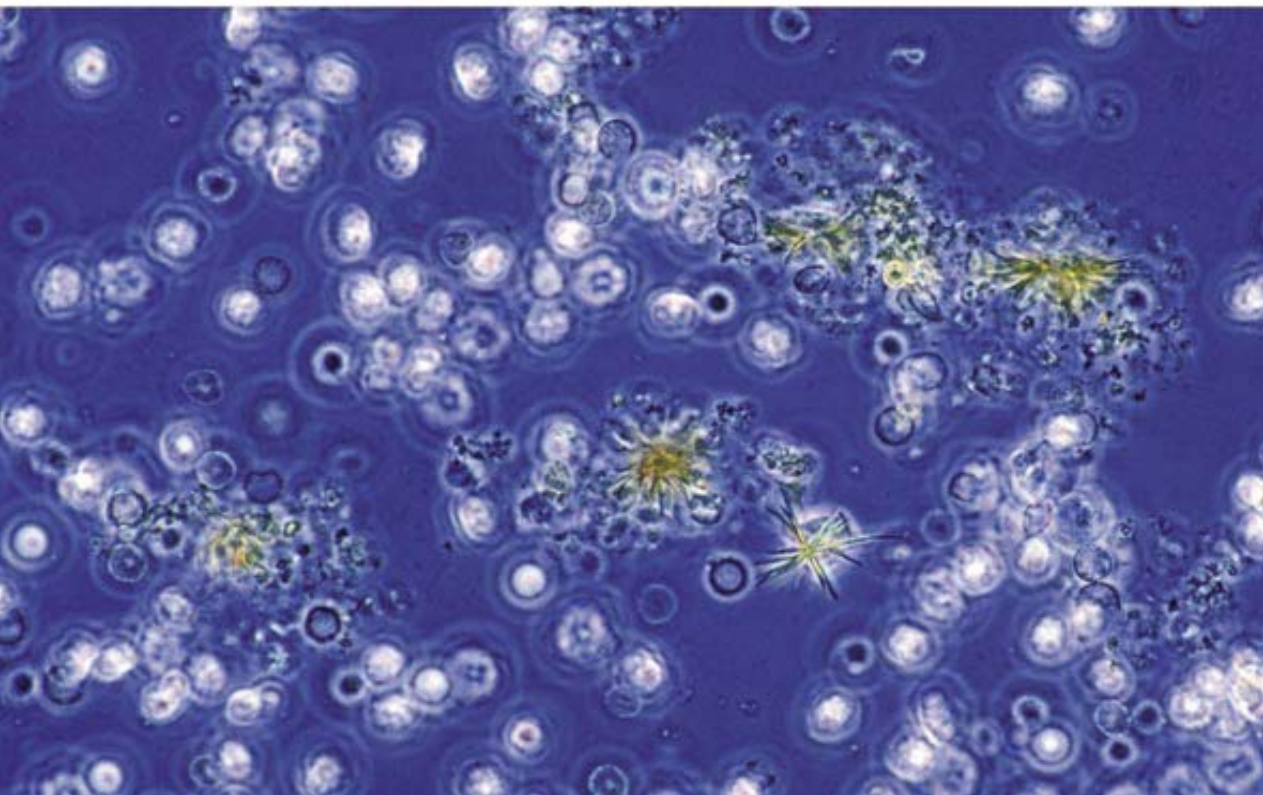
GRADA

Libor Vítek

Bilirubin a interní choroby

Význam pro kliniku a praxi



Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umisťování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.

GRADA®

Copyright © Grada Publishing, a.s.

Copyright © Grada Publishing, a.s.

prof. MUDr. Libor Vítek, Ph.D., MBA

BILIRUBIN A INTERNÍ NEMOCI

VÝZNAM PRO KLINIKU A PRAXI

Recenzovali:
Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Doc. MUDr. et Mgr. Milan Jirsa, CSc.
Prof. MUDr. Zdeněk Mareček, DrSc.

© Grada Publishing, a.s., 2009
Cover Photo © fotobanka Profimedia.CZ s.r.o.
Obrázek na obálce: *Krystaly bilirubinu v moči – světelná mikroskopie (zvětšení 125×), nativní vzorek ve fázovém kontrastu*

Vydala Grada Publishing, a.s.
U Průhonu 22, Praha 7
jako svou xxxx. publikaci
Odpovědný redaktor Mgr. Dita Váchová
Sazba a zlom Antonín Plicka
Počet stran 128
1. vydání, Praha 2009

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a.s.
Husova ulice 1881, Havlíčkův Brod

Napsání této knihy bylo podpořeno grantem MŠMT KONTAKT č. ME849 a Výzkumným záměrem MŠMT č. 0021620807.

Názvy produktů, firem apod. použité v této knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.

ISBN 978-80-247-2351-8 (tištěná verze)
ISBN 978-80-247-6302-6 (elektronická verze ve formátu PDF)
© Grada Publishing, a.s. 2011

Obsah

Použité zkratky VII

Předmluva IX

Úvod XI

TEORIE

1 Metabolizmus bilirubinu 3
1.1 Historické aspekty metabolizmu bilirubinu 3
1.2 Evoluční aspekty metabolizmu hemu 3
1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu 4
1.4 Katabolizmus hemu 7
1.5 Transport bilirubinu v cirkulaci 10
1.6 Vychytávání bilirubinu a jeho transport jaterní buňkou 11
1.7 Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou 12
1.8 Sekrece bilirubinu do žluče 16
1.9 Transport bilirubinu žlučovým systémem 17
1.10 Střevní metabolizmus bilirubinu 17
1.11 Alternativní dráhy katabolizmu bilirubinu 21

2 Analytické aspekty laboratorního stanovení bilirubinu 23
2.1 Diazostanovení bilirubinu 23
2.2 Enzymatické metody 24
2.3 Transkutánní stanovení bilirubinu 24
2.4 Stanovení bilirubinu v moči 24
2.5 Další metody 25

