

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

GILBETŮV SYNDROM
GILBERT SYNDROM

Diplomová práce

Eva Šimáková

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.

Duben 2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Miloslava Kuklíka, CSc. V diplomové práci jsem použila informační zdroje uvedené v seznamu.

V Praze dne

.....

podpis

Poděkování

Za odborné vedení a podporu při řešení problematiky diplomové práce děkuji MUDr. Miloslavu Kuklíkovi, CSc. Za poskytnutí odborných informací děkuji MUDr. Martině Novákové a MUDr. Janu Benešovi, za pomoc při statistickém zpracování děkuji ing. Aleně Dohnalové. Poděkování patří i všem zaměstnancům firmy GENVIA s.r.o.

OBSAH

1. ÚVOD

- 1.1 Gilbertův syndrom
- 1.2 Játra a žlučové cesty
- 1.3 Bilirubin
- 1.4 Laboratorní hodnoty
- 1.5 Diferenciální diagnostika
- 1.6 Prevence, popř. léčba
- 1.7 Antioxidanty

2. CÍL PRÁCE

- 2.1 Heterozygot vs. homozygot
- 2.2 Bilirubin v lékařství
- 2.3 GS a oxidativní stres

3. METODIKA

- 3.1 Soubor vyšetřených pacientů
- 3.2 Vyšetřovací metody
- 3.3 Genealogické vyhodnocení

4. VÝSLEDKY

5. DISKUSE

- 5.1 Bilirubin, farmakogenetika a medicína
- 5.2 Alternativní zdroje bilirubinu
- 5.3 Diagnóza GS
- 5.4 Bilirubin a oxidativní stres

6. ZÁVĚR

7. SEZNAM LITERATURY

8. PŘÍLOHY

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

ATP – adenosintrifosfát
DNA – kyselina deoxyribonukleová
RNA – kyselina ribonukleová
A – adenin
C – cytosin
G – guanin
T – thymin
U -uracil
GS – Gilbertův syndrom
TF – transkripční faktor
AA – aminokyselina
AR – autosomálně recesivní dědičnost
UGT - uridindifosfát
HA – hemolytická anemie
SOD – superoxiddismutáza
ATP – adenosintrifosfát
ADP – adenosindifosfát
dx. - dextra
sin. - sinistra
v. - véna
a. - arterie
vv. - venae
aa. - arterie
RA – rodinná anamnéza
v.c.inf. - vena cava inferior
v.c.sup. - vena cava superior
m. - musculus
LDH - laktátdehydrogenasa
ALT - alaniaminotransferáza
AST - aspartátaminotransferáza
GMT- gamaglutamyltransferáza
ALP – alkalická fosfatáza
CHE – cholecystektomie
VLDL – very low density lipoproteins (lipoproteiny o velmi nízké hustotě)
LDL – low density lipoproteins
HDL – high density lipoproteins

ABSTRAKT

Diplomová práce se zaměřuje na určení genealogické frekvence homo- a heterozygotů u mutací v promotorové oblasti UGT 1A1 genu, tj. mutaci typické pro Gilbertův syndrom. Vysvětluje vznik, symptomy, patologii i terapii tohoto syndromu. Diskuse zahrnuje možný ochranný účinek této polymorfni mutace, který se může projevit sníženou četností cévních onemocnění (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, ateroskleróza, plicní embolie atd.). Významný je rovněž podíl na snížení stresu při hyperbilirubinémii. Práce byla prováděna ve spolupráci s laboratoří GENVIA s.r.o.

ABSTRACT

The main focus of this thesis is to assess a genealogical frequency of homo- and heterozygotes for a mutation in a promoter region of UGT 1A1 gene. This mutation is typical for Gilbert's syndrome. It explains a genesis, symptoms, pathology and also a therapy of this syndrome. It discusses a possibly protective effect of this polymorphic mutation that might result in a lower incidence of vascular diseases (myocardial infarction, stroke, atherosclerosis, pulmonary embolism). An important contribution is also an attenuation of stress due to hyperbilirubinaemia. This thesis was worked out in a cooperation with GENVIA Ltd.

