

Žlučová barviva

Lenka Fialová, Martin Vejražka

| | |
|--|---|
| TEORETICKÝ ÚVOD | 2 |
| 1. ŽLUČOVÁ BARVIVA | 2 |
| 2. VYŠETŘENÍ ŽLUČOVÝCH BARVIV V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH | 4 |
| 2.1. STANOVENÍ BILIRUBINU V SÉRU..... | 4 |
| 2.2. STANOVENÍ BILIRUBINU A UROBILINOGENU V MOČI | 6 |
| 3. HYPERBILIRUBINEMIE A TYPY IKTERŮ | 7 |

Klíčová slova

žlučová barviva, konjugovaný a nekonjugovaný bilirubin, delta bilirubin, urobilinogen, sterkobilinogen, urobilin, sterkobilin, van den Berghova reakce, diazotace, diazočínidlo, přímý bilirubin, nepřímý bilirubin, prehepatální ikterus, posthepatální ikterus, hepatocelulární ikterus, konjugovaná hyperbilirubinemie, nekonjugovaná hyperbilirubinemie, smíšená hyperbilirubinemie

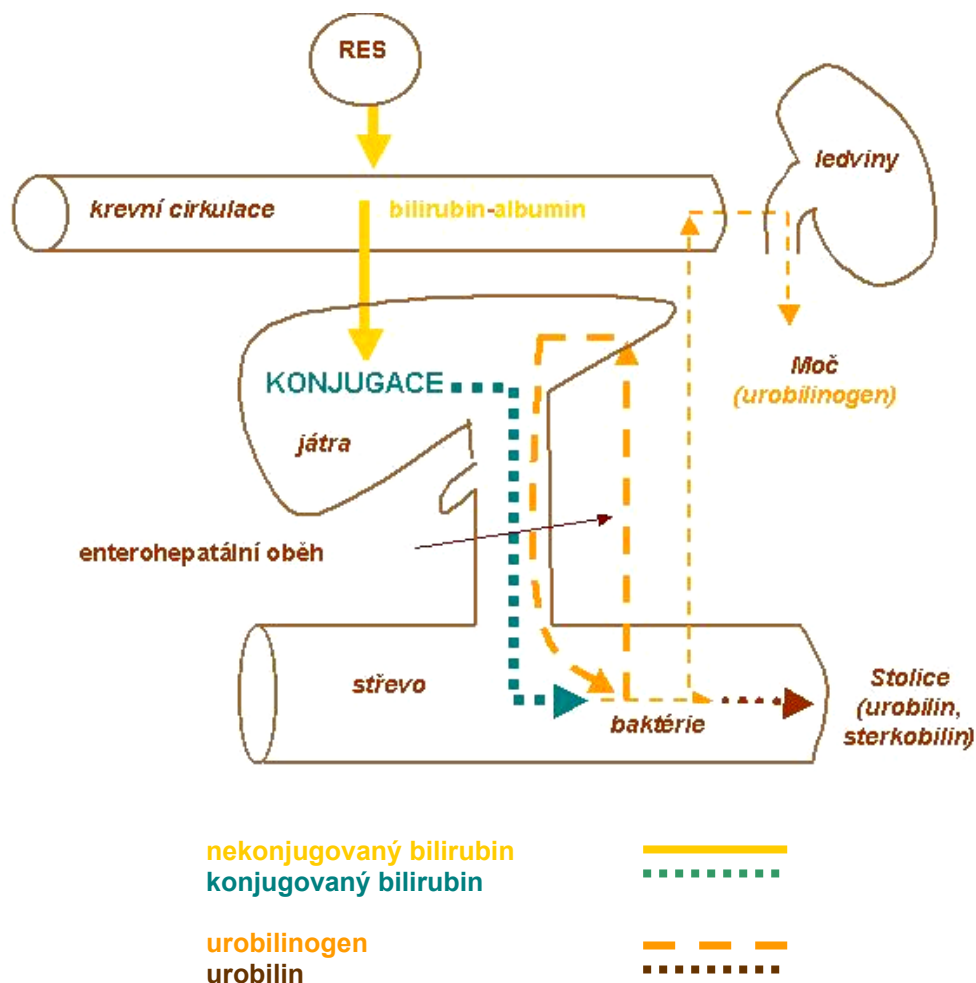
Teoretický úvod

1. Žlučová barviva

Do skupiny žlučových barviv tvořených *čtyřmi lineárně uspořádanými pyrolovými jádry* zahrnujeme [bilirubin](#), [urobilinogen](#) a [sterkobilinogen](#) a jejich oxidační produkty [urobilin](#) a [sterkobilin](#).

Bilirubin vzniká *degradací hemoglobinu* uvolněného z rozpadlých erytrocytů (75 %), zbytek pochází z jiných hemoproteinů (cytochromy, katalasa, peroxidasa, myoglobin a další).