KLINIKA

3 Poruchy metabolizmu bilirubinu 29
3.1 Premikrozomální typ hyperbilirubinemie 30
3.1.1 Nadprodukce bilirubinu 30
3.1.2 Porucha vychytávání bilirubinu v játrech 33
3.1.3 Porucha konjugace bilirubinu v játrech 33
3.2 Postmikrozomální typ hyperbilirubinemie 34
3.3 Smíšený typ hyperbilirubinemie 36
3.4 Specifické nozologické jednotky doprovázené hyperbilirubinemií 36
3.4.1 Familiární hyperbilirubinemie 36
3.4.2 Hyperbilirubinemie vyvolaná hladověním 47
3.4.3 Hyperbilirubinemie v těhotenství 48
3.4.4 Hyperbilirubinemie v novorozeneckém období 52
3.4.5 Pooperační ikterus 64

3.4.6 Poruchy metabolizmu bilirubinu při sepsi 67
3.4.7 Poruchy metabolizmu bilirubinu doprovázející parenterální výživu 71
3.4.8 Pigmentové žlučové kameny 73
3.4.9 Farmakogenetické a farmakogenomické aspekty metabolizmu bilirubinu 76

PERSPEKTIVY

4 Protektivní aspekty katabolické dráhy hemu 81
4.1 Oxidační stres 81
4.2 Úloha HO v obraně před oxidačním stresem 82
4.2.1 Protektivní účinky HO – experimentální důkazy 83
4.2.2 Protektivní účinky HO – klinické důkazy 86
4.3 Biologické účinky CO 88
4.4 Cytoprotektivní účinky biliverdinreduktázy 90
4.5 Úloha bilirubinu 91
4.5.1 Experimentální studie 91
4.5.2 Humánní studie 95
4.5.3 Faktory ovlivňující sérové koncentrace bilirubinu a jejich možné terapeutické ovlivnění 105

Závěr 113

Literatura 115

Rejstřík 119

Použité zkratky

AFLP – acute fatty liver of pregnancy – akutní steatóza jater těhotných
AGEs – advanced glycation end products – produkty pokročilé glykace proteinů
AhR – aryl hydrocarbon receptor – arylový uhlovodíkový receptor
ALP – alkalická fosfatáza
AP-1 – aktivátorový protein 1
ASBT – apical sodium-coupled bile salt transporter – transportér zodpovědný za aktivní transport konjugovaných žlučových kyselin ze střeva
ATP – adenozintrifosfát
BBBP – bilirubin/bromsulfophtalein binding protein – vazebný protein pro bilirubin/bromsulfoftalein
BIND – bilirubin induced neurologic dysfunction – bilirubinem vyvolaná neurologická dysfunkce
BRIC – syndrom benigní rekurentní intrahepatální cholestázy
BSEP – bile salt export pump – exportní pumpa pro žlučové kyseliny
BSP – bromsulfoftalein
CAR – constitutive androstane receptor – konstitutivní androstanový receptor
CDCA – kyselina chenodeoxycholová
cGMP – cyklický guanylátmonofosfát
cMOAT – canalicular multispecific organic anion transporter – multispecifický transportér pro organické aniony
CO – oxid uhelnatý
CORM – carbon monoxide releasing molecule – molekula uvolňující oxid uhelnatý
CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – transportér, jehož defekt je příčinou cystické fibrózy
FABP – fatty acid binding protein – vazebný protein pro mastné kyseliny
FXR – farnesoid X-receptor
GGT – γ-glutamyltransferáza
GR – glukokortikoidní receptor
HDL – lipoprotein o vysoké hustotě
HELLP – syndrom poškození jater v těhotenství, spočívající v hemolýze, zvýšených aktivitách jaterních enzymů a nízké hladině krevních destiček
HIF-1 – hypoxia inducible factor 1 – hypoxií indukovaný faktor 1
HNF1α – hepatocyte nuclear factor 1α – hepatocytární nukleární faktor 1α
HIV – human immunodeficiency virus – virus lidské imunodeficience
HMG-CoA – hydroxymetylglutaryl-koenzym A
HO – hemoxygenáza
HPLC – high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
hsCRP – vysoce senzitivní C-reaktivní protein
HSP – heat-shock protein
IBAT – ileal bile acid transporter – ileální transportér žlučových kyselin
ICHS – ischemická choroba srdeční
ICP – intrahepatální cholestáza těhotných
IL – interleukin

iNOS – induktibilní syntáza oxidu dusnatého
LDL – lipoprotein o nízké denzitě
LRP LDL – receptor-related protein – protein příbuzný LDL-receptoru
MAPK – mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MDR – multidrug resistance protein – protein pro lékovou rezistenci
MRP – multidrug resistance related protein – protein příbuzný proteinu pro lékovou rezistenci
NADP – nikotinadenindinukleotidfosfát
NASH – nealkoholová steatohepatitida
NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease – nealkoholové poškození jater
NF-κB – nukleární faktor κB
NTCP – Na-taurocholate cotransporting peptide – transportní protein konjugovaných žlučových kyselin
OABP – organic anion binding protein – vazebný protein pro organické aniony
OATP – organic anion transport protein – transportní protein organických aniontů
PBREM – phenobarbital response enhancer module – fenobarbitalový enhancerový modul
PI3K – fosfatidylinozitol-3-kináza
PDGF – platelet-derived growth factor B – destičkový růstový faktor B
PFIC – syndrom progresivní familiární intrahepatální cholestázy
PPAR – peroxisome proliferator activating receptor – aktivační receptor peroxizomového proliferátoru
PXR – pregnanový X-receptor
ROS – reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
SLE – systémový lupus erytematodes
TGF-β – transforming growth factor β – transformující růstový faktor β
TLR-4 – toll-like receptor 4
TNF – tumor nekrotizující faktor
VEGF – vascular endothelial growth factor – vaskulární endotelový růstový faktor
VCAM – vascular cell adhesion molecule – adhezní molekula vaskulárních buněk
UDCA – kyselina ursodeoxycholová
UDP – uridindifosfát
UGT1A1 – bilirubin UDP-glukuronozyltransferáza
UGT – UDP-glukuronozyltransferáza

Předmluva

Bilirubin je látka, jejíž historie a poznání jsou známé více než 150 let. Přesto na počátku 21. století zjišťujeme nové informace o významu, působení a vlastnostech bilirubinu – „červené látky ze žluče".

