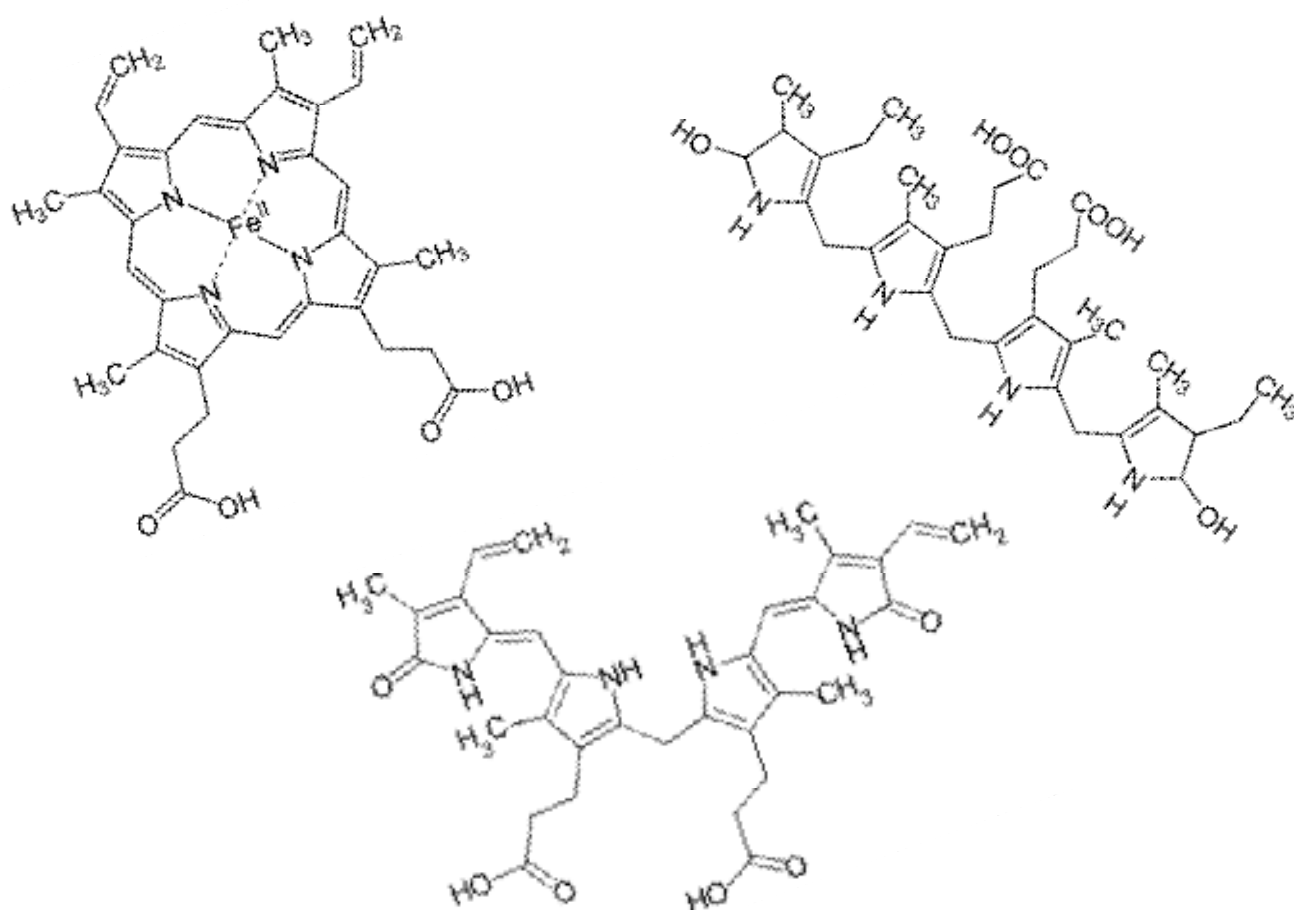


Tetrapyroly



Praktické cvičení z lékařské biochemie

Martin Leníček

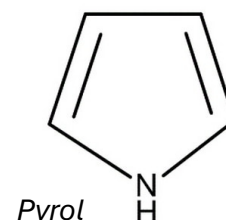
2025/2026

1. Tetrapyroly

1.1. Struktura a obecná charakteristika tetrapyrrolů

Tetrapyroly představují rozsáhlou skupinu biologicky významných sloučenin, jejichž základní strukturální jednotkou je pyrol.

Čtyři pyrolové kruhy jsou zde pospojovány methinovými můstky a vytvářejí buď lineární či cyklickou strukturu. Toto uspořádání vede ke vzniku rozsáhlého konjugovaného systému π -elektronů, zodpovědného za charakteristické fyzikálně-chemické vlastnosti tetrapyrrolů (viz barevnost a fluorescence).



Z biologického hlediska patří tetrapyroly mezi klíčové molekuly metabolismu. Uplatňují se v transportu plynů, přenosu elektronů, detoxikačních procesech i v regulaci buněčných funkcí. Nás budou zajímat porfyriny (porfyrinogeny) a jejich kovové komplexy (zejména hem), jakožto zástupci cyklických tetrapyrrolů, a dále lineární tetrapyroly, vznikající při jejich katabolismu (zejména bilirubin).

1.2. Barevnost tetrapyrrolů

Řada látek obsahuje valenční elektron, který může být excitován do vyšší energetické hladiny elektromagnetickým zářením. Taková látka pak absorbuje záření o určité vlnové délce s energií fotonů odpovídající rozdílu energií obou elektronových hladin. Pokud absorbované záření leží ve viditelné části spektra (cca 380-780 nm), bude se lidskému oku látka jevit barevná (bude mít barvu doplňkovou k barvě absorbovaného světla).

Barevné bývají například látky obsahující řetězec střídajících se dvojných vazeb (**konjugovaný systém**), jejichž molekula není symetrická.

Pokud by molekula byla zcela symetrická, mohly by elektrony „kmitat“ mezi dvěma rezonančními uspořádáními se stejnou energií která mají stejnou energii – žádné světlo se přitom selektivně nepohlcuje a látka nemusí být barevná:



Jakmile se však k tomuto systému připojí asymetrický substituent, symetrie se naruší. Jedno z rezonančních uspořádání je pak energeticky výhodnější než druhé. Rozdíl mezi těmito dvěma energetickými stavy často odpovídá energii fotonu viditelného světla, takže molekula světlo určité barvy absorbuje – tu pak vnímáme jako barevnou. Typickými zástupci mohou být azobarviva ($-N=N-$). Podobně se chovají i látky s aromatickými či heterocyklickými strukturami vázanými na společný centrální atom (např. trifenylmetanová barviva).

Absorbovaná vlnová délka (nm)		Odpovídající barva	Doplňková barva	
380–435		fialová	žlutozelená	
435–480		modrá	žlutá	
480–490		zelenomodrá	oranžová	
490–500		modrozelená	červená	
500–560		zelená	purpurová	
560–580		žlutozelená	fialová	
580–595		žlutá	modrá	
595–650		oranžová	zelenomodrá	
650–760		červená	modrozelená	

Značná část tetrapyrrolů je barevná právě díky rozsáhlému systému konjugovaných dvojných vazeb. Přesná poloha absorpčních maxim (tj. výsledná barva) závisí na mnoha faktorech a jen velmi obtížně se předpovídá. U porfyrinů je typickým rysem přítomnost intenzivního absorpčního maxima označovaného jako Soretův pás, které se nachází v oblasti modré části spektra (cca 400-430 nm).

Barevnost tetrapyrrolů má nejen estetický, ale i funkční význam. Umožňuje například efektivní absorpci světla nebo je základem analytických metod, které se běžně využívají v laboratorní diagnostice.

1.3 Fluorescence tetrapyrrolů

Kromě absorpce světla mohou některé tetrapyroly vykazovat také fluorescenci. To je fyzikální jev, při kterém molekula po absorpci fotonu přechází do excitovaného stavu a následně se vrací do základního stavu za emise fotonu o nižší energii (tedy o delší vlnové délce). *Zjednodušeně řečeno: zářením excitovaný elektron si svou nově nabytou energii dlouho neudrží a potřebuje se jí zbavit. Jednou z možností je její vyzáření do okolí – v důsledku energetických ztrát je vyzářená energie vždy o něco nižší, než ta původně absorbovaná.*

Schopnost fluoreskovat závisí na struktuře molekuly a na možnostech “ztráty” absorbované energie. Je-li molekula rigidní (cyklické tetrapyroly jsou pevné dost), má menší schopnost energii vytrátit rotací či vibrací a pravděpodobnost fluorescence roste. Naopak, jsou-li v molekule přítomny “zhášače” fluorescence (např. volné elektronové páry, kovové ionty – zejména přechodných kovů s d-elektrony), fluorescenci nejspíš neuvidíme. Železo patří mezi velmi silné zhášače, hem tudíž nefluoreskuje, zatímco protoporfyrin IX (v zásadě hem bez železnatého iontu) fluoreskuje poměrně výrazně.

2. Hem

2.1. Biosyntéza hemu, porfyrie

Hem je velmi často tzv. prostetickou skupinou, tedy malou molekulou pevně vázanou na bílkovinu, bez níž by protein nebyl funkční. Je součástí tzv. hemoproteinů, které hrají klíčovou roli při transportu a skladování kyslíku (hemoglobin, myoglobin), transportu elektronů v dýchacím řetězci (cytochrom c), při biotransformacích (cytochrom P450) a v dalších biologických procesech. Tato biosyntetická dráha probíhá převážně v hepatocytech a v erytroidních prekurzorech kostní dřeně a zahrnuje řadu enzymatických kroků, které probíhají střídavě v mitochondriích a cytosolu. Za fyziologických podmínek je biosyntéza hemu přesně regulována tak, aby odpovídala potřebám organismu. Meziprodukty této dráhy, tzv. porfyrinové intermediáty, se za normálních okolností nehromadí a jsou rychle přeměňovány na finální produkt – hem.

Dojde-li k depleci některého z enzymů biosyntetické dráhy hemu, dochází k hromadění meziproduktů před místem defektu s možným toxickým vlivem na okolní tkáň. Tuto skupinu onemocnění označujeme souhrnně jako porfyrie. Klinický obraz porfyrií je variabilní a závisí na typu nahromaděné látky. Některé porfyrie se projevují především neurologickými symptomy, jako jsou kolikovitě bolesti břicha, neuropatie nebo psychiatrické poruchy, zatímco jiné jsou charakterizovány kožní fotosenzitivitou provázenou tvorbou puchýřů. Diagnostika porfyrií vychází z laboratorního průkazu porfyrinů v moči, krvi nebo stolici a z jejich charakteristických absorpčních a fluorescenčních vlastností.

Fotodynamická terapie

Za fotosenzitivitu je zodpovědná fluorescence porfyrinů (viz výše). Energie vyzářená porfyrinem ve formě fluorescenčního záření může excitovat kyslík v okolních molekulách a vést ke vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS), které poškodí struktury v blízkém okolí. Toho se dá s výhodou využít při takzvané fotodynamické terapii nádorů. Fotosenzitizér (typicky derivát porfyrinu) se lokálně či systémově podá pacientovi, po následném ozáření světlem příslušné vlnové délky dojde k masivní produkci ROS, které nádorovou tkáň zničí.

2.2. Hemoglobin a jeho deriváty

Hemoglobin je tetramerní protein, který se nachází v erytrocytech a zajišťuje transport kyslíku z plic do periferních tkání. Je tvořen čtyřmi globinovými řetězci, z nichž každý obsahuje jednu hemovou skupinu. V centru hemové skupiny se nachází ion železa ve formě Fe^{2+} , který je schopen reverzibilně vázat molekulární kyslík. Vazba kyslíku na hemoglobin je kooperativní proces, což znamená, že navázání jedné molekuly kyslíku usnadňuje vazbu dalších molekul. Tato vlastnost umožňuje efektivní nasycení hemoglobinu v plicích a jeho uvolňování v periferních tkáních.

- Hemoglobin nesoucí kyslík se označuje jako **oxyhemoglobin (oxyHb)**. Každá molekula Hb může vázat 4 molekuly kyslíku.
- Po uvolnění kyslíku hovoříme o **deoxyhemoglobinu (deoxyHb)**. Oxygenace molekuly hemoglobinu mění elektronový stav komplexu Fe^{2+} -hem, což se projeví změnou barvy tmavě červeného odstínu typického pro žilní krev na jasně červenou barvu tepenné krve.
- Jako **karbaminohemoglobin** označujeme hemoglobin, na kterém je navázaný oxid uhličitý. Ten se váže na globinový řetězec (tj. nikoli na hem) -jeho navázání snižuje afinitu hemoglobinu ke kyslíku, a tak usnadňuje uvolnění kyslíku v periferní tkáni.
- V molekule **methemoglobinu (metHb)** je dvojmocné železo oxidováno na trojmocné, a methemoglobin tak ztrácí schopnost reverzibilní vazby kyslíku. Za fyziologických podmínek je v erytrocytech přítomen jen ve velmi malém množství (asi do 3 %). Vzniká zejména působením dusitanů, vznikajících z dusičnanů obsažených v potravě či nekvalitní pitné vodě, ale může být způsobena i otravou některými toxickými látkami (anilin) či léky (sulfonamidy). Erytrocyt je vybaven enzymy na zpětnou redukci methemoglobinu na hemoglobin (NADH-dependentní methemoglobinreduktáza a méně významná NADPH-dependentní methemoglobinreduktáza). Redukci umožňuje i například glutathion či kyselina askorbová.

Methemoglobinémie

Kvůli nezralosti redukčních enzymových systémů erytrocytů a zvýšeného podílu fetálního hemoglobinu, který je náchylný k oxidaci, jsou vznikem vysokých koncentrací methemoglobinu (tzv. methemoglobinémií) ohroženi zejména novorozenci. Tento stav se může klinicky projevit jako tzv. **blue baby syndrom**, tedy výraznou cyanózou způsobenou sníženou schopností hemoglobinu přenášet kyslík. Methemoglobinémie se dále projevuje dušností, únavou a bolestmi hlavy, těžká forma (>70 % metHb) může mít i letální průběh.

- **Karbonylhemoglobin** (COHb, někdy též karboxyhemoglobin) vzniká vazbou oxidu uhelnatého na hemoglobin. Tato vazba je ve srovnání s vazbou kyslíku asi 200 - 300x silnější, proto pobyt v prostředí i s nízkou koncentrací CO může vést k tvorbě značného množství COHb. Karbonylhemoglobin nemůže transportovat kyslík a v důsledku snížené schopnosti krve přenášet kyslík se vyvíjí buněčná hypoxie. Oxid uhelnatý lze z hemoglobinu vytěsnit nadbytkem kyslíku, takže inhalace O₂ je při otravě CO zásadním léčebným postupem. V malém množství se COHb může vyskytnout i u zdravých osob. U obyvatel měst se prokazují hodnoty kolem 2 %, u silných kuřáků může podíl COHb stoupnout až na 10 % z celkového hemoglobinu.

Pozor: Nezaměňujte procenta COHb s procenty CO ve vdechovaném vzduchu. Už velmi nízké koncentrace CO ve vzduchu jsou totiž toxické a v závislosti na době expozice vedou k tvorbě značného množství CoHb. Při 0,01 % CO se mohou objevit bolesti hlavy, únava a malátnost, 0,1 % CO je život ohrožující a 10 % CO vede k okamžité smrti.

Různé deriváty hemoglobinu se liší nejen funkčně, ale i svými optickými vlastnostmi. Jejich absorpční maxima se často výrazně liší, čehož lze s výhodou využít při spektrofotometrickém odlišení jednotlivých klinicky důležitých derivátů.

Derivát hemoglobinu	Absorpční maxima (nm)*
Oxyhemoglobin	(414), 541, 576
Deoxyhemoglobin	(431), 555
Methemoglobin	(404), 500, 622
Kyanmethemoglobin	(421), 540
Karbonylhemoglobin	(420), 539, 568

**V závorce je uvedeno absorpční maximum v oblasti tzv. Soretova pásu. Ač je nejvýraznější, v klinické praxi se nepoužívá – je natolik intenzivní, že má tendenci vysytit detektor a není příliš stabilní.*

2.3. Laboratorní stanovení celkového hemoglobinu

Stanovení celkového hemoglobinu v krvi patří k základním laboratorním vyšetřením, které je klíčové při diagnostice anémie (tzv. chudokrevnosti, kde koncentrace celkového hemoglobinu je pod referenčním rozmezím), či vzácnější polycytemie (polyglobulie, koncentrace hemoglobinu je vyšší než referenční rozmezí).

Při tomto vyšetření jsou různé optické vlastnosti jednotlivých derivátů hemoglobinu na překážku (venózní krev obvykle obsahuje směs oxy a deoxyhemoglobinu s výrazně odlišnými absorpčními spektry). Při laboratorním stanovení tak nejprve oxidujeme dvojmocné železo na trojmocné (nejčastěji ferrikyanidem draselným) za vzniku methemoglobinu, který pomocí KCN dále převedeme na **kyanmethemoglobin**. Ten je velmi stabilní a vhodný pro spektrofotometrické stanovení.

Příčiny změn koncentrace celkového hemoglobinu v krvi

Snížená koncentrace hemoglobinu (anémie)

- snížená tvorba erytrocytů (např. nedostatek železa, vitamínu B₁₂ nebo kyseliny listové)
- zvýšená ztráta erytrocytů (krvácení),
- zvýšený rozpad erytrocytů (hemolytické anémie).

Klinicky se snížený hemoglobin projevuje sníženou dodávkou kyslíku do tkání, což vede k únavě, dušnosti, tachykardii, bledosti a při těžkých formách k orgánové hypoxii.

Zvýšená koncentrace hemoglobinu (polycytémie)

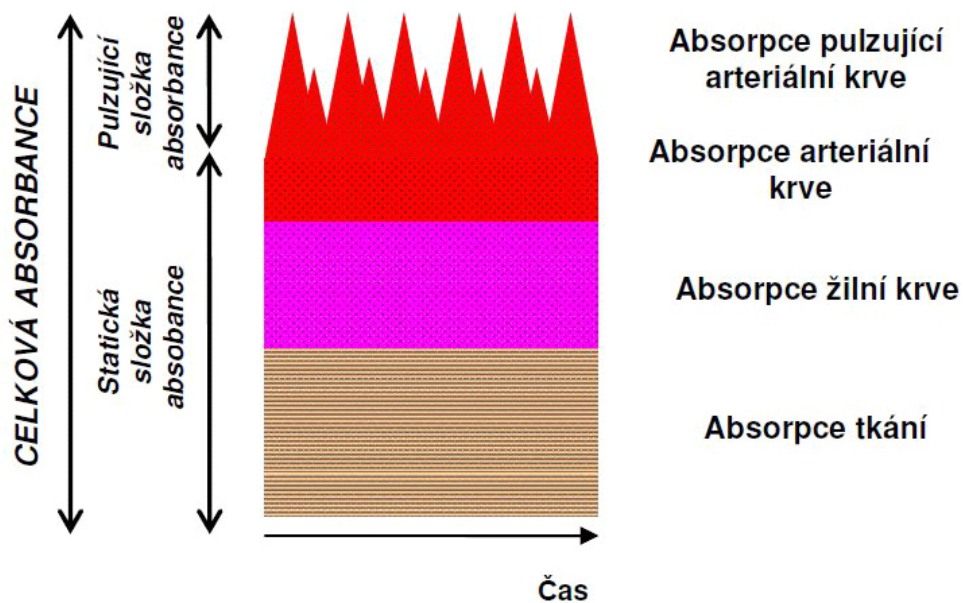
- relativní, například při dehydrataci
- absolutní, při zvýšené produkci erytrocytů

Se zvýšenou koncentrací hemoglobinu se setkáváme zřídka, mezi typické příčiny absolutní polycytémie patří chronická hypoxie (např. plicní onemocnění, pobyt ve vysoké nadmořské výšce), polycythemia vera (proliferace pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně), u sportovců pak i doping. Zvýšená koncentrace hemoglobinu vede ke zvýšení viskozity krve, což zvyšuje riziko trombózy a kardiovaskulárních komplikací.

2.4. Pulzní oxymetrie

Pulzní oxymetrie je neinvazivní metoda, která umožňuje stanovení saturace hemoglobinu arteriální krve kyslíkem přímo u pacienta. Metoda využívá rozdílnou absorpci světla oxyhemoglobinem a deoxyhemoglobinem při dvou odlišných vlnových délkách (660 nm pro deoxyHb, 940 nm pro oxyHb), které relativně dobře prostupují tkáněmi.

Při měření se zdroj světla a detektor umístí na dobře prokrvenou část těla (typicky prst či ušní lalůček) a v reálném čase se měří úbytek intenzity světla po průchodu tkání. Tzv **statická složka absorbance** (daná absorpcí ve tkáních, žilní krvi a částečně i krvi arteriální) se neposuzuje, vyhodnocuje se pouze **pulzující složka absorbance**, za kterou je zodpovědná výhradně pulzující arteriální krev.



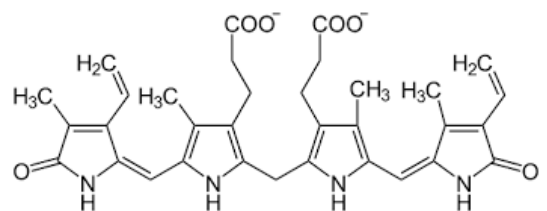
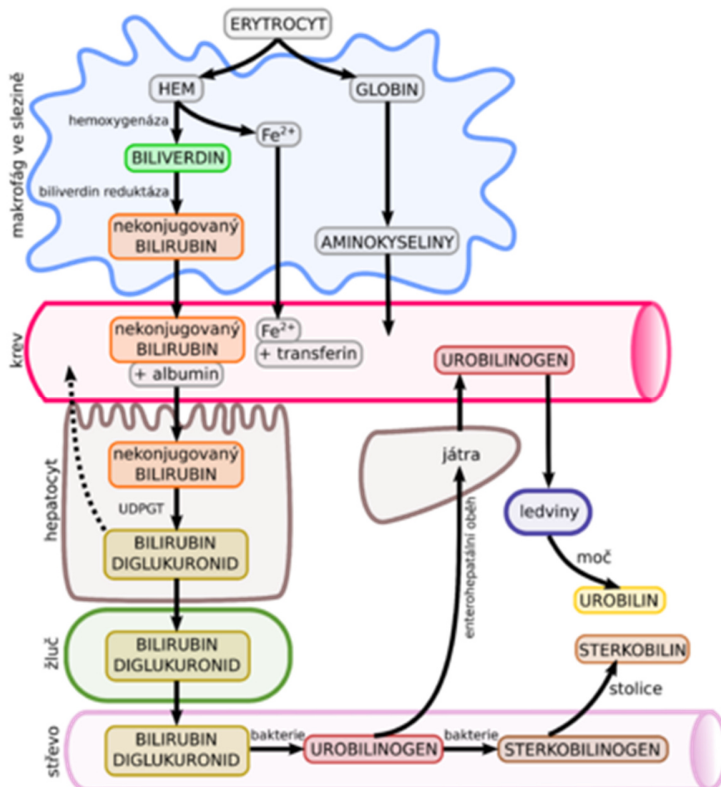
3. Bilirubin

3.1. Metabolismus bilirubinu

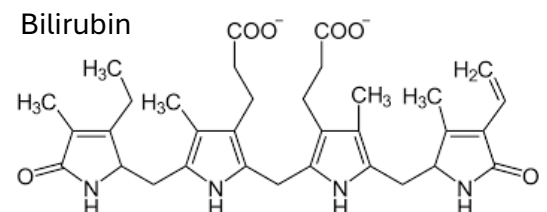
Bilirubin je lineární tetrapyrrol vznikající při katabolismu hemu. Ten probíhá převážně ve slezině a dalších orgánech retikuloendotelového systému, kde dochází k odbourávání stárnoucích erytrocytů. Hem je nejprve přeměněn na biliverdin a vzápětí redukován na bilirubin. Ten je prakticky nerozpustný ve vodě a do jater tak musí být transportován navázaný (nekovalentně) na albumin.

V játrech je bilirubin konjugován (typicky dvěma molekulami kyseliny glukuronové-bilirubindiglukosiduronát), vzniklý konjugovaný bilirubin je ve vodě rozpustný a spolu se žlučí je vyloučen do střeva. V tlustém střevě činností bakterií nejprve přichází o zbytky kyseliny glukuronové, potom je postupně redukován na **urobilinogen** a dále na **sterkobilinogen**. Ty se spontánně oxidují na žlutooranžový **urobilin** a hnědý **sterkobilin** a jsou vyloučeny stolicí (zejména sterkobilin dodává stolici její charakteristickou barvu).

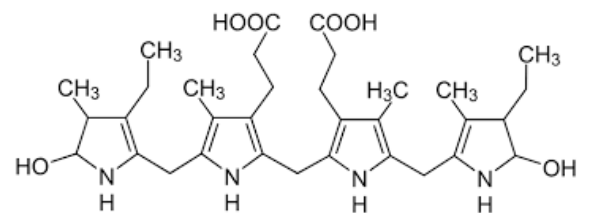
Menší část urobilinogenu (cca 20 %) podléhá tzv. enterohepatální cirkulaci (tj. je vstřebávána ze střeva, portální krví se vrací do jater a je opět vyloučena žlučí). Část urobilinogenu, která unikne vychytání játry z portální krve, se vyloučí močí (opět se může spontánně oxidovat na urobilin). Za fyziologických okolností jsou ho v moči jen stopy.



Bilirubin



Urobilin



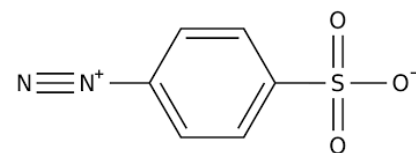
Sterkobilin

Rozpustnost bilirubinu

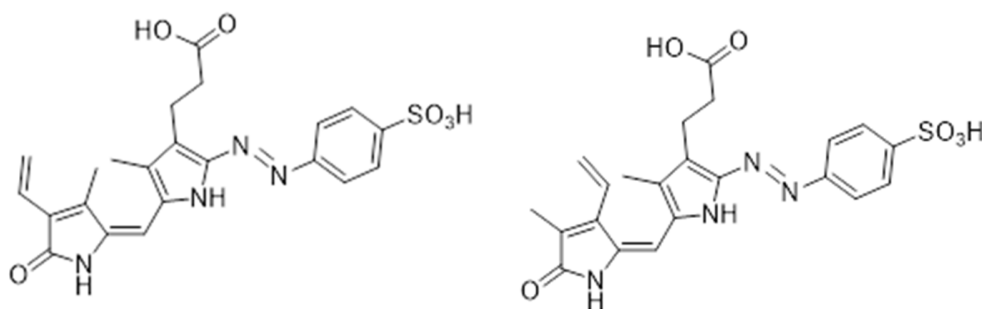
Při pohledu na vzorec bilirubin nevypadá jako vyloženě hydrofobní molekula. Dvě karboxylové a dvě keto skupiny by měly být solidní zárukou alespoň částečné rozpustnosti ve vodě (např. biliverdin, lišící se od bilirubinu jen přítomností jedné dvojně vazby navíc, polární je). Ve skutečnosti je prostorové uspořádání molekuly bilirubinu takové, že všechny polární skupiny jsou "obsazeny" vnitromolekulárními vodíkovými můstky a prostor pro interakci s vodou tak nezbývá.

3.2. Laboratorní stanovení bilirubinu

V běžné laboratorní diagnostice se nejčastěji používá reakce s diazotovanou kyselinou sulfanilovou. Molekula bilirubinu se rozštěpí na dva dipyroyly, které se navážou na azoskupinu diazotované kyseliny sulfanilové za vzniku dvou izomerů azobilirubinu (bilirubin není symetrický, proto vznikají dva izomery).



Diazotovaná kyselina sulfanilová



Izomery azobilirubinu

Dvojně vazby kyseliny spolu s dvojnými vazbami dipyrolů vytvoří konjugovaný systém, zodpovědný za výslednou barvu produktu (ta závisí na pH – v kyselém prostředí je červený, v zásaditém modrozelený), jejíž intenzita je přímo úměrná výchozí koncentraci bilirubinu.

Reakce běží ve vodném prostředí, reaguje tedy jen ve vodě rozpustný konjugovaný bilirubin. Pro analýzu celkového bilirubinu je třeba přidat akcelerátor (metanol, kofein, benzoát,...), který bilirubin vytěsňuje z vazby na albumin. Proto se v praxi setkáváme s tzv. **přímým bilirubinem** (tj. konjugovaným - reaguje přímo, bez akceleratoru) a **nepřímým** (tj. celkovým - absorpce byla získána až po přidání akceleratoru). Odlišení konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu je pro diagnostiku klíčové (viz ikterus).

Klinický význam bilirubinu

Po narození dochází k rozpadu značného množství erytrocytů s vysokou tvorbou bilirubinu. Nezralé konjugální systémy novorozence tento nápor nezvládají a dochází k tzv. **novorozeneckému ikteru**. Ten je většinou případů benigní a přechodný. Pokud však koncentrace nekonjugovaného bilirubinu překročí určitou mez (při koncentracích nad 340 $\mu\text{mol/l}$ hovoříme o těžké novorozenecké žloutence), může bilirubin pronikat hematoencefalickou bariérou a ukládat se v mozkové tkáni (zejména v bazálních gangliích). Tento stav, označovaný jako **jádrový ikterus**, může vést k trvalému neurologickému poškození nebo dokonce smrti. Základním terapeutickým přístupem je fototerapie, při níž dochází k přeměně bilirubinu na vodorozpuštěnější izomery (zejména lumirubin), které mohou být vyloučeny bez nutnosti jaterní konjugace.

V běžné praxi se setkáváme spíše s mírnějšími elevacemi bilirubinu, které nám slouží jako užitečný marker postižení jater.

Ač byl bilirubin dlouho považován za toxický odpadní produkt metabolismu hemu, dnes víme, že patří k nejvýznamnějším endogenním antioxidantům. Mírné zvýšení nekonjugovaného bilirubinu (často podmíněné geneticky) tak působí protektivně.

3.3. Ikterus

Při zvýšení sérové koncentrace bilirubinu nad cca 35 $\mu\text{mol/l}$ (horní mez referenčního rozmezí je cca 17 $\mu\text{mol/l}$) se objevuje žlutavé zbarvení sklér, sliznic či kůže – ikterus. Z patofyziologického hlediska odlišujeme tři typy ikterů.

- Při **prehepatálním ikteru** vzniká více bilirubinu (například při hemolýze), který ani zdravá játra nestíhají konjugovat,
- při **hepatálním ikteru** je problém přímo v játrech (virová hepatitida, toxické poškození), která nestíhají konjugovat a následně ani vyloučit běžná množství bilirubinu.
- Při poruše toku žluči (obstrukce žlučovéhoodu) se již vyloučený konjugovaný bilirubin vrací ze žluči do jater a přechází do séra – zde mluvíme o **posthepatálním ikteru**.

Ikterus	Bilirubin v séru		Moč			Stolice
	Přímý	Nepřímý	Bilirubin	Urobilinogen	Barva	Barva
Prehepatální	Norm	++	-	+	Norm	Tmavá
Hepatální	+	+/++	+	+/-	Tmavší	Norm/světlejší
Posthepatální	++	Norm/+	++	-	Tmavá	Světlá/acholická

Povšimněte si, že bilirubin se v moči objevuje pouze v případě, že je v séru vyšší koncentrace přímého bilirubinu (tj. konjugovaného). Nekonjugovaný je transportován na albuminu, který glomerulární membránou neprojde.

Vzácné či opomíjené formy bilirubinu

Zvláštní význam má **delta-bilirubin**, který vzniká kovalentní vazbou konjugovaného bilirubinu na albumin (při protrahované konjugované hyperbilirubině – např. obstrukci žlučových cest). Nevylučuje se ani do moči ani do žluči a jeho poločas je závislý na poločasu albuminu. To může být příčinou diagnostických rozpaků, když po odstranění překážky ve žlučovodu nedochází k rychlému poklesu hyperbilirubinémie. Delta-bilirubin reaguje jako přímý bilirubin, ale narozdíl od něj neprochází glomerulární membránou a není detekovatelný v moči.

Nekonjugovaný bilirubin v séru je (nekovaleně) navázán na albumin (částečně i na apolipoprotein D v HDL-lipoproteinu). Jen velmi malá část (typicky méně než 1 %) je v séru rozpuštěna – tu frakci označujeme jako **volný bilirubin** (Bf). Právě ten je zodpovědný za pronikání bilirubinu do tkání (tj. nebezpečný pro novorozence) a tudíž diagnosticky či prognosticky významný. Jeho stanovení však zatím v klinické praxi není dostupné.

Text byl vypracován s využitím Wikiskript a ChatGPT. Odbornou revizi provedla Doc. MUDr. Lucie Muchová, PhD. Obrázky převzaty z Wikiskript, Wikipedie, vzorce azobilirubinu nakreslil Ondřej Mucha.