Obr. 1 Vznik, transport a přeměna bilirubinu

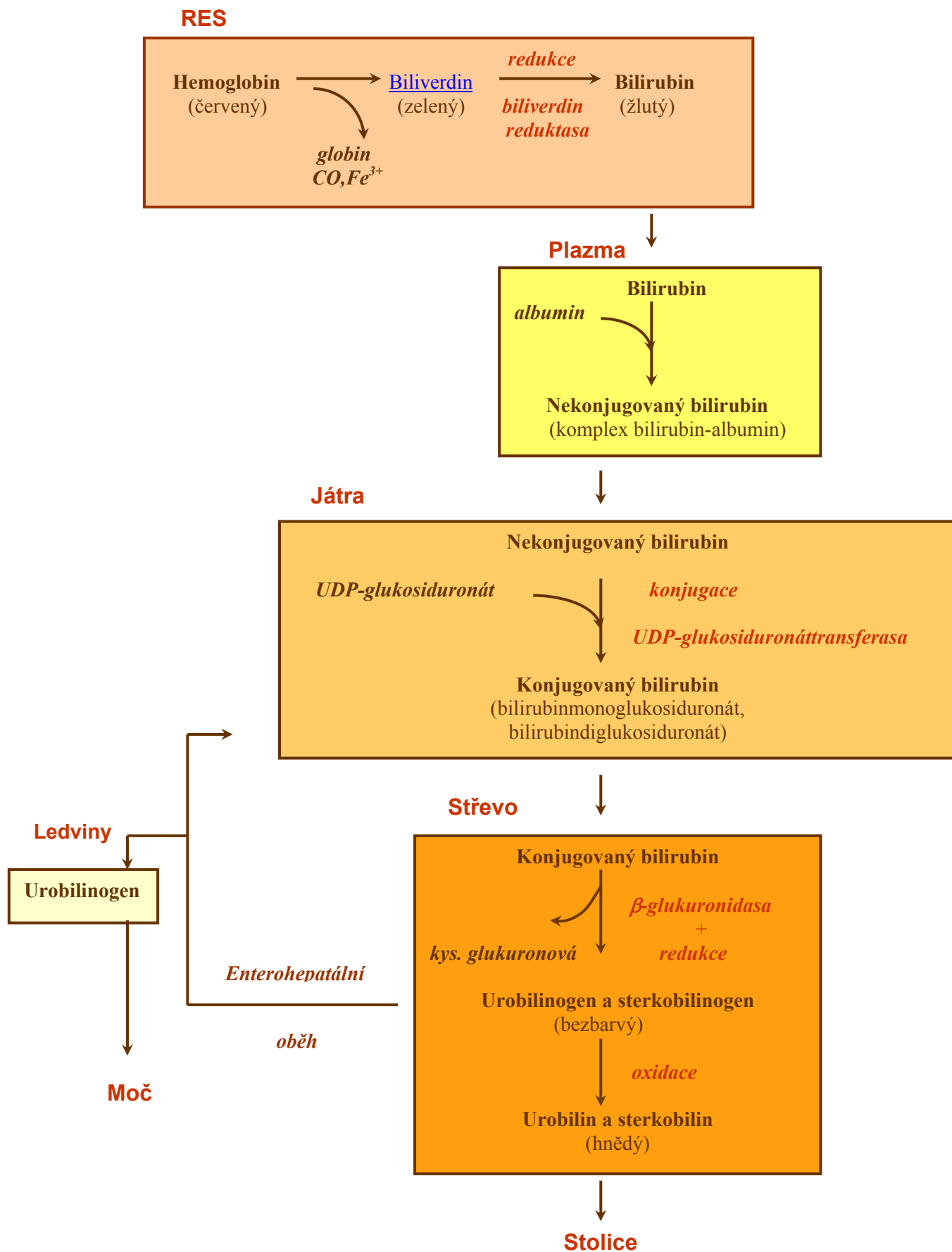


Vznik bilirubinu probíhá v několika krocích (obr. 1, 2):

- odštěpením železa a globinu z molekuly hemoglobinu společně s otevřením porfyrinového kruhu mezi pyrolem I a II a uvolněním CO se vytváří lineární tetrapyrrol *zelený* pigment [biliverdin](#);
- redukcí centrálního methenylového můstku mezi pyrolem III a IV v molekule biliverdinu účinkem [biliverdinreduktasy](#) se zakončuje přeměna na *žlutý* [bilirubin](#).

Takto vzniklý bilirubin se označuje jako *nekonjugovaný bilirubin*. Je *nerozpustný ve vodě* a snadno proniká membránami do buněk, pro které je silně toxický. Může se vázat do různých tkání. Infiltrace tkání, zejména bazálních ganglií bilirubinem, je závažnou komplikací postižení plodu při Rh-izoimunizaci. Proto je bilirubin po uvolnění z místa svého vzniku do cirkulace transportován *ve vazbě na albumin*. Vazba je nekovalentní a o vazbu na albumin s bilirubinem soutěží i jiné látky (mastné kyseliny, lipofilní léky a další). Komplex bilirubinu s albuminem neproniká hematoencefalickou bariérou na rozdíl od nevázaného bilirubinu.

Obr. 2 Reakce a enzymy účastníci se vzniku žlučových barviv



Krví se bilirubin dostává do jater a vstupuje do hepatocytů, kde je **konjugován s kyselinou glukuronovou** pomocí **UDP-glukosiduronáttransferasy** za vzniku **bilirubinmonoglukosiduronátů** a především **bilirubindiglukosiduronátů**. V menší míře se vytvářejí estery s glukosou a xylosou. Konjugací se bilirubin stává **rozpuštěným ve vodě**. Pro označení této formy bilirubinu se používá termín **konjugovaný bilirubin**. Za fyziologických podmínek se nalézá v krvi pouze ve stopovém množství.

Za patologických stavů při déle trvajících zvýšených hladinách konjugovaného bilirubinu v plazmě vzniká tzv. **delta bilirubin**. Představuje podíl konjugovaného bilirubinu, který neenzymovou reakcí vytváří **s albuminem** a v menší míře s jinými plazmatickými proteiny kovalentní peptidovou vazbu. Propionát postranního řetězce bilirubinu reaguje s volnou NH_2 skupinou lysinu albuminu. Hladina delta bilirubinu je mírou předchozího trvání konjugované hyperbilirubinemie. Komplex neprochází normálně glomerulární membránou, a tím se vysvětluje nepřítomnost konjugovaného bilirubinu v moči těchto nemocných.

Konjugovaný bilirubin se dostává do žlučových kanálků a je žlučí vylučován do duodena. Ve střevě se po odštěpení zbytků **kyseliny glukuronové** bakteriální **β -glukuronidasou** redukuje na:

- **urobilinogen** (bezbarvý);
- **sterkobilinogen** (bezbarvý).

Množství urobilinogenu vytvořeného v organismu je úměrné množství bilirubinu vyloučeného žlučí do střeva. Hlavní podíl je vylučován stolicí. Malá část urobilinogenu je ze střeva resorbována a **enterohepatálním oběhem** přechází do jater, odkud se znovu vylučuje do žluči. Nepatrný podíl může být vyloučen močí. Analytické rozlišení urobilinogenu a ster kobilinogenu je obtížné a nemá klinický význam.

Nevstřebané urobilinogeny a ster kobilinogeny se v tlustém střevě samovolně oxidují na:

- **urobilin** (hnědý);
- **sterkobilin** (hnědý), které jsou vylučovány stolicí.

2. Vyšetření žlučových barviv v biologických tekutinách

2.1. Stanovení bilirubinu v séru

Téměř všechny metody používané ke stanovení bilirubinu jsou založeny na **azokopulační reakci** bilirubinu s některou **diazoniovou solí**. Nejčastěji se používá **diazotovaná kyselina sulfanilová**, která vzniká reakcí **kyseliny sulfanilové** s dusitanem sodným v nadbytku kyseliny chlorovodíkové¹ - **van den Berghova diazoreakce**. Bilirubin reaguje s diazoniovými solemi za vzniku intenzivně zbarvených azosloučenin vhodných k fotometrickému stanovení. V přítomnosti diazotované kyseliny sulfanilové se bilirubin štěpí na dvě molekuly azobilirubinu (obr. 3). Vzniklý azobilirubin se chová jako acidobazický indikátor s několika barevnými přechody, ve slabě kyselém prostředí je červený a v silně alkalickém modrý.

Konjugovaný bilirubin reaguje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou přímo a rychle - **přímá van den Berghova reakce**. Tato frakce bilirubinu se označuje jako „**přímý**“ **bilirubin**.

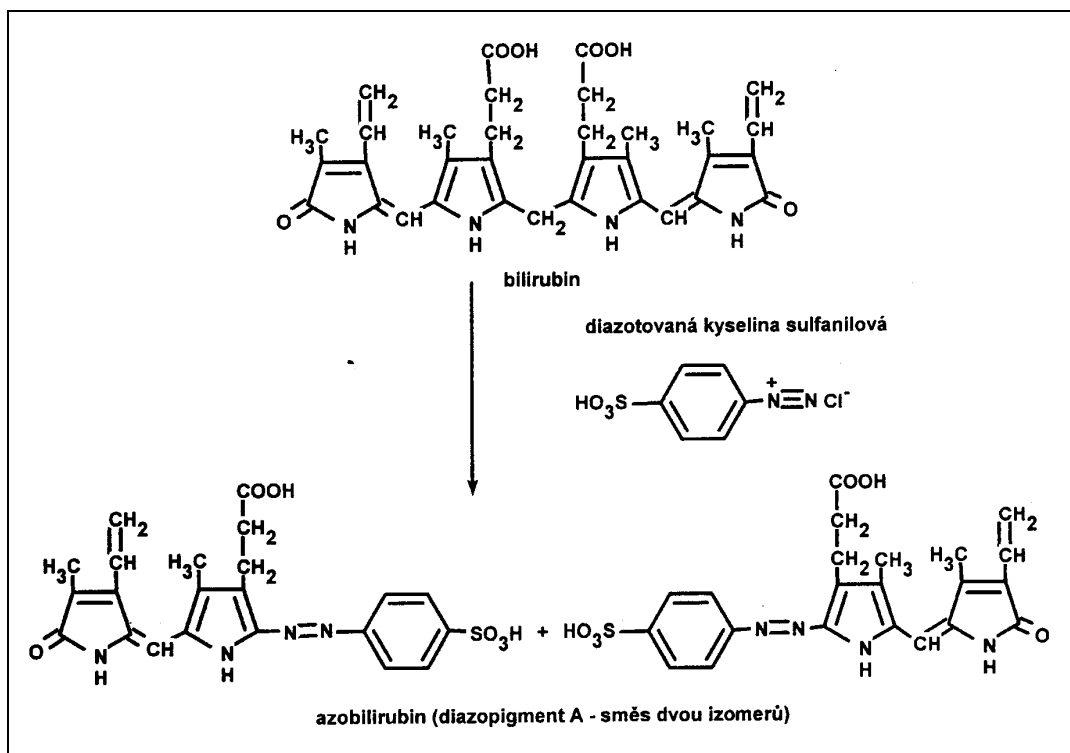
Nekonjugovaný bilirubin, který je špatně rozpustný ve vodě a je nekovalentně vázán na albumin, reaguje s diazočinidlem podstatně pomaleji a zbarvení se vyvíjí až po přidání tzv. **akcelerátoru** - **nepřímá van den Berghova reakce**. Jako akcelerátoru se obvykle využívají alkoholy (methanol, ethanol) či jiné látky (benzoan sodný, kofein, močovina). Akcelerátor usnadňuje reakci s diazočinidlem tím, že napomáhá uvolnění bilirubinu z vazby na albumin a rozrušením vnitřních vodíkových můstků činí bilirubin rozpustnější. Frakce bilirubinu, která vyžaduje akcelerátor, je označována jako „**nepřímý**“ **bilirubin**.

V přítomnosti akcelerátoru reagují všechny formy bilirubinu. Tímto způsobem stanovíme **celkový bilirubin**. Množství nekonjugovaného (nepřímého) bilirubinu můžeme vypočítat jako rozdíl celkového a konjugovaného bilirubinu (obr. 4). Fotometrické stanovení celkového bilirubinu je vhodné provádět v alkalické oblasti, kde je nejcitlivější a nejméně rušeno jinými látkami obsaženými v krevním séru. Zásadité prostředí je zajišťováno silně alkalickým vianem.

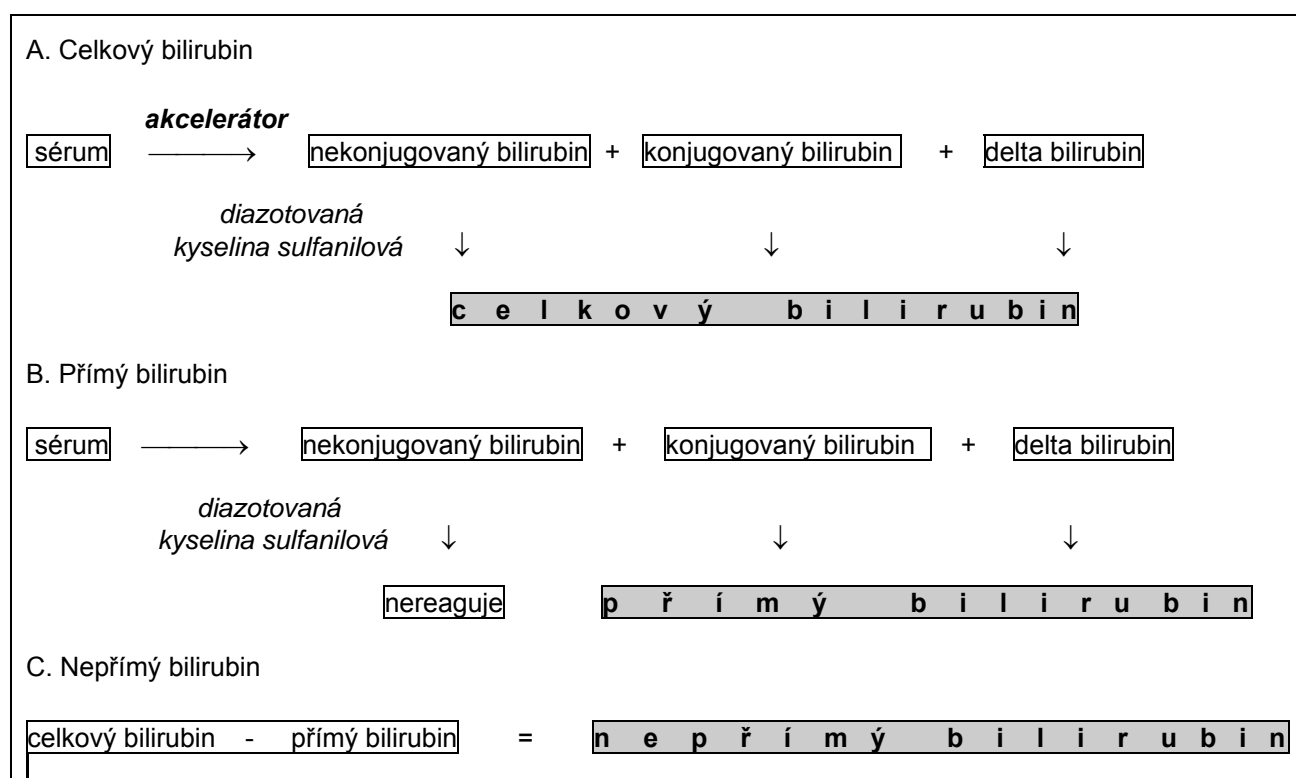
V současnosti je doporučenou rutinní metodou modifikace **dle Jendrassik-Grófa**, využívající jako akcelerátor kofein a benzoan sodný. Pro stanovení celkového bilirubinu lze použít i **přímou spektrofotometrii**, neboť absorbance séra při 454 nm je úměrná koncentraci bilirubinu. Využívá se toho

¹Ehrlichovo diazočinidlo - diazo I - kyselina sulfanilová v HCl, diazo II – dusitan sodný

Obr. 3 Reakce bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou²



Obr. 4 Stanovení celkového, přímého a nepřímého bilirubinu³



² Upraveno podle: Kaplan L.A, Pesce A.J.: Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 3rd edition. Mosby 1996, str. 525

³ Upraveno podle: Calbreath D.F.: Clinical Chemistry. A Fundamentals Textbook. W.B. Saunders Company 1992, str. 228

např. při stanovení bilirubinu v některých biologických tekutinách jako je plodová voda nebo mozkomíšní mok. Existuje ještě orientační způsob stanovení bilirubinu, tzv. *transkutánní ikterometrie*, která našla uplatnění v neonatologii při vyšetřování novorozeneckých žloutenek. Pro měření se používá ruční přístroj bilirubinometr, který se přikládá na čelo novorozence.

Bilirubin je silně fotosenzitivní, proto je nutno *vzorky uchovávat ve tmě* a zpracovávat co nejdříve.

Fyziologické hodnoty:

Koncentrace celkového bilirubinu v séru (fS - celkový bilirubin): **do 17 $\mu\text{mol/l}$**

Koncentrace přímého bilirubinu v séru (fS – přímý bilirubin): **do 5 $\mu\text{mol/l}$**

2.2. Stanovení bilirubinu a urobilinogenu v moči

Bilirubin v moči

V moči lze prokázat pouze *konjugovaný bilirubin*. Nekonjugovaný bilirubin je vázán na albumin a do glomerulárního filtrátu neprochází. Za normálních okolností se bilirubin v moči prakticky nevyskytuje. Zkoušky na bilirubin v moči jsou pozitivní při hladině konjugovaného bilirubinu v séru zvýšené na 30 - 34 $\mu\text{mol/l}$ (ledvinný práh pro bilirubin). Přítomnost bilirubinu v moči se projeví jejím *tmavě hnědým zbarvením*. Indikací k vyšetření je diagnostika ikterů. V mnoha případech se bilirubin v moči vyskytuje v počátečních stádiích choroby, popř. před rozvojem klinických příznaků.

Bilirubin v moči prokazujeme *pomocí diagnostických proužků*. Test je založen na *azokopulační reakci*, kterou poskytuje konjugovaný bilirubin se *stabilní diazoniovou solí*. Vzniká růžové až červené barvivo. Při současném výskytu vysokých koncentrací urobilinogenu se zbarvení mění do oranžova. V tomto případě se doporučuje vyhodnotit zbarvení až po 2 minutách od namočení indikační zóny. Nižší až falešně negativní výsledky mohou být způsobeny vysokými koncentracemi kyseliny askorbové. Vzorky moči je nutno chránit před přímým slunečním světlem, které vyvolává oxidaci bilirubinu s následným falešně nižším až negativním nálezem.

Důkaz bilirubinu je možno též provádět na principu oxidace na zelený *biliverdin* nebo modrý bilicyanin (Gmelinova zkouška s kyselinou dusičnou, Rosinova zkouška s jodovou tinkturou).

Urobilinogen v moči

Urobilinogen je normálním katabolickým produktem bakteriálního odbourávání bilirubinu, který za fyziologických podmínek vzniká v určitém množství a je také v malé míře vylučován do moči. Za horní hranici fyziologického vylučování urobilinogenu močí je považována koncentrace 17 $\mu\text{mol/l}$.

Zvýšené množství urobilinogenu v moči je citlivou známkou přetížení funkční kapacity jaterního parenchymu, který není schopen vylučovat z krve většinu z urobilinogenů resorbovaných v tlustém střevě. S touto situací se setkáváme např. při nadprodukcí bilirubinu (prehepatální ikterus) nebo při primárním poškození hepatocytu (hepatocelulární ikterus) - viz tab. 2.

Naopak *úplné chybění urobilinogenu* doprovází *kompletní uzávěr žlučových cest* nebo je známkou *úplného selhání exkrece žluči* při velmi těžkém poškození jater. Jinou příčinou je *nepřítomnost střevní flóry*, která podmiňuje redukci bilirubinu. Tento stav nastává fyziologicky u novorozenců nebo někdy při terapii antibiotiky. Při uzávěru žlučových cest je barva stolice bělošedá v důsledku nepřítomnosti žlučových barviv a vysokého obsahu nestrávených tuků. V případě chybění bakteriální flóry je stolicí vylučován nezměněný bilirubin, popř. dochází k jeho oxidaci na zelený *biliverdin*.

Urobilinogen v moči stanovujeme podobně jako bilirubin *pomocí diagnostických proužků*, které využívají *principu azokopulační reakce s diazoniovou solí*. Indikační zóna se barví v přítomnosti urobilinogenu růžově až červeně. Slabě růžové zbarvení odpovídá ještě fyziologickému vylučování urobilinogenu. V přítomnosti bilirubinu je zbarvení žluté, které přechází po 1 minutě do zeleného až modrého odstínu. Jako orientační zkoušku lze použít nespecifickou *Ehrlichovu reakci s Ehrlichovým aldehydovým činidlem*¹ (*4-dimethylaminobenzaldehyd* v HCl).

3. Hyperbilirubinemie a typy ikterů

Stanovení žlučových barviv v séru a v moči nás informuje o intenzitě rozpadu červených krvinek a hemoglobinu, o funkci jater a stavu žlučových cest.

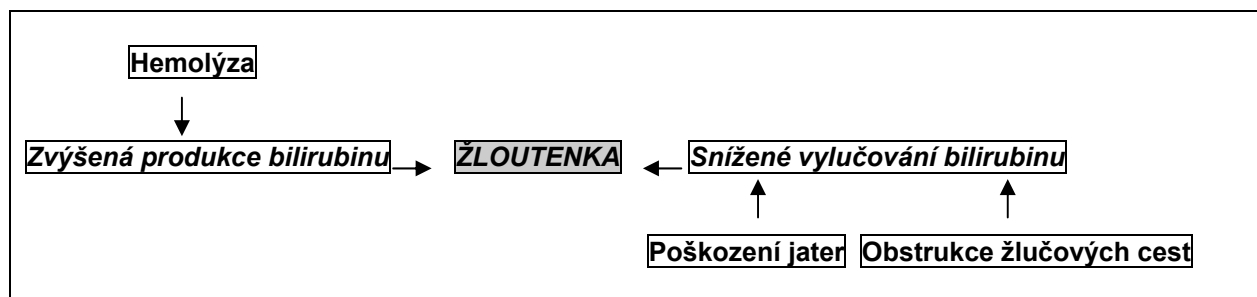
Jestliže hodnota bilirubinu v séru přesáhne $17 \mu\text{mol/l}$, hovoříme o **hyperbilirubinemii**. Bilirubin prostupuje tkáněmi a překročí-li bilirubinemie asi $35 \mu\text{mol/l}$, způsobuje **zbarvení očního bělma a kůže** za vzniku **žloutenky – ikteru** (obr. 8). Protože se bilirubin rozkládá světlem, je nejprve žlutavé zbarvení patrné jen na sliznicích a na části sklér kryté víčky (*subikterus*). Zbarvení kůže při mírnějších hyperbilirubinemiích nebývá vysloveně žluté, ale může připomínat opálení.

Hyperbilirubinemie může být způsobena nadprodukcí, poruchami metabolismu a vylučování bilirubinu na různých úrovních.

Podle **převažujícího typu bilirubinu** v krvi se rozlišují 3 základní skupiny hyperbilirubinemií:

- **nekonjugovaná** hyperbilirubinemie;
- **konjugovaná** hyperbilirubinemie;
- **smíšená** hyperbilirubinemie (tab. 1).

Obr. 8 Příčiny žloutenek



Podle **místa poruchy** vyvolávající hyperbilirubinemii se popisuje ikterus:

- **prehepatální (hemolytický)**, způsobený nejčastěji nadměrným vznikem nekonjugovaného bilirubinu u hemolytických anemií;
- **posthepatální (obstrukční)**, vznikající v důsledku obstrukce žlučových cest;
- **hepatocelulární (hepatální)**, vyvolaný poškozením nebo dysfunkcí hepatocytů.

Charakteristické nálezy žlučových barviv v séru a v moči u jednotlivých typů ikterů jsou uvedeny v tab. 2.

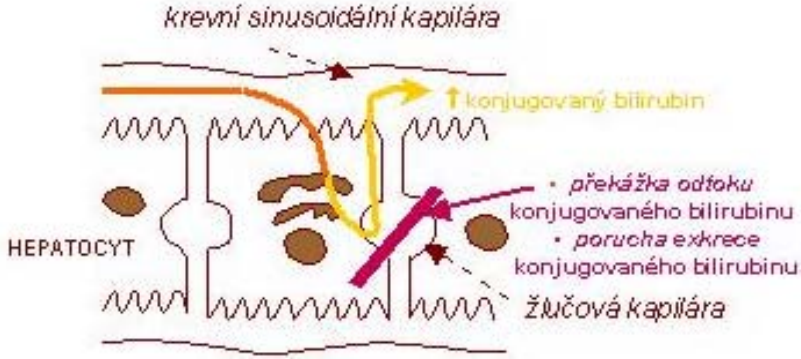
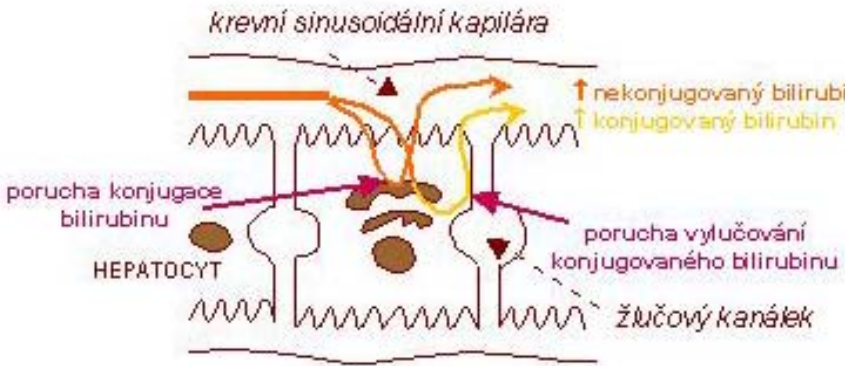
Tab. 2 Charakteristické nálezy žlučových barviv u jednotlivých typů ikterů

| Typ ikteru | Nález v séru | Nález v moči | | Barva moči | Barva stolice |
|------------------------|--------------------------------------|--------------|---------------------------------|------------|---------------|
| | Bilirubin | Bilirubin | Urobilinogen | | |
| Prehepatální | zvýšený nepřímý bilirubin | negativní | zvýšen | normální | tmavá |
| Posthepatální | zvýšený přímý bilirubin ⁴ | pozitivní | negativní (při úplné obstrukci) | tmavá | odbarvená |
| Hepatocelulární | zvýšený přímý i nepřímý bilirubin | pozitivní | zvýšen | tmavá | světlá |

⁴ Při déle trvajícím posthepatálním ikteru zpravidla dojde k druhotnému poškození funkce hepatocytů. Laboratorní nález pak odpovídá kombinaci posthepatálního a hepatocelulárního ikteru.

Tab. 1 Typy hyperbilirubinemií

| Typ | Mechanismus vzniku | | Výskyt (příklady) |
|---|---|---|--|
| <p>Nekonjugovaná hyperbilirubinemie</p> | <p>Při zvýšeném rozpadu erytrocytů se vytváří velké množství bilirubinu, který je zdravými játry konjugován a vylučován žlučí. Protože je však překročena vylučovací schopnost jater, dochází k hromadění nekonjugovaného bilirubinu v séru. Ve střevě vzniká větší množství urobilinogenu, který se zpětně resorbuje. Přesazení kapacity hepatocytů vychytávat urobilinogen je příčinou urobilinogenurie. Bilirubin v moči neprokazujeme.</p> <p>Jiná příčina nekonjugované hyperbilirubinemie může být na úrovni poruchy vychytávání bilirubinu na krevním pólu hepatocytu nebo porucha konjugace s kyselinou glukuronovou (není vyvinuta u novorozenců).</p> | <p>The top diagram illustrates a normal physiological process. It shows a 'krevní sinusoidální kapilára' (blood sinusoidal capillary) at the top and a 'žlučová kapilára' (bile capillary) at the bottom. An orange arrow labeled '↑ přívod nekonjugovaného bilirubinu' (increased input of unconjugated bilirubin) points from the blood capillary to a 'HEPATOCYT' (hepatocyte). Inside the hepatocyte, the bilirubin is processed, and a yellow arrow labeled '↑ nekonjugovaný bilirubin' (increased unconjugated bilirubin) points from the hepatocyte to the bile capillary, indicating excretion.</p> <p>The bottom diagram illustrates a pathological condition. It shows the same anatomical structures. An orange arrow labeled '↑ přívod nekonjugovaného bilirubinu' points to the hepatocyte. However, a red arrow labeled '↑ nekonjugovaný bilirubin' points from the hepatocyte back to the blood sinusoid, indicating a failure to excrete bilirubin. A label 'porucha konjugace bilirubinu' (bilirubin conjugation defect) points to the hepatocyte, indicating the site of the problem.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • hemolytická anemie • snížené vychytávání bilirubinu játry a porušená konjugace <ul style="list-style-type: none"> • fyziologická žloutenka novorozenců • žloutenka nedonošených • některé dědičné poruchy (např. Gilbertův syndrom, Crigler-Najjarův syndrom)¹ |