1. ÚVOD

1.1 Gilbertův syndrom

Gilbertův syndrom (Meulengrachtův nebo Gilbert-Meulengrachtův syndrom) je dědičná porucha metabolismu bilirubinu. Syndrom se projevuje především zežloutnutím kůže a očního bělma v důsledku ukládání přebytečného bilirubinu do tkání. Pacienta neohrožuje na životě.

Gilbertův syndrom byl objeven Augustinem Nicolasem Gilbertem v Paříži roku 1901, v Německu byl popsán Jensem Dinárem Meulengrachtem.

Příznaky GS:

- Celkový, nekonjugovaný bilirubin $\geq 21 \mu\text{mol/l}$
- únava, slabost
- tlak pod pravým žeberním obloukem
- žluté zbarvení kůže, sliznic a bělimy očí
- cca 30% zastoupení monokonjugátu ve žluči

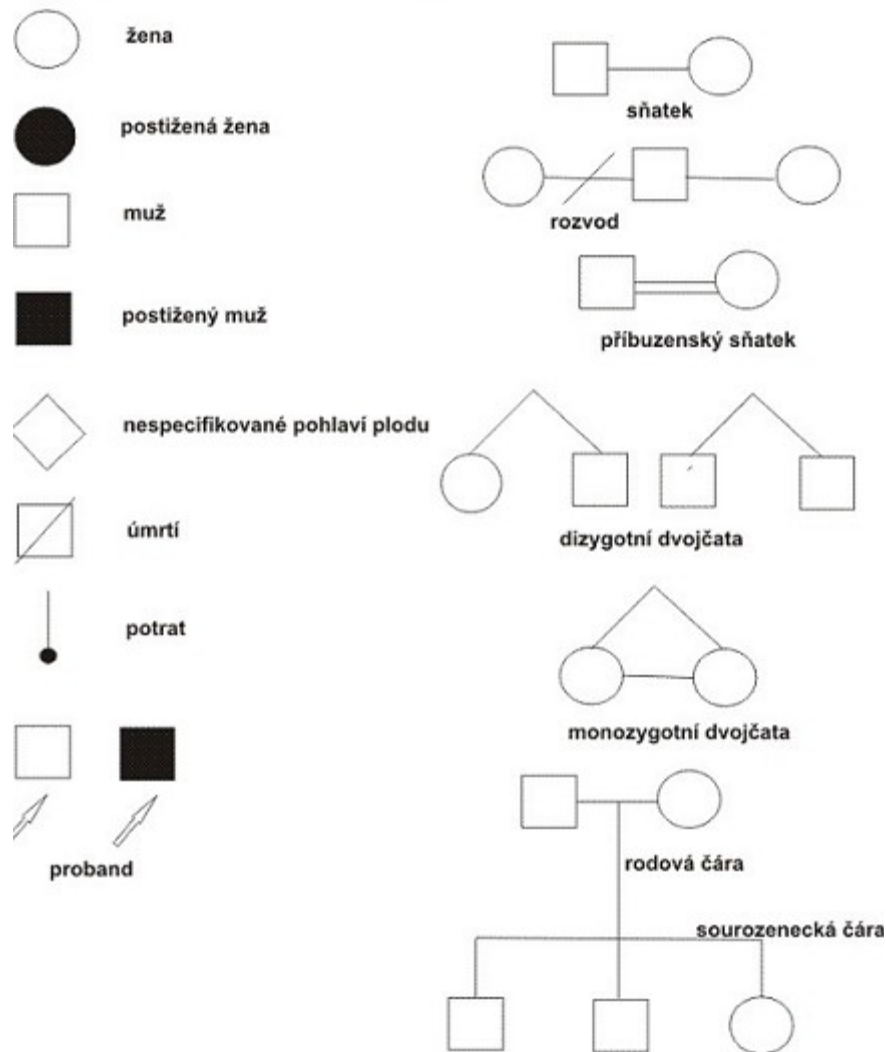
Příčina GS

- inzerce TA sekvence v TATA boxu v promotorové oblasti UGT 1A1 genu – v 90%, v 10% to může být mutace jiného, sousedícího genu
- snížená aktivita enzymu UDP-glucuronosyltransferasy

Inzerce znamená vložení chromosového segmentu na kterékoli místo jiného nebo téhož chromosomu. Tato přestavba vyžaduje nejméně tři zlomy a postihuje jeden nebo dva chromosomy. Inertovaný úsek může být na novém místě v normální nebo obrácené poloze. Inzerce je balancovaná přestavba bez ovlivnění fenotypu. Při postižení dvou různých chromosomů představuje pro svého nositele 50% riziko tvorby nebalancovaných gamet, nesoucích buď deletovaný nebo insertovaný chromosom. (1) Rodokmenové údaje (tj. genealogie) se staly klíčovými pro zpracování tématu GS. Genealogie slouží jak k pochopení genetických zákonitostí přenosu určitého znaku, tak i pro využití v klinické genetice v oblasti genetického poradenství. Osoba, která vedla

k výběru určité rodiny je označována jako proband. Probandem může být jak postižený jedinec, tak zdravý jedinec z rodiny s možnou dědičnou zátěží (děděnou chorobou). Údaje jsou zaznamenány graficky formou genealogického schématu (viz. obr.č.1). (16)

Pro sestavování rodokmenů se používají níže uvedené značky: (obr.č.1)



Při sestavování genealogického schématu je nanejvýše vhodné analyzovat min. 3 generace (tj. prarodiče, rodiče, potomci) včetně příbuzných (tj. bratr, neteř, teta, atd.). Nesmíme zapomínat na nemanželské potomky, bývalé manžely či manželky. Zaznamenává se samozřejmě potrat či úmrtí.

Připomenu základy molekulární dědičnosti, abych přiblížila mechanismus vzniku GS. Původně Griffith a později O.T.Avery a jeho spolupracovníci dokázali úspěšným pokusem transformace, že nositelem genetické informace je deoxyribonukleová kyselina (DNA). Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky, které uchovávají a přenášejí (expres) genetickou informaci. Zaručují, že dceřiné buňky budou mít tytéž vlastnosti jako buňka mateřská a že rostlinný a živočišný druh v procesu reprodukce zachová sám sebe bez podstatných změn. (17)

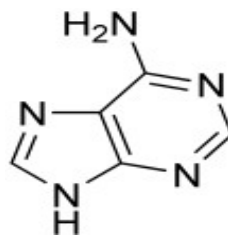
Nukleové kyseliny jsou polynukleotidy, skládají se ze základních jednotek nukleotidů. Nukleotid se skládá ze 3 základních složek:

- a) zbytku kyseliny ortofosforečné
- b) pětiuhlíkatého cukru (pentosy)
- c) dusíkaté báze

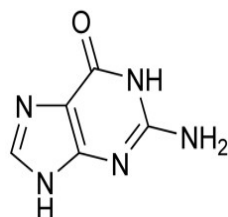
Podle druhu pentosy rozlišujeme kyselinu deoxyribonukleovou (DNA, obsahuje deoxyribosu) a kyselinu ribonukleovou (RNA, obsahuje ribosu).

Dusíkaté báze jsou heterocyklické sloučeniny odvozené buď od pyrimidinu (tj. cytosin (C), thymin (T) a uracil (U)). Nebo jsou odvozené od purinu, tj. adenin (A) a guanin (G). Nukleotid vzniká připojením zbytku kyseliny fosforečné esterickou vazbou na pozici 5-pentosy. (soubor obr. č. 2)

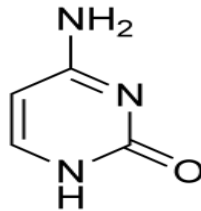
ADