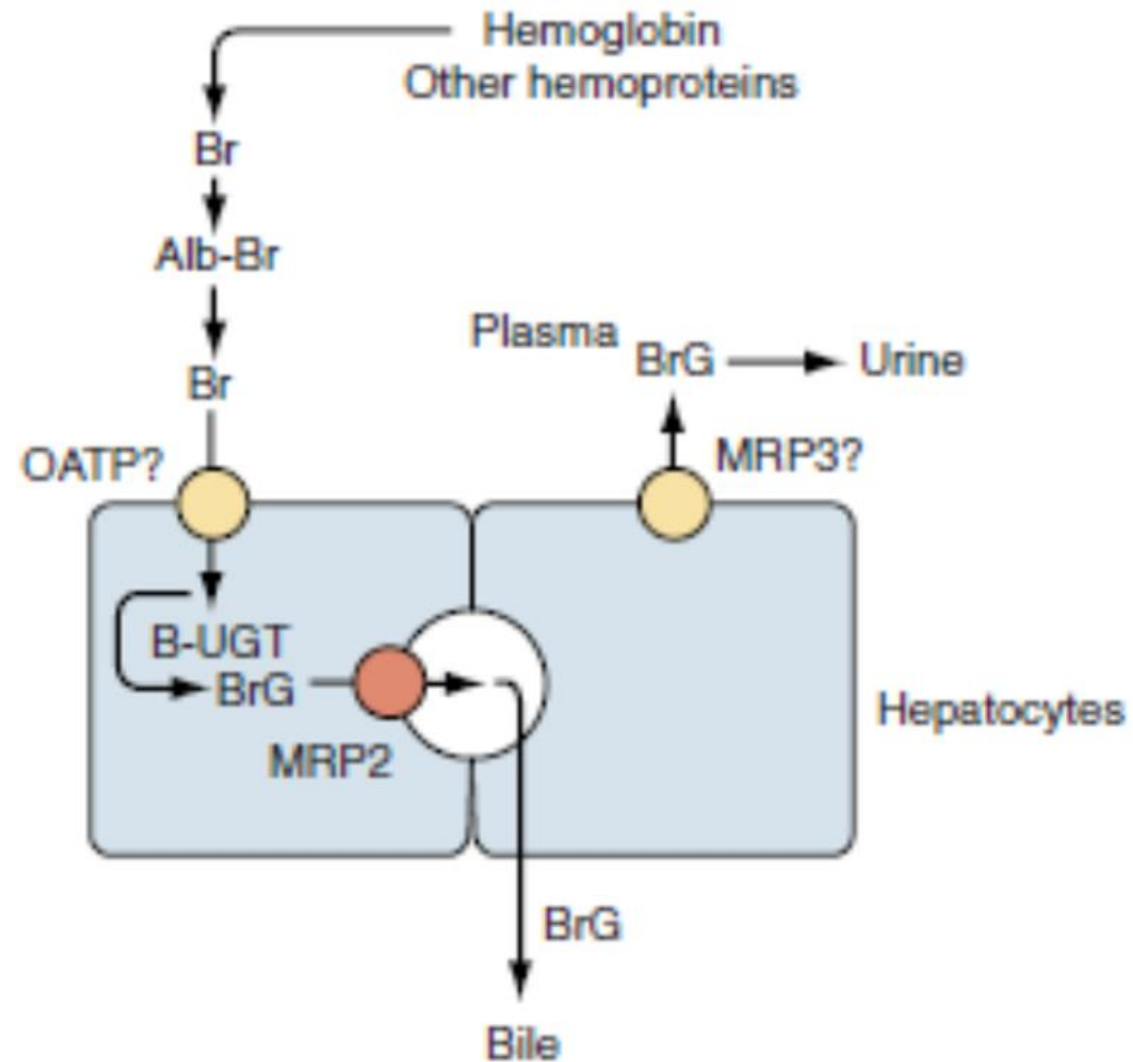


Metabolizmus bilirubinu, ikterus

Praktikum – experimentálně navozený obstrukční ikterus

Metabolizmus bilirubinu

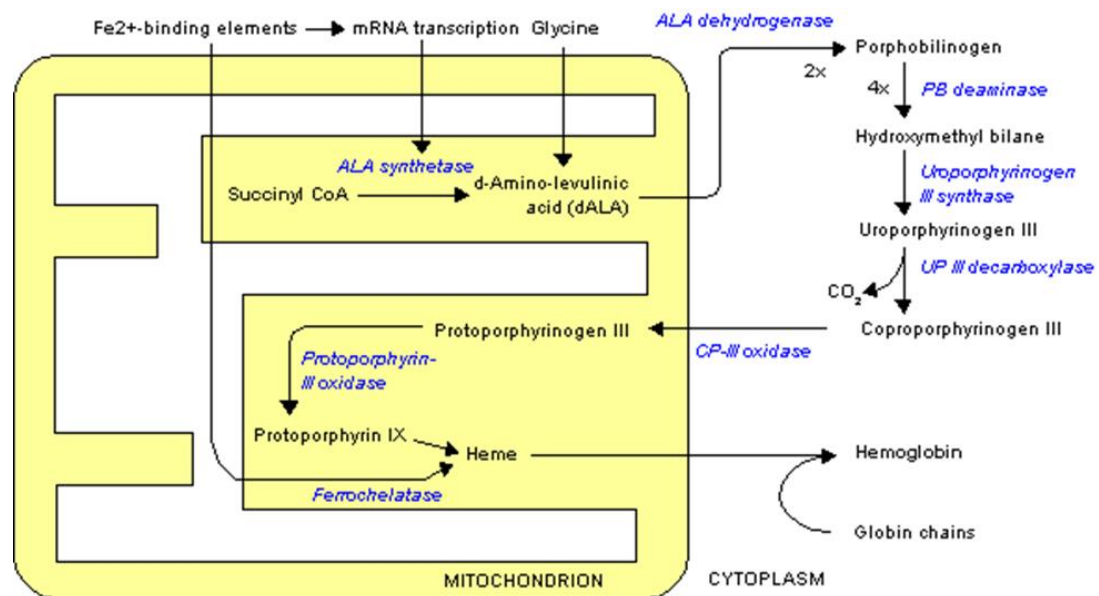


Historické aspekty metabolismu bilirubinu

- 1916 – van den Bergh
 - 2 typy bilirubinu
- 1933 – Hans Fischer
 - struktura bilirubinu
- 1956 – Edmund Talafant
 - transformace bilirubinu v játrech
- 1968 – Tenhunen
 - hemoxygenáza
- 1987 – Stocker
 - antioxidační vlastnosti bilirubinu



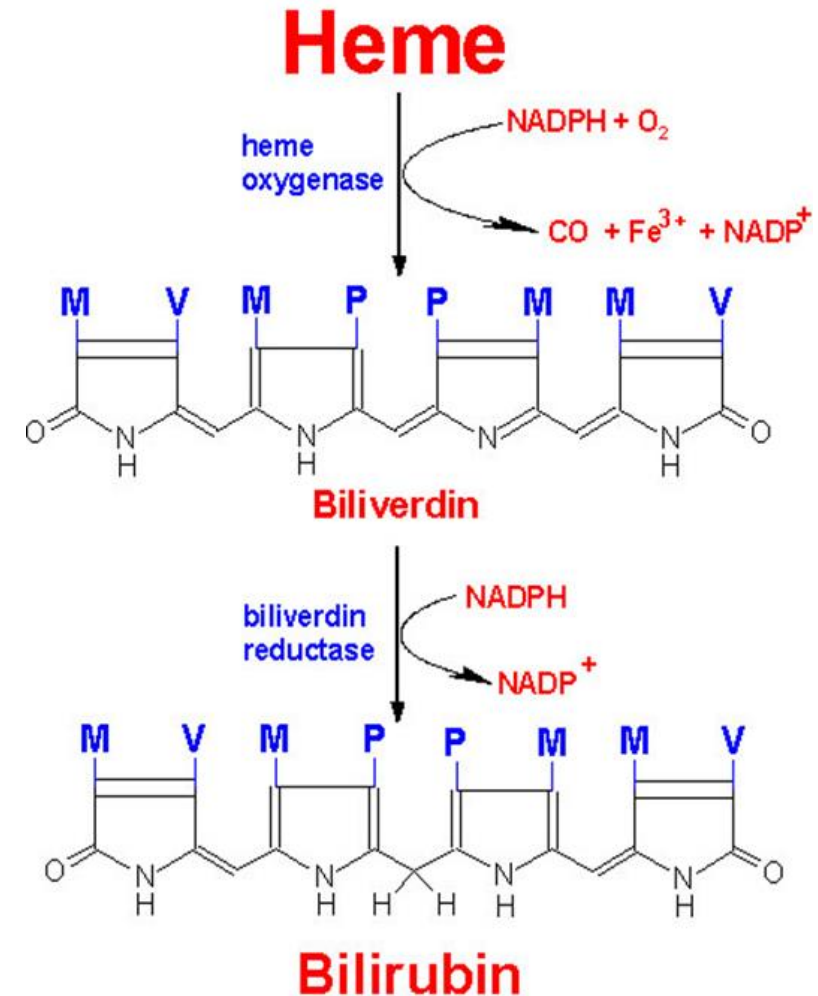
Syntéza hemu



- hl. lokalizace
 - v kostní dřeni – tvorba Hb - erythropoéza
 - v játrech - cytochrom P450 - metabolismus léků a toxinů
- probíhá z části v mitochondriích a z části v cytosolu – 8 reakcí
 - výchozí látkou je sukcinyl-CoA (z citrátového cyklu) a glycin
 - rychlost limitujícím enzymem je ALA syntetáza
- olovo (otrava olovem) inhibuje 3 enzymy syntézy hemu a vede
 - k nedostatečné syntéze a tedy anémii
 - kumulaci meziproduktů – toxické

Metabolismus bilirubinu

- bilirubin vzniká degradací hemu (80 % z hemoglobinu)
 - myoglobin, cytochromy
- intravaskulární hemolýza
 - fyziologicky 10-20%
 - haptoglobin, hemopexin
- v retikuloendoteliálních buňkách
 - slezina, játra
- enzym hemoxygenáza
 - mikrozomy, indukován zvýšeným hemem
 - určuje rychlost produkce bilirubinu
- biliverdin
- biliverdinreduktáza
 - v cytosolu
- takto vzniklý bilirubin (=nekonjugovaný, nepřímý) není rozpustný ve vodě
- v plazmě se váže na albumin
 - nedostává se do moči

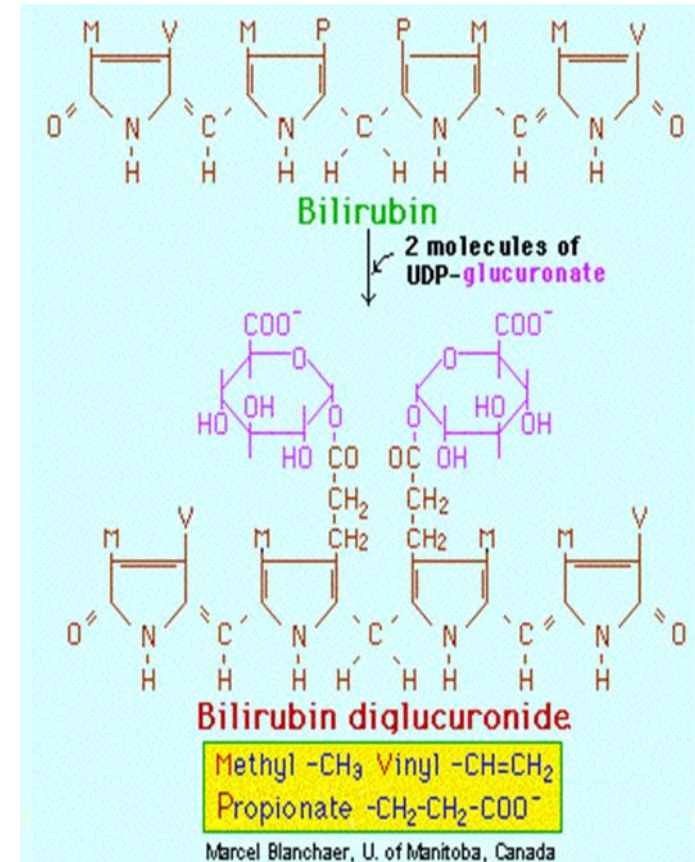


Metabolizmus bilirubinu

- albumin
 - dost vazebných míst a velká afinita pro bilirubin - silná a slabá vazba
 - (kompetice – léky, mastné kyseliny)
- za normálních podmínek koncentrace bilirubinu v plazmě velmi nízká
 - může být vytěsněn některými látkami (salicyláty, sulfonamidy)
 - důležité u kojenců
- v jaterních kapilárách se odděluje od albuminu a pomocí bílkovinného nosiče se dostává do hepatocytu
 - velká kapacita
 - vazba bilirubinu na transportní proteiny
 - rychlá glukuronizace a vylučování do žluči
- podléhá konjugaci – mění se na ve vodě rozpustnou sloučeninu a může být vyloučen do žluči

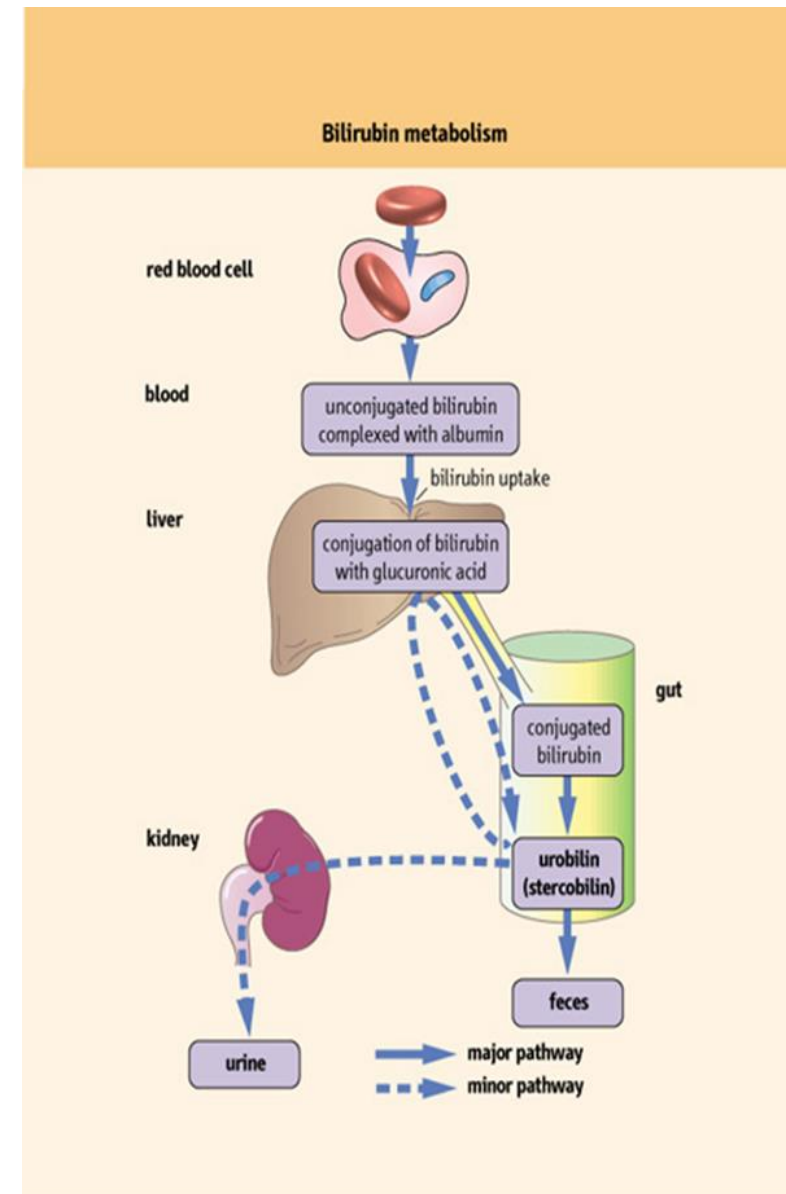
Metabolizmus bilirubinu v hepatocytu

- v hepatocytu vázaný na proteiny Y a Z
- enzym uridindifosfát-glukuronyl- transferáza (UDPGT1)
 - indukce fenobarbitalem
 - metabolismus některých léků
 - úplná aktivace až po narození
- v endoplazmatickém retikulu konjugace bilirubinu s glukuronovou kyselinou za vzniku mono- a diglukuronidů
 - **konjugovaný** bilirubin (=přímý)
 - ve vodě rozpustný
- vyloučení z buňky : ATP-dependentní mnohodruhový transportér aniontu (cMOAT=MRP2)
- vylučování glukuronidu žlučí je faktor omezující rychlost transportu bilirubinu z plazmy do žluči
 - proti konc. gradientu



Metabolismus bilirubinu

- žlučovými cestami se bilirubin dostává do střeva
 - z části dekonjugace (β -glukuronidáza) a zpětná resorpce – enterohepatální oběh
 - část nekonjugovaného bilirubinu v krvi – neprochází přes glomerulární membránu
 - z části vyloučen stolicí
 - část přeměněna střevními bakteriemi na bezbarvé urobilinogeny
 - část z nich se vstřebá a je vyloučena močí,
 - zbytek se oxiduje na hnědé urobiliny (zbarvení stolice)



© Fleshandbones.com Baynes: Medical Biochemis

Alternativní dráhy metabolismu bilirubinu

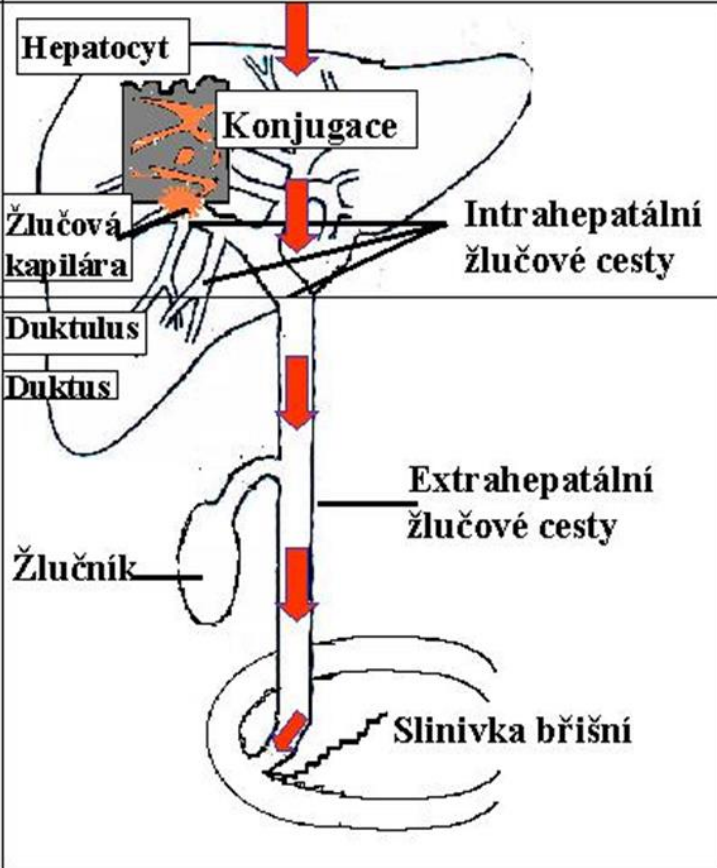
- cytochrom P-448
 - v játrech nízká exprese
 - zvýšení u hyperbilirubinémie
 - indukovatelné
 - indol-3-karbinol
- přímá sekrece
 - nekonjugovaný bilirubin
 - z cévy přes stěnu střeva do GIT
 - pasivní difuze
- enzym bilirubinoxidáza
 - u člověka malý význam
 - perorální podání enzymu?

Ikterus

- žluté zbarvení kůže a sliznic způsobené zvýšeným obsahem bilirubinu v plazmě
- normální hodnota je do 17 $\mu\text{mol/l}$
- subikterus
 - malé zvýšení (35 - 40 $\mu\text{mol/l}$), nemusí být zřetelné
- hyperbilirubinemie = zvýšená hladina bilirubinu v plazmě
- klinický symptom, upozorňuje na přítomnost jiného problému
 - játra, žlučové cesty, hemolýza
- může mít protektivní účinky
 - významné antioxidační působení
 - snížené kardiovaskulární riziko
- u konjugované hyperbilirubinemie výraznější ikterus
- patofyziologické dělení
 - pre- a postmikrozomální



Schéma klasifikace nejčastějších příčin ikteru

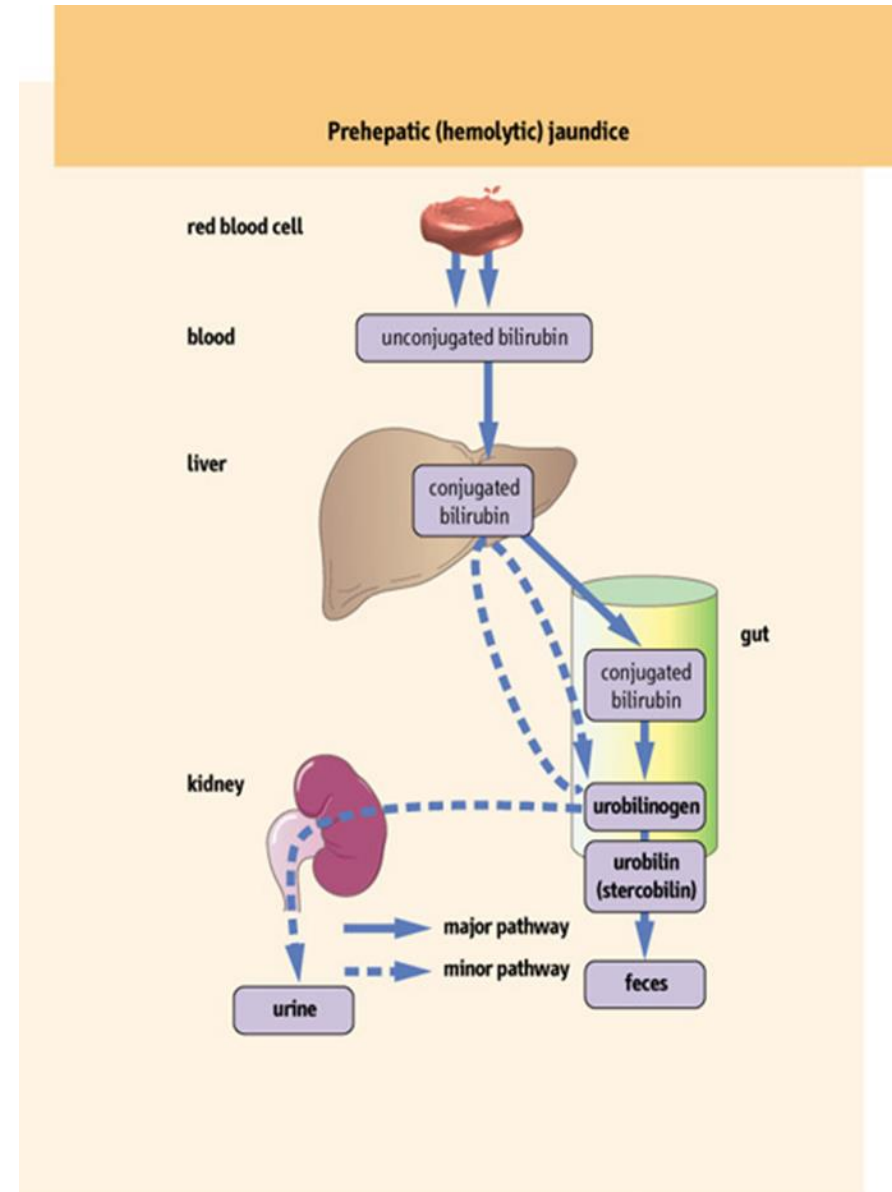
Typ ikteru		Příčina
Ikterus prehepatální	<p>Hemoglobin</p> <p style="color: red;">↓</p> <p>Bilirubin</p>	Hemolytické anémie
Ikterus hepatální	 <p>The diagram illustrates the pathway of bilirubin from the liver to the duodenum. It shows a hepatocyte where conjugation (Konjugace) occurs. From there, it moves through intrahepatic bile ducts (Intrahepatální žlučové cesty) to the bile capillary (Žlučová kapilára), then through the ductule (Duktulus) and duct (Duktus) to the gallbladder (Žlučník). Finally, it passes through the extrahepatic bile duct (Extrahepatální žlučové cesty) to the duodenum (Slinivka břišní). Red arrows indicate the flow of bilirubin, and red boxes highlight the sites of obstruction for different types of jaundice.</p>	Gilbertův syndrom Hepatitidy - virové - alkoholické - polékové Cirhózy
Ikterus cholestatický		Primární biliární cirhóza Primární sklerózující cholangitida Poléková cholestáza Metastázy do jater Žlučové kameny Záněty žlučových cest Nádory žlučových cest Karcinom hlavy pankreatu

The causes of jaundice

Type	Cause	Clinical example	Frequency
Prehepatic	hemolysis	autoimmune abnormal hemoglobin	uncommon depends on region
intrahepatic	infection	hepatitis A, B, C	common/very common
	chemical/drug	acetaminophen alcohol	common common
	genetic errors: bilirubin metabolism	Gilbert's syndrome Crigler–Najjar syndrome Dubin–Johnson syndrome Rotor's syndrome	1 in 20 very rare very rare very rare
	genetic errors: specific proteins	Wilson's disease α_1 antitrypsin	1 in 200 000 1 in 1000 with genotype
	autoimmune	chronic active hepatitis	uncommon/ rare
	neonatal	physiologic	very common
Posthepatic	intrahepatic bile ducts	drugs primary biliary cirrhosis cholangitis	common uncommon common
	extrahepatic bile ducts	gall stones pancreatic tumor cholangiocarcinoma	very common uncommon rare

Prehepatální ikterus

- nadměrné zatížení jaterní buňky bilirubinem
- zvýšená nabídka
 - zvýšený přísun do střeva
- většinou následkem hemolýzy
 - vrozené
 - získané
 - inkompatibilní transfuze
- zvýšený nekonjugovaný bilirubin
- v moči urobilinogen
- bilirubin není v moči
- hypercholická stolice



Hepatální ikterus

- způsoben poruchou na úrovni jater
 - porucha v metabolismu bilirubinu
 - vychytávání, konjugace a vylučování z hepatocytu
 - rozpad hepatocytů a uvolnění bilirubinu do cirkulace
- zvýšený bilirubin může být konjugovaný i nekonjugovaný, závisí na typu poruchy
- v moči urobilinogen i bilirubin
- jaterní poškození
 - hepatitida, cirhóza, léky, chemikálie
- dědičné hyperbilirubinemie
- poškození jaterní architektury
 - komunikace mezi jaterními a žlučovými kapilárami – bil. v moči
- hypocholesterolémie
 - nižší produkce bilirubinu

Dědičné hyperbilirubinemie

- nekonjugované
 - Gilbertův syndrom
 - Crigler-Najjarův syndrom
- konjugované
 - Dubin-Johnsonův syndrom
 - Rotorův syndrom