Všeobecně známý je vztah bilirubinu a žloutenky, vztah mezi hemoglobinem, respektive jeho porfyrinovým jádrem, a bilirubinem. Tato kniha však přináší řadu dalších zjištění o hyperbilirubinemiích, vztahu bilirubinu a aterosklerózy.

V teoretické části se seznamujeme s metabolizmem bilirubinu. Na ni navazuje nejrozsáhlejší část monografie věnující se poruchám metabolizmu bilirubinu – hyperbilirubinemiím.

Velice přínosné jsou poslední kapitoly knihy, v nichž se čtenář seznámí s novými poznatky o vlastnostech bilirubinu – jeho schopnostech lapat singletní kyslík při oxidačním stresu. V ochraně před oxidačním stresem se také významně uplatňuje enzym hemoxygenáza-1. Poslední roky přinesly celou řadu významných objevů o struktuře a funkcích tohoto enzymu v lidském organizmu při zdraví i nemoci. Hemoxygenáza-1 má přímý vztah k oxidu uhelnatému – CO, který všichni spojují s toxickými účinky. CO má však také řadu biologických účinků a řadíme jej mezi malé signální molekuly – podobně jako NO.

Objevování a studium bilirubinu má v naší vlasti mnohaletou tradici. Mezi spoluobjevitele biotransformace bilirubinu patří MUDr. Edmund Talafant z Masarykovy univerzity v Brně. Významný představitel oboru biochemie profesor Milan Jirsa z 1. lékařské fakulty UK v Praze prioritně publikoval strukturu konjugátu mezi bilirubinem a taurinem.

Česká věda a medicína má v profesoru Liboru Vítkovi následovníka našich významných osobností a pokračovatele v oblasti studia bilirubinu. Gratuluji mu k velmi zdařilému a čtivému dílu.

Praha 20. března 2009 Tomáš Zima

Úvod

Bilirubin, hlavní žlučový pigment, je konečným produktem katabolizmu hemu v systémové cirkulaci u všech placentárních živočichů. Hem i bilirubin patří do skupiny tetrapyrolových sloučenin, které mají celou řadu jedinečných biologických funkcí u zástupců živočišné i rostlinné říše.

Bilirubin je látka, jejíž produkce, metabolizmus i vylučování jsou v organizmu udržovány v rovnováze. Při narušení této rovnováhy dochází k akumulaci bilirubinu v séru – hovoříme o hyperbilirubinemii, která se klinicky manifestuje žloutenkou. Poruch metabolizmu bilirubinu existuje velmi mnoho, obecně je rozlišujeme na hyperbilirubinemie premikrozomální (nekonjugované) a hyperbilirubinemie postmikrozomální (většinou konjugované). Kombinací obou typů vznikají hyperbilirubinemie smíšené.

Bilirubin má díky své chemické struktuře specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, které vysvětlují celou řadu klinicky známých skutečností. Jako látka nepolární je v cirkulaci vázán na albumin, kdy pouze méně než 0,01 % celkového bilirubinu se v krevním řečišti vyskytuje ve formě nevázané. Hovoříme o volném bilirubinu (Bf, bilirubin free), který je zodpovědný za většinu biologických účinků této látky.

Ačkoli byl bilirubin dlouho vnímán jen jako potenciálně toxická látka s nebezpečím rozvoje toxických účinků zejména v oblasti centrálního nervového systému, data z poslední doby přesvědčivě ukazují, že mírná elevace jeho hladin v séru má v důsledku silných antioxidačních a dalších biologických vlastností bilirubinu pro organizmus protektivní význam. Týká se to především nemocí, v jejichž patogenezi hraje velkou roli oxidační stres. Ochranné účinky nekonjugovaného bilirubinu při jeho mírně zvýšených hladinách byly skutečně popsány pro onemocnění, jako jsou ateroskleróza, některé nádorové choroby či zánětlivá, autoimunitní nebo neurodegenerativní onemocnění. Na druhou stranu se také ukazuje, že příliš nízké koncentrace bilirubinu v krevním séru jsou asociovány s vyšším rizikem vzniku těchto chorob. Důvody těchto asociací nejsou v současnosti zcela jasné; podle teorie reverzní kauzality je pravděpodobné, že u onemocnění sdružených s vysokým oxidačním stresem dochází ke zvýšené konzumpci antioxidačně působícího bilirubinu. Na druhou stranu ovšem není vyloučeno, že za nízké hladiny bilirubinu u jedinců postižených těmito nemocemi mohou alespoň částečně genetické faktory.

Studie z poslední doby také naznačují, že stimulace katabolické dráhy hemu, zejména prostřednictvím hemoxygenázy (HO), klíčového enzymu této biochemické dráhy, může zásadně přispívat k výše zmiňovaným ochranným účinkům bilirubinu. Stimulace této metabolické dráhy vede navíc ke zvýšené produkci oxidu uhelnatého (CO), další donedávna zcela přehlížené biomolekuly, která má velmi podobné účinky jako oxid dusnatý. Není zřejmě daleko doba, kdy budeme moci katabolickou dráhu hemu využívat i terapeuticky, ať už pomocí induktorů HO, donorů CO, terapeutik zvyšujících hladiny bilirubinu nebo suplementací organizmu látkami s podobnou strukturou a vlastnostmi jako bilirubin.

Cílem této publikace je shrnout současné klinické i experimentální znalosti z oblasti katabolizmu hemu a diferenciální diagnostiky hyperbilirubinemií stejně jako nejnovější poznatky o biologickém významu bilirubinu v obraně před oxidačním stresem. Tato kniha je určena jako zdroj informací pro hepatology, gastroenterology, internisty, praktické lékaře, neonatology, porodníky, klinické biochemiky i fyziology. Z objektivních důvodů však nebylo možné pojmout celou problematiku do všech detailů, neboť by

to bylo na úkor přehlednosti pro většinu čtenářů. Zájemce o podrobnější informace týkající se problematiky bilirubinu proto odkazuji na seznam zdrojové literatury na konci knihy.

TEORIE

1 Metabolizmus bilirubinu

1.1 Historické aspekty metabolizmu bilirubinu

První odborný článek o struktuře bilirubinu publikoval již v roce 1847 Rudolf Virchow. Slavný lékař v něm popsal přítomnost krystalů červeného pigmentu (kterému dal název hematoidin) v prokrvácených tkáních; tyto pigmentové krystaly mu nápadně připomínaly krystaly žlučových pigmentů. V roce 1864 Georg Städeler izoloval ze žluče tmavě červený pigment, který poprvé nazval bilirubinem – tímto názvem nahradil do té doby užívaný obecný název gallenfarbstoff, tedy žlučové barvivo (kupodivu termíny žlučová barviva nebo žlučové pigmenty stále užíváme pro různé formy bilirubinu). Slovo bilirubin je odvozeno z latinského názvu *bilis*, tedy žluč, a *ruber*, tedy červený. Städeler byl také první, kdo dal do souvislosti s tímto pigmentem žluté zabarvení kůže a sliznic u pacientů s jaterními chorobami. Také jako první přišel s hypotézou, že bilirubin je pigment vznikající v krevní cirkulaci z hemu. Tato hypotéza byla posléze potvrzena v roce 1874 Tarchanowem, který prokázal, že po intravenózní aplikaci hemu dochází ke zvýšení biliární sekrece bilirubinu. Paul Ehrlich v roce 1883 popsal diazoreakci bilirubinu a v roce 1916 prokázali van den Bergh (po kterém je diazoreakce dodnes pojmenována) spolu s Müllerem dva různé typy bilirubinu u člověka. Prvním typem je bilirubin reagující v diazoreakci přímo; tento typ bilirubinu se fyziologicky vyskytuje pouze ve žluči a odpovídá bisglukuronozyl bilirubinu, tedy bilirubinu konjugovanému s kyselinou glukuronovou. Druhým typem bilirubinu, identifikovaným oběma vědci, byl bilirubin reagující s diazočinidlem pouze za přítomnosti akcelerátoru (alkoholu); tento typ bilirubinu se fyziologicky vyskytuje v krvi a jde tedy o bilirubin nekonjugovaný. V roce 1933 určil Hans Fischer (jediný laureát Nobelovy ceny za výzkum hemu a chlorofylu) strukturu bilirubinu a v roce 1941 jako první provedl jeho syntézu. V roce 1956 objevily tři nezávislé skupiny vědců způsob biotransformace bilirubinu v játrech, kterou je jeho glukuronozylace. Můžeme být velmi hrdí, že vedle slavných vědců Rudiho Schmidta a Barbary Billingové byl třetím objevitelem brněnský Edmund Talafant. Česká věda se pyšní ještě jedním velikánem, a to Milanem Jirsou, který již před objevem konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou jako první publikoval chemickou strukturu konjugátu bilirubinu s taurinem. Ve své práci pak předpověděl, že přímý bilirubin s podobnými vlastnostmi jako taurokonjugát má povahu konjugátu s polární sloučeninou odlišnou od taurinu. V roce 1968 byl Tenhunenem popsán enzym HO a o dva roky později stejnou výzkumnou skupinou i biliverdinreduktáza. V roce 1976 byla na základě rentgenové krystalografie objevena a publikována v časopise *Nature* konformace nekonjugovaného bilirubinu se 6-intramolekulárními vodíkovými můstky. V roce 1987 vyšla v časopise *Science* klíčová práce Rollanda Stockera o antioxidačních vlastnostech bilirubinu (i když některé japonské práce na toto téma se objevily bez povšimnutí již dříve), která znamenala nový impulz ve výzkumu metabolizmu bilirubinu.

1.2 Evoluční aspekty metabolizmu hemu

Hem řadíme do skupiny tetrapyrolových sloučenin, které patří v rostlinné i živočišné říši mezi nejvíce konzervované molekuly. Hem slouží jako prostetická skupina pro

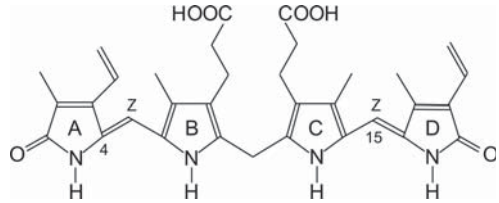
celou řadu hemoproteinů, například pro hemoglobin, myoglobin, cytochrom P-450, katalázu, peroxidázu, tryptofanpyrolázu nebo mitochondriální cytochromy. Kromě hemu a jeho degradačních produktů – bilirubinu a biliverdinu – patří mezi tetrapyrolové sloučeniny i chlorofyl a tzv. biliny (například fytochromobilin nebo fykocyanobiliny), které slouží jako akcesorní světlosběrné pigmenty u vyšších rostlin, sinic a některých řas. Dalším příkladem modifikované tetrapyrolové molekuly je vitamin B_{12}, patřící mezi tzv. corriny.

Mezi rozmanité biologické účinky tetrapyrolů patří zejména:

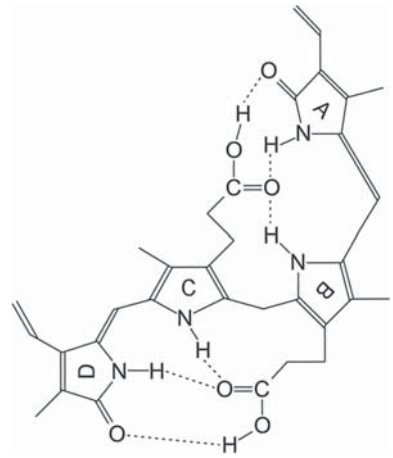
a) **Zachycení světelné energie** u sinic, řas a vyšších rostlin. Fotosyntetizující organizmy obsahují sofistikovaný systém molekul chlorofylu a dalších akcesorních světlosběrných pigmentů, které silně absorbují světelnou energii a generují adenozintrifosfát (ATP) v procesu fotosyntézy.
b) **Tvorba energie** v bakteriálních a eukaryotických buňkách. Hemoproteiny lokalizované v buněčné membráně a v mitochondriích podstupují celou řadu redoxních reakcí, při kterých vzniká ATP. Tento proces oxidativní fosforylace je podobný fotosyntéze a ukazuje na evoluční základy těchto životně důležitých systémů tvorby energie.
c) **Transport a homeostáza kyslíku**, zprostředkované hemoglobiny a myoglobinem u živočichů a leghemoglobinem u bobovitých rostlin.
d) **Antioxidační účinky**, zprostředkované hemoproteiny, peroxidázou a katalázou, stejně jako eliminace reaktivních forem kyslíku lineárními tetrapyroly. Tyto účinky se týkají nejen biliverdinu a bilirubinu, ale také tetrapyrolů vyskytujících se v řasách, známých jako fykocyanobiliny.
e) **Produkce reaktivních forem kyslíku** účinkem NADPH-oxidázy, s významem pro signální transdukci a obranu proti patogenům.
f) **Buněčná signalizace** v eukaryotních buňkách, zprostředkovaná působením HO a biliverdinreduktázy. Produkty reakcí katalyzovaných těmito enzymy, bilirubin, biliverdin a CO, zasahují do regulace mnoha metabolických drah. Oba uvedené enzymy účinkují na buněčné membráně i jako buněčné receptory, a v jádře dokonce jako transkripční faktory.
g) **Pigmentace rostlin** (vlivem chlorofylu), zvířecích tkání (vlivem hemu) nebo ptačích vajec či peří (vlivem různých porfyrinů a biliverdinu). Tato pigmentace se podílí na jejich maskování. Mimochodem jeden zelený list obsahuje až 10^{18} molekul chlorofylu a chlorofyl je tak nejrozšířenějším pigmentem na Zemi.
h) **Asimilace anorganického dusíku a síry** rostlinami prostřednictvím specifických reduktáz obsahujících jako kofaktor sirohem.

1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu

Ačkoli chemie a biochemie jsou většinou lékařů vnímány jako obory obtížné a nemající velký dopad na klinickou medicínu, není to pravda a těsný vztah mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi bilirubinu a jeho chováním v lidském těle to jen dokazuje. Znalost chemické struktury bilirubinu umožňuje pochopit, proč se do moče dostává pouze bilirubin konjugovaný s kyselinou glukuronovou nebo proč funguje fototerapie



Obr. 1 *4Z,15Z-bilirubin IXα*
Konvenční lineární tetrapyrolová struktura přirozeně se vyskytujícího bilirubinu IXα. Molekula je zobrazena jako laktamový tautomer v konfiguraci Z,Z.

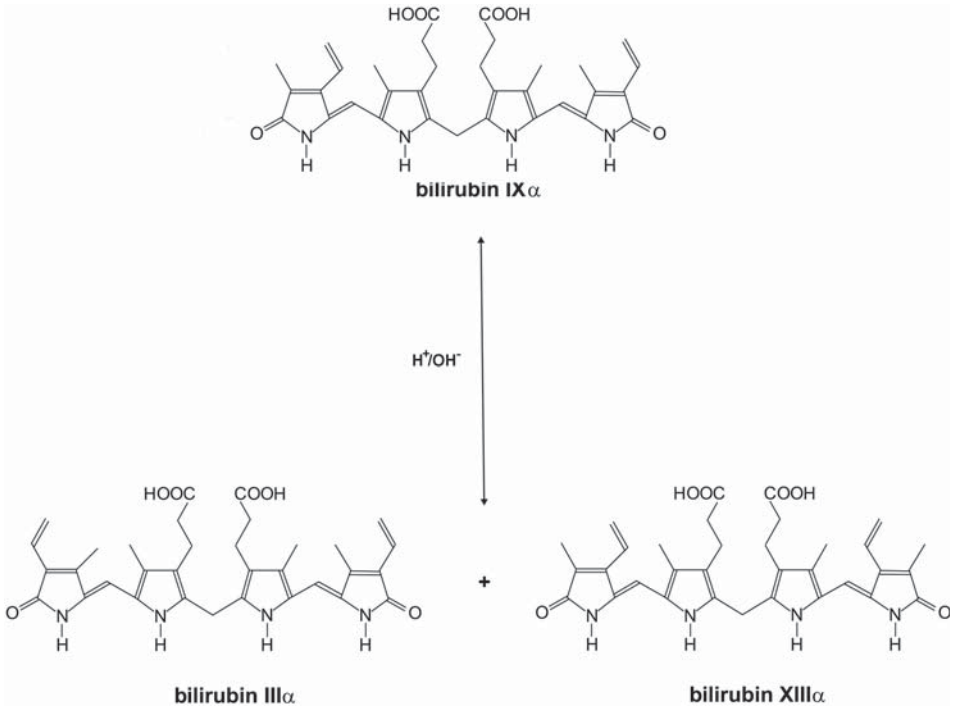


Obr. 2 *Konformace 4Z,15Z-bilirubinu IXα*
Planární zobrazení trojrozměrné konformace molekuly bilirubinu s vodíkovými můstky (…) mezi karboxylovými skupinami postranních řetězců a C = O a NH skupinami postranních pyrolových kruhů protilehlé poloviny molekuly. Tyto vodíkové můstky udržují molekulu nekonjugovaného bilirubinu v rigidní, nepolární, trojrozměrné konformaci.

závažné novorozenecké žloutenky. Z tohoto důvodu si dovolím hlubší exkurz do této problematiky.

Nekonjugovaný bilirubin je lineární tetrapyrolový pigment nepolárního charakteru. Přirozeně se vyskytující bilirubin je označován jako 4Z,15Z-bilirubin IXα (viz obr. 1), což vyjadřuje, že vzniká z izomeru IX protoporfyrinu, který se nachází v hemu a hemoproteinech, a to naštěpením α-methinového můstku porfyrinového makrocyklu, kde stereochemické uspořádání uhlíků v poloze 4 a 15 je v konfiguraci Z.

Tato struktura a konfigurace umožňují vznik vodíkových vazeb mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu C a polárními skupinami na kruhu A a mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu B a polárními skupinami na kruhu D (viz obr. 2). Tyto intramolekulové vodíkové vazby způsobují významné konformační změny, které blokují expozici polárních skupin molekuly vodnímu prostředí; zároveň tvoří rigidní strukturu molekuly. Tato konformace je tudíž základem hydrofobního chování bilirubinu a vysvětluje, proč musí být bilirubin konjugován v játrech s kyselinou glukuronovou, aby mohl být z těla vyloučen.

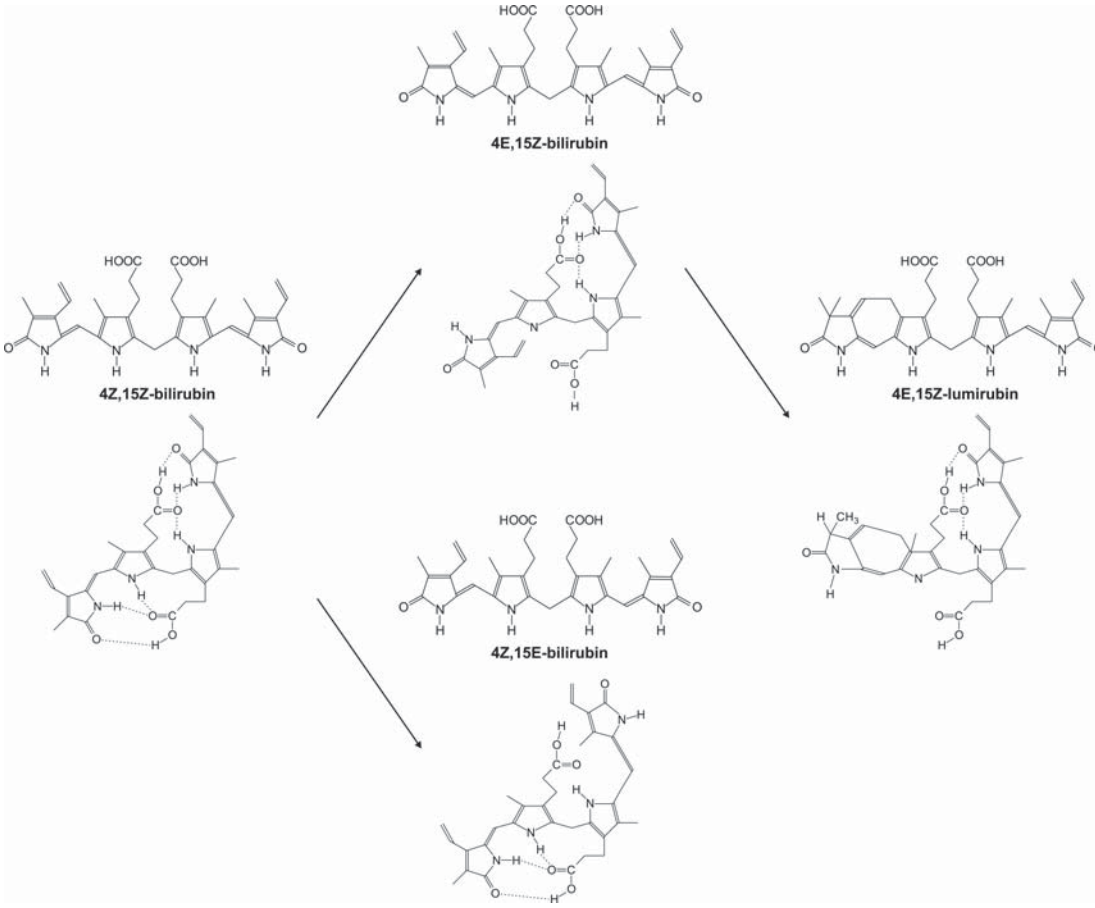


Obr. 3 *Konstituční izomery bilirubinu IIIα, IXα a XIIIα*

Vzhledem k tetrapyrolové struktuře se nekonjugovaný bilirubin může vyskytovat v několika typech izomerů. Podle toho, který methinový můstek je v porfyrinovém kruhu hemu štěpen, rozlišujeme konstituční izomery IXα, IXβ, IXγ a IXδ. Převládajícím izomerem v plazmě je bilirubin IXα. Zbylé izomery, bilirubin IXβ, bilirubin IXγ a bilirubin IXδ, nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky, jsou tedy ve vodě rozpustnější a nevyžadují konjugaci pro vyloučení žlučí. Tyto izomery se vyskytují v dospělém organizmu pouze ve stopových množstvích, u novorozenců je však přítomen ve značné míře i izomer IXβ, který je podstatně snáz vylučován nezralými játry novorozenců do žluče. Dalším typem izomerie bilirubinu jsou konstituční izomery vzniklé spontánním rozštěpením molekuly bilirubinu na dvě poloviny s následnou náhodnou asociací obou polovin za opětovného vzniku tetrapyrolové sloučeniny. Protože molekula bilirubinu je asymetrická, rozeznáváme tři typy takto vzniklých izomerů, a to bilirubin IIIα, IXα a XIIIα (viz obr. 3).

Posledním typem izomerie jsou konfigurační izomery ZZ, EE a jejich kombinace, které se liší konfigurací vazby mezi pyrolovými jádry A a B, respektive C a D (viz obr. 4).

Konfigurace této vazby opět vede ke změně polarity molekuly. Přirozený izomer bilirubinu 4Z,15Z se snadno mění fotoexcitací na ZE/EZ izomery, které přecházejí na stabilní a relativně polární deriváty označované názvy lumirubin, cyklobilirubin nebo fotobilirubin II (viz obr. 4). Tyto produkty jsou vylučovány játry bez nutnosti glukuronozylace, což umožňuje eliminovat bilirubin z krevního oběhu. Tohoto principu se využívá při fototerapii patologické novorozenecké žloutenky nebo těžké hyperbilirubinemie doprovázející vzácný Criglerův-Najjarův syndrom I. typu.

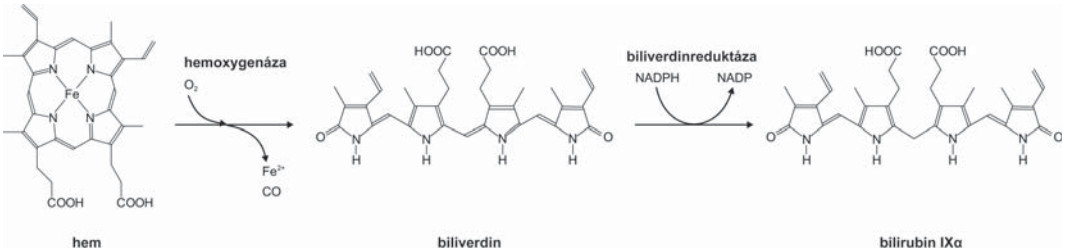


Obr. 4 *Konfigurační izomery bilirubinu*

1.4 Katabolizmus hemu

Produkce bilirubinu dosahuje u dospělého člověka přibližně 7,5 μmol (4,4 mg) na kg tělesné hmotnosti denně, což představuje denní produkci bilirubinu zhruba 450–600 μmol (250–350 mg). Za fyziologických podmínek se přibližně 75–80 % veškerého bilirubinu tvoří z rozpadu hemu ze stárnoucích červených krvinek v mononukleárním fagocytárním systému (viz obr. 5). Životnost červených krvinek je v průměru 120 dnů, oněch výše uvedených 250–350 mg denní produkce bilirubinu odpovídá zhruba 7–10 g katabolizovaného hemoglobinu.

Fyziologicky dochází k rozpadu hemu zejména ve slezině, odkud se produkovaný nekonjugovaný bilirubin dostává portálním řečištěm k játrům. Ovšem při portální hypertenzi značná část portální krve obchází játra a u těchto pacientů můžeme pozorovat i z tohoto důvodu zvýšené hladiny bilirubinu v krevním séru. Jiná situace nastává za podmínek intravaskulární hemolýzy nebo po splenektomii, kdy se v katabolizmu hemu ve zvýšené míře uplatňují Kupfferovy buňky v játrech stejně jako makrofágy kostní dřeně. Při intravaskulární hemolýze se uvolněný hemoglobin váže na sérový protein



Obr. 5 *Katabolická dráha hemu*

haptoglobin a tyto komplexy jsou odstraňovány z cirkulace vazbou na specifický receptor CD163 na Kupfferových buňkách. Při závažnější intravaskulární hemolýze se do cirkulace dostává volný hem, který je vychytáván bílkovinou krevního séra, hemopexinem. Tento komplex je metabolizován jaterními buňkami a makrofágy vybavenými multiligandovým receptorem nazývaným LRP (LDL receptor-related protein, známý také jako CD91).

Zbývajících 20–25 % bilirubinu pochází z odbourávání hemu z prekurzorů červené krevní řady, z nehemoglobinových bílkovin obsahujících hem, jako jsou například myoglobin, kataláza, peroxidáza nebo jaterní cytochromy P-450 a b-5. O významu jaterních cytochromů svědčí fakt, že celých 70 % novotvořeného hemu v játrech je použito jako prostetická skupina těchto biotransformačních enzymů. Podíl jiných hemoproteinů, například myoglobinu, má jen malý význam vzhledem k jejich pomalému metabolickému obratu. Význam tohoto tzv. shuntového bilirubinu narůstá za patologických stavů, například v podmínkách neefektivní erytropoézy nebo při hemolýze (více viz dále).

Jak vyplývá z obrázku 5, hem je cyklický tetrapyrolový porfyrin s centrálně navázaným atomem železa. K jeho degradaci na biliverdin, tmavě zelený pigment, dochází pomocí mikrozomální HO. HO se vyskytuje v organizmu ve dvou izoformách (HO-1 a HO-2). První izoforma, HO-1, patří do skupiny heat-shock proteinů (HSP) a je označována podle své molekulové váhy jako HSP32 (32 kDa). Uplatňuje se zejména v obraně před oxidačním stresem a je indukovatelná celou řadou faktorů vyvolávajících oxidační stres, jako jsou například volné kyslíkové radikály, těžké kovy, bakteriální lipopolysacharid, peroxid vodíku a ultrafialové světlo. HO-1 je indukována také hemoglobinem uvolňovaným při hemolýze, ale i mnoha léky (včetně například kyseliny acetylsalicylové, statinů či imunosupresivních látek), přírodními látkami nebo cytokiny a růstovými faktory produkovanými v lidském těle při různých patologických stavech (viz také kapitola 4.2 *Úloha HO v obraně před oxidačním stresem*).

Druhá izoforma, HO-2, je neindukovatelná izoforma konstitutivně exprimovaná v různých tkáních a orgánech, zejména v centrálním nervovém systému, endotelových buňkách, játrech a ve střevě. Nejvyšší aktivitu HO-2 nacházíme překvapivě ve varlatech. Popsán byl i gen pro třetí izoformu HO, označovanou jako HO-3, jejíž existence je však zpochybňována, neboť se jedná nejspíše o pseudogen, k jehož transkripci v tkáních nedochází.

Co se týká buněčné lokalizace HO, jde o enzym se zjevnou buněčnou kompartmentalizací. Běžně jej nacházíme asociovaný s endoplazmatickým retikulem, HO je však přítomna i v buněčném jádře, mitochondriích, a dokonce na plazmatické membráně. Je zřejmé, že HO nemá pouze enzymovou aktivitu, ale uplatňuje se i jako transkripční

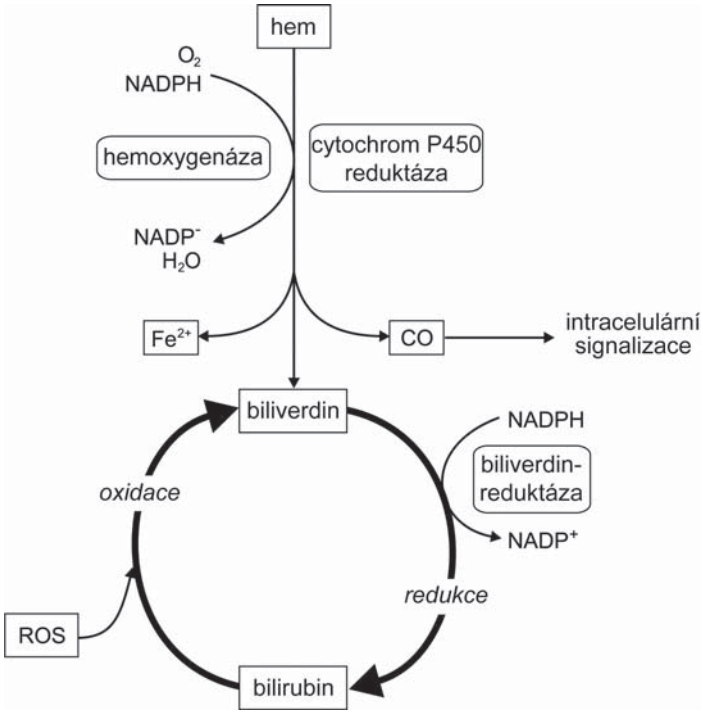
faktor (v buněčném jádře), nebo dokonce signální molekula (na buněčné membráně), což dále podtrhuje ohromný biologický význam tohoto enzymu.

HO katalyzuje oxidativní štěpení α-methinového můstku v molekule hemu za vzniku lineárního tetrapyrolu biliverdinu při uvolnění molekuly CO a atomu dvojmocného železa. Jde o poměrně komplikovanou enzymovou reakci s celou řadou meziproduktů a tato reakce může být farmakologicky modulována. Toho se dokonce využívá (i když jen velmi zřídka) v klinické medicíně při léčbě patologické novorozenecké žloutenky použitím tzv. metaloporfyrinů schopných inhibice HO. Ačkoli HO katalyzuje téměř výhradně štěpení α-methinového můstku hemu, nacházíme v prenatálním a perinatálním období v moči a mekoniu také izomer bilirubinu IXβ, který je značně polárnější a vylučuje se z organizmu bez nutnosti konjugace v játrech.

Následně dochází působením enzymu biliverdinreduktázy k redukci centrálního methinového můstku biliverdinu IXα za vzniku molekuly bilirubinu IXα (viz obr. 5). Biliverdinreduktáza je ubikviterní, převážně cytozolický enzym, který se evolučně objevil již u nejprimitivnějších mikroorganizmů, jakými jsou sinice a vodní řasy. V lidském těle je nejhojněji zastoupena v tkáních s vysokou aktivitou HO, kde okamžitě redukuje vzniklý biliverdin na bilirubin. To také vysvětluje, proč biliverdin nedetekujeme v krevním séru. Biliverdinreduktáza je enzym s několika zcela unikátními funkcemi (více také viz kapitola 4.4 *Cytoprotektivní účinky biliverdinreduktázy*). Má například dvojí pH-optimum a je schopna autofosforylace, čímž zvyšuje svoji katalytickou aktivitu a tedy i produkci bilirubinu za podmínek zvýšeného oxidačního stresu. Biliverdinreduktáza má navíc kinázovou aktivitu, kterou se uplatňuje (podobně jako HO) v buněčné signalizaci, je schopna translokace z cytozolu do buněčného jádra, kde (opět podobně jako HO) působí jako transkripční faktor.

Jak bylo uvedeno, schopnost konverze biliverdinu na bilirubin se evolučně objevila již u sinic, největšího významu však dosáhla až u placentárních živočichů. Na první pohled se jedná o metabolický krok nepříliš výhodný pro organizmus, neboť eliminace bilirubinu z lidského těla je energeticky poměrně náročný proces zatížený rizikem metabolických chyb s potenciálním nebezpečím poškození organizmu. Pro tento evoluční krok však existuje několik vysvětlení. Polární molekula biliverdinu neprostupuje placentární bariéru a u placentárních živočichů by tedy docházelo k akumulaci biliverdinu v těle plodu s možnými toxickými účinky nahromaděného pigmentu. Bilirubin je naproti tomu eliminován z těla plodu přes placentární bariéru prostou difuzí, ale i pomocí specifických aktivních transportních mechanizmů. Nicméně jako mnohem důležitější funkce pro evoluci molekuly bilirubinu se jeví účast v eliminaci volných kyslíkových radikálů v redoxním cyklu zahrnujícím oxidaci bilirubinu na biliverdin s jeho následnou redukcí zpět na bilirubin (viz obr. 6).

Ačkoli se bilirubin vyskytuje v cirkulaci pouze v mikromolárních koncentracích, amplifikace jeho antioxidačních vlastností prostřednictvím uvedeného redoxního cyklu z něj dělá nejúčinnější antioxidačně působící endogenní látku v lidském těle. Existují také hypotézy, že vytvoření takto potentního antioxidačního systému bylo z evolučního pohledu zcela nezbytné, neboť placentární živočichové jsou zvýšeně ohroženi nadprodukcí volných kyslíkových radikálů vytvářených v mitochondriích buněk a tkáních fetoplacentárního systému. Podobnou paralelu můžeme pozorovat například u silně antioxidačně působící kyseliny močové, jejíž koncentrace se u člověka výrazně zvyšuje a jejíž antioxidační účinky by mohly být údajně zodpovědné za dlouhověkost člověka v porovnání s nižšími živočichy.



Obr. 6 *Bilirubin–biliverdinový redoxní cyklus*
ROS = reaktivní formy kyslíku

Podobně jako žlučové pigmenty biliverdin a bilirubin byl i CO, další z produktů HO, dlouho považován pouze za odpadní látku mající potenciálně škodlivé účinky. Intenzivní výzkum v posledních letech však stále více dokazuje biologický význam této plynné molekuly. Koncentrace CO, vznikajícího reakcí HO, je v krvi nepatrná, a CO tudíž nepůsobí toxicky. I při takto nízkých hladinách však hraje důležitou roli při buněčné signalizaci v centrálním nervovém systému, v modulaci cévního tonu, ovlivňuje dokonce buněčnou proliferaci a mnoho nitrobuněčných signalizačních kaskád. Stanovení produkce CO jako markeru katabolizmu hemu lze také využít v diagnostice novorozeneckých hemolytických anemií.

1.5 Transport bilirubinu v cirkulaci

Po degradaci hemu v mononukleárním fagocytárním systému se bilirubin dostává do systémové cirkulace a je transportován do jater. Vzhledem ke své konformaci je nekonjugovaný bilirubin velmi špatně rozpustný ve vodním prostředí. Za normálních okolností je rozpustnost volného nekonjugovaného bilirubinu menší než 1 μmol/l. Tato volná frakce bilirubinu je však fyziologicky extrémně významná, neboť reprezentuje bilirubin, který může být skutečně transportován přes sinusoidální pól hepatocytu. Zhruba 90 % veškerého nekonjugovaného bilirubinu se v cirkulaci váže na hlavní transportní bílkovinu, kterou je albumin. Zbývajících 10 % je v cirkulaci vázáno na