| | | | |
|--|--|---|--|
| <p>Konjugovaná hyperbilirubinemie</p> | <p>Je porušen odtok konjugovaného bilirubinu do žlučových cest, konjugovaný bilirubin prostupuje ze žlučových kapilár zpět do jaterních sinusoidů, do krve a poté do moči. Při úplném uzávěru je stolice světlá (acholická) a v moči nenalzááme žádný urobilinogen. Pokud v moči prokazujeme vedle bilirubinu i urobilinogen, znamená to, že obstrukce není úplná. Konjugovaná hyperbilirubinemie bývá provázána zvýšením katalytické koncentrace γ-glutamyltransferasy a alkalické fosfatasy.</p> |  | <ul style="list-style-type: none"> • obstrukce žlučových cest <ul style="list-style-type: none"> • cholelitiáza • nádory žlučových cest a hlavy pankreatu • porucha exkrece konjugovaného bilirubinu <ul style="list-style-type: none"> • některé dědičné poruchy (Dubin-Johnsonův a Rotorův syndrom) |
| <p>Smíšená hyperbilirubinemie</p> | <p>U onemocnění postihující především hepatocyty je porucha vylučování konjugovaného bilirubinu i porucha konjugace. V séru nalzááme zvýšení koncentrace nekonjugovaného i konjugovaného bilirubinu. Konjugovaný bilirubin přestupuje do moči. Poškozené hepatocyty nejsou schopny vycíhtávat všechny urobilinogen a ten přechází do moči.</p> |  | <ul style="list-style-type: none"> • virové hepatitidy • toxické poškození jater |

5

⁵ Upraveno podle: Leevy CM (editor) Evaluation of liver function, 2nd edition, Indianapolis, Lilly Research Laboratories, 1974.

Použitá literatura:

1. *Bubnová E., Buděšínská A., Křemen J., Stříbrná J.*: Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie, část III. Karolinum, Praha 1998.
2. *Burtis C.A., Ashwood E.R.*: Tietz Textbook of Clinical Biochemistry, 2nd edition. W.B.Saunders Company, Philadelphia 1994.
3. *Calbreath D.F.*: Clinical Chemistry. A Fundamentals Textbook. W.B. Saunders Company 1992.
4. *Doležalová V. a kolektiv*: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ, Brno 1995.
5. *Dzúrik R. a kolektiv*: Štandardná klinickobiochemická diagnostika. Osveta, Martin 1996.
6. *Chromý V., Fischer J.*: Analytické metody v klinické biochemii. Masarykova universita, Brno 2000.
7. *Kaplan L.A, Pesce A.J.*: Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 3rd edition. Mosby 1996.
8. *Kolektiv autorů*: Lékařská chemie a biochemie. Praktikum. Avicenum, Osveta, Praha 1991.
9. *Kraml J. a kolektiv*: Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie. Karolinum, Praha 1991.
10. *Leevy CM (editor)*: Evaluation of liver function, 2nd edition, Indianapolis, Lilly Research Laboratories, 1974
11. *Masopust J.*: Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. a II. část. Karolinum, Praha 1998.
12. *Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.*: Harperova biochemie. H+H, Praha 1998.
13. *Racek J. a kolektiv*: Klinická biochemie. Galén-Karolinum, Praha 1999.
14. *Schneiderka P. a kolektiv*: Stanovení analytů v klinické biochemii 1. část. Karolinum, Praha 1998.
15. *Schneiderka P. a kolektiv*: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Karolinum, Praha 1998.
16. *Táborská E., Tomandl J. a kolektiv*: Biochemie. Praktická cvičení. Masarykova universita, Brno 1998.
17. *Voet D., Voetová J. G.*: Biochemie. Victoria Publishing, Praha 1995.