Gilbertův syndrom

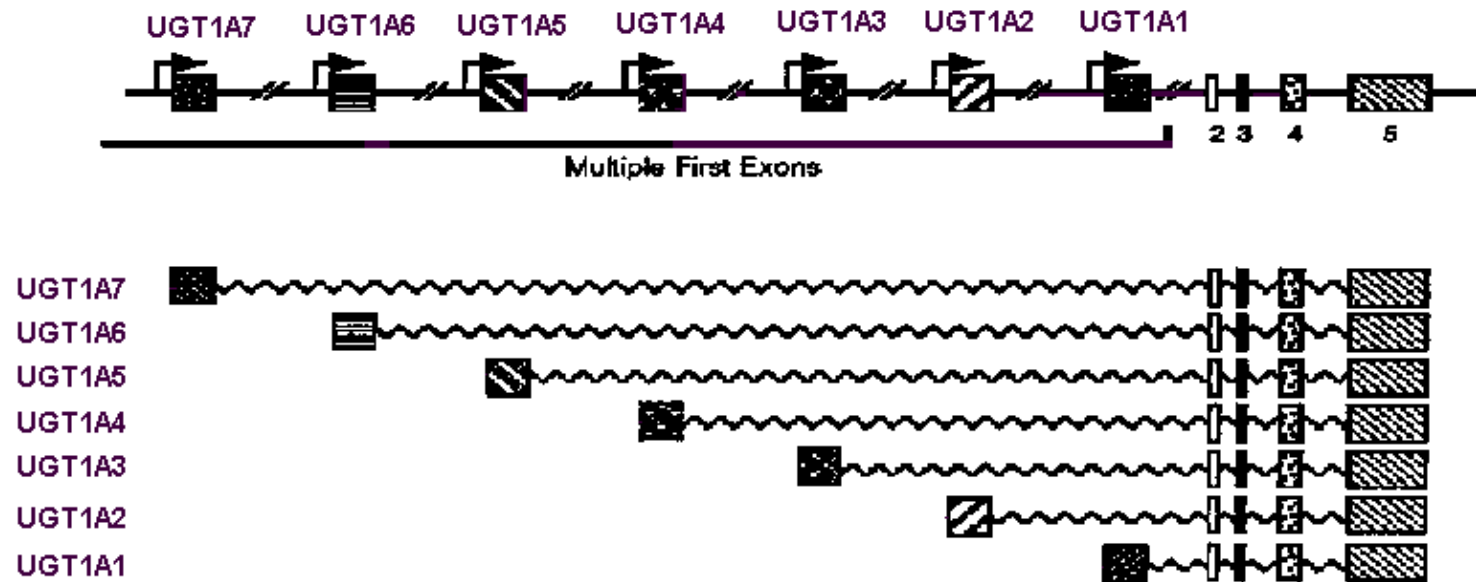
- geneticky podmíněné onemocnění
 - autozomálně recesivní
- mírná chronická nekonjugovaná hyperbilirubinemie
 - bez přítomnosti jaterního onemocnění či hemolýzy
- populační frekvence 2 – 5%
- mutace v promotoru genu pro UDPGT
 - snížení aktivity enzymu na cca. 30% normální hodnoty
- benigní, celoživotní hyperbilirubinémie
- bilirubin do 100 $\mu\text{mol/l}$
 - reakce na fenobarbital
- ikterus často nevýrazný
 - zhoršení při stresu, hladovění a fyzické námaze

Crigler-Najjarův syndrom

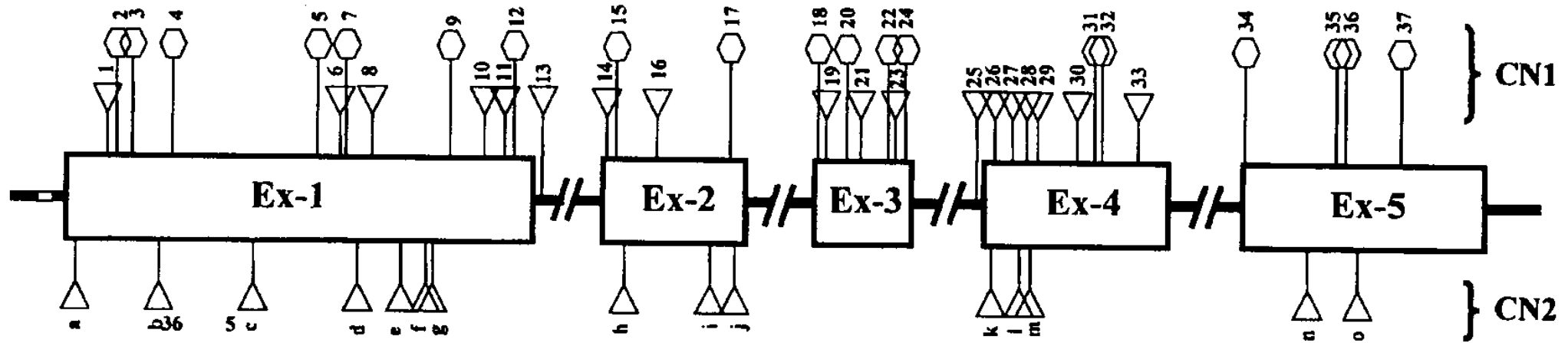
- těžká forma hereditární hyperbilirubinemie
 - autozomálně recesivní
 - velmi vysoké hodnoty nekonjugovaného bilirubinu v krvi
 - je možné prokázat nedostatek UDPGT v játrech
- Typ I
 - bilirubin $> 350 \mu\text{mol/l}$
 - v játrech úplně chybí UDPGT
 - způsoben mutací v 1 z 5 exonů genu pro UDPGT
 - fototerapie, bez léčby jádrový ikterus
 - není reakce na fenobarbital
 - Typ II
 - bilirubin $< 350 \mu\text{mol/l}$
 - enzymu konjugujícího bilirubin je méně než 10%
 - mutace v exonech genu pro UDPGT
 - reziduální činnost enzymu vysvětluje nižší koncentraci bilirubinu než u typu I

Gen pro UDPGT1

- chromozom 2
- exony 2 – 5 ve všech izoformách
- typ exonu 1 zodpovídá za substrátovou specifitu



Mutace v genu pro UDPGT1



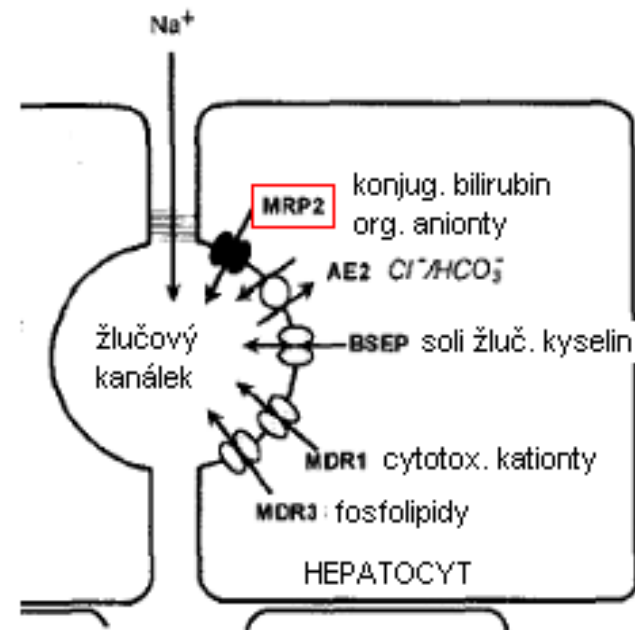
Familiární konjugované hyperbilirubinémie

- Dubin-Johnsonův syndrom

- benigní familiární převážně konjugovaná hyperbilirubinémie
- autozomálně recesivní
- mutace v genu pro cMOAT (=MRP2)
- v hepatocytech se ukládá hnědé barvivo

- Rotorův syndrom

- podobný Dubin-Johnsonovu syndromu
- hlavní rozdíl – nepřítomnost hnědé barvivo v hepatocytech



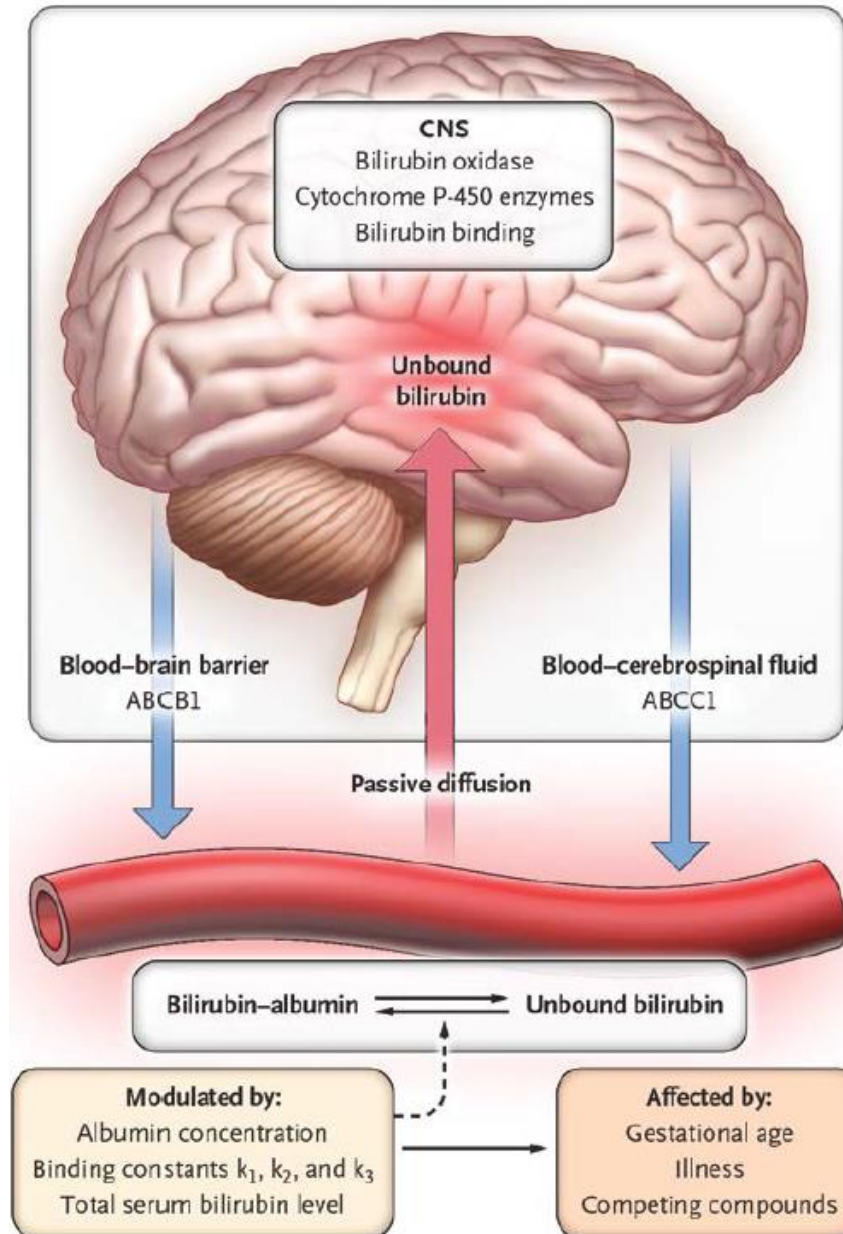
Posthepatální ikterus (cholestatický)

- výsledek poruchy (částečné nebo kompletní) vylučování bilirubinu do střeva po jeho konjugaci v hepatocytech
- **cholestáza** – porucha odtoku žluči
 - intrahepatální – porucha uvnitř jater
 - extrahepatální – zablokování žlučovodu
 - žlučové kameny, nádor jater nebo žlučových cest, záněty žlučových cest
- zvýšený konjugovaný bilirubin
- při úplné obstrukci v moči jen bilirubin
- acholická stolice, urobilinogen není v moči

Novorozenecká hyperbilirubinemie

- fyziologická novorozenecká žloutenka (icterus neonatorum)
 - zvýšený zánik erytrocytů
 - nedokonalé jaterní konjugační a transportní systémy
 - zvýšené vstřebávání bilirubinu a jeho snížená vazba na albumin
 - nekonjugovaná hyperbilirubinemie
 - vrchol v prvních 5 dnech, téměř u poloviny novorozenců
- kernikterus (jádrový ikterus)
 - u dětí předčasně narozených, s hemolytickou nemocí a s novorozeneckou hepatitidou
 - výrazné zvýšení koncentrace bilirubinu v krvi
 - proniká přes hematoencefalickou bariéru – poškození bazálních ganglií

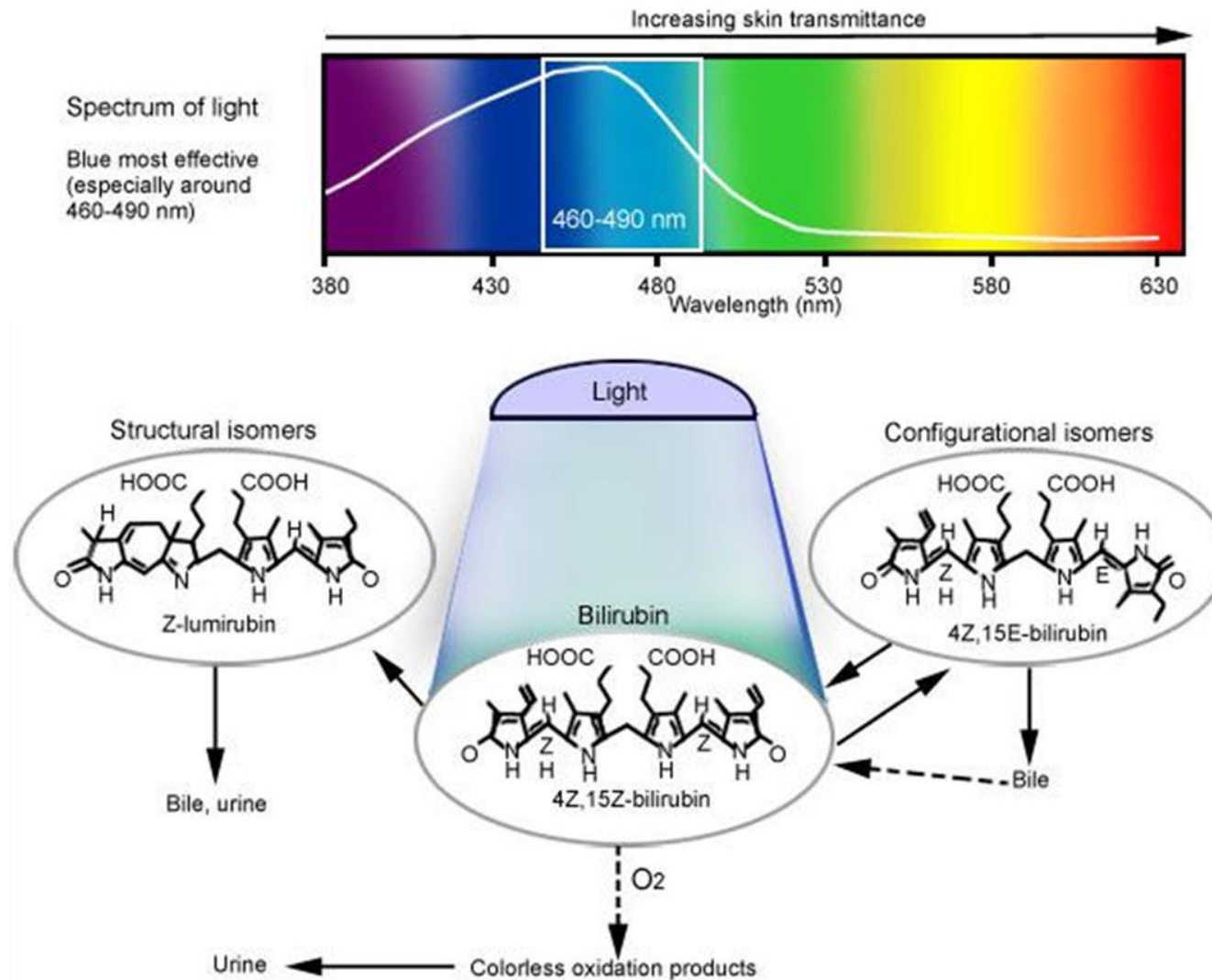
Bilirubin a CNS



Terapie ikteru

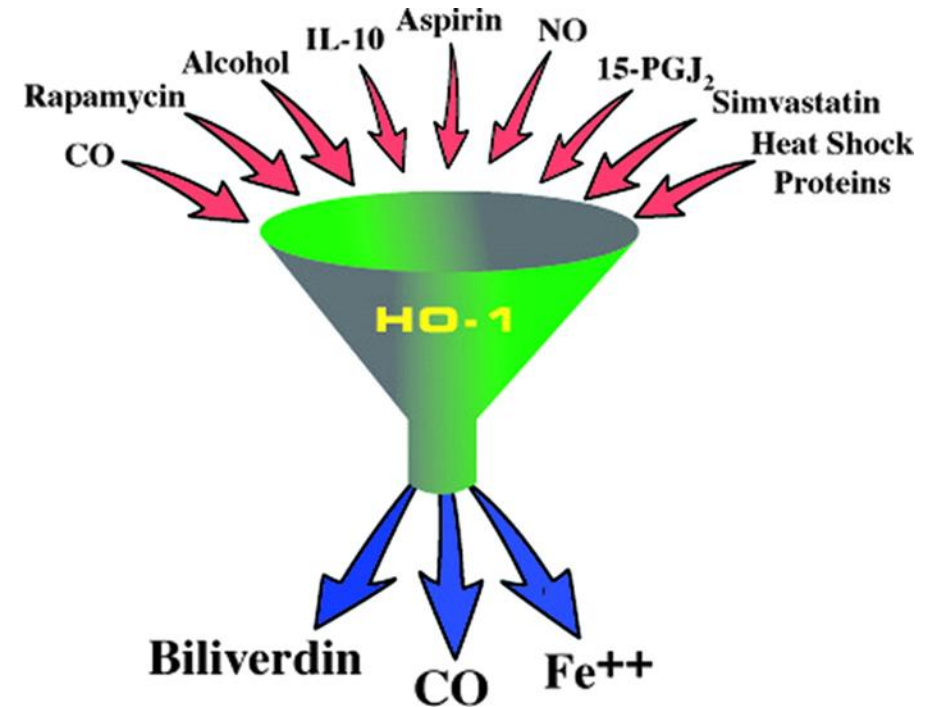
- fenobarbital
 - indukce konjugačního enzymu UDPGT
- fototerapie
 - rozklad nekonjugovaného bilirubinu na produkty rozpustné ve vodě (lumibilirubin)
- inhibice hemoxygenázy

Fototerapie



Hemoxygenáza – protektivní aspekty

- 2 izoformy
 - indukovatelná HO-1
 - konstitutivní HO-2
- zvýšená exprese u kardiovaskulárních a zánětlivých onemocnění



Biologické účinky CO

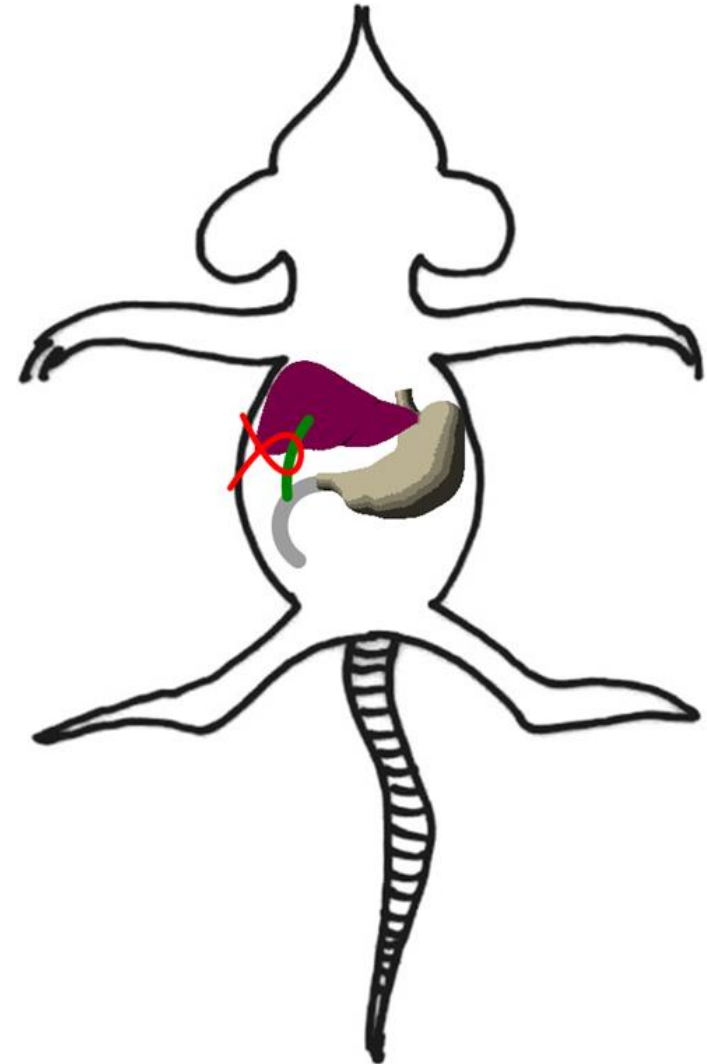
- kardiovaskulární systém
 - inhibice agregace trombocytů
 - relaxace hladké svaloviny
- zánět
 - ↑ IL-10
 - ↓ TNF- α a IL-1 β
- ovlivnění buněčné proliferace
 - cykliny
 - přímý antiapoptotický účinek
- metabolismus
 - stimulace sekrece inzulínu
- kuřáci
 - vyšší CO v krvi

Protektivní účinky biliverdinreduktázy


- lokalizace
 - cytoplazma
 - jádro
 - transkripční faktor
- proteinkinázová aktivita
 - intracelulární signalizace
 - ovlivnění exprese HO-1
 - homeostáza glukózy

Praktikum – část I

- cílem praktika je
 - vytvořit model obstrukčního ikteru
 - **část I**
 - sledovat změny metabolismu bilirubinu
 - **část II**
- praktický postup – část I
 - anestezie
 - laparotomie
 - podvaz ductus choledochus

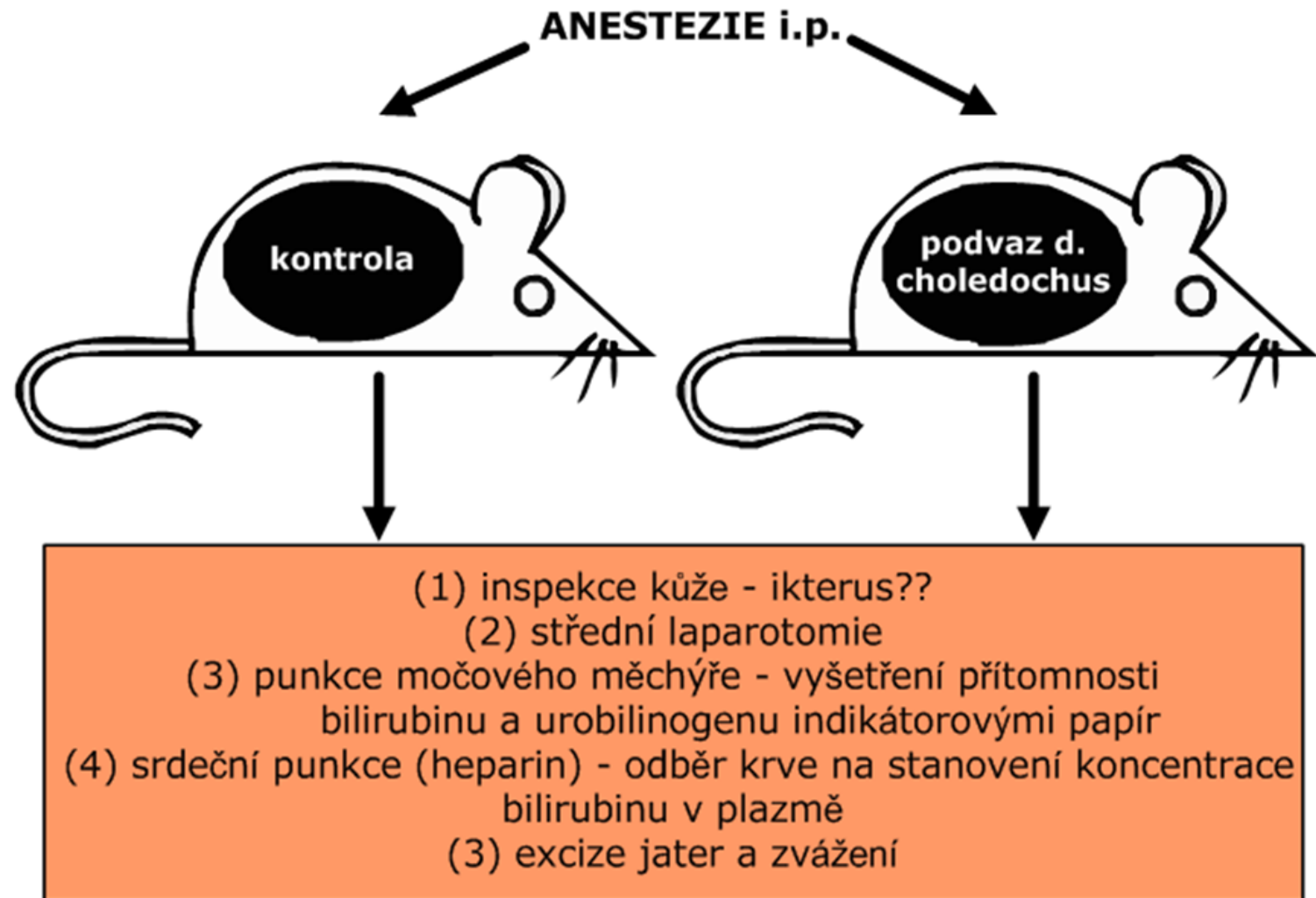


Praktikum II – průkaz ikteru



VÝSLEDKY

- (1) srovnání koncentrace Bi a UBi v moči mezi kontrolami a pokusnými zvířaty
- (2) srovnání koncentrace Bi (celk., konj. a nekonj.) v plazmě
- (3) srovnání hmotnosti jater



Praktikum II - postup

- probíhá týden po podvazu ductus choledochus
- zvážení potkana, narkóza
- pozorování změn v zabarvení zvířete
- laparotomie
- punkce močového měchýře
 - indikátorové papírky – vyšetření přítomnosti bilirubinu a urobilinogenu
- srdeční punkce, odběr krve a jater
 - stanovení koncentrace bilirubinu v séru
 - vážení jater

Stanovení bilirubinu

- van den Berghova reakce
 - reakce bilirubinu s kyselinou sulfanilovou – vzniká azobarvivo – fotometrické stanovení
 - konjugovaný bilirubin reaguje rychle
 - nekonjugovaný pomalu
 - urychlení metanolem, kofeinem
 - uvolňují bilirubin z vazby
 - hodnota se získá odečtením přímého od celkového bilirubinu
- analytická fáze
 - vzorek nesmí být hemolytický
 - chránit před světlem
 - zpracovat co nejdříve
 - interference

van den Berghova reakce

van den Bergh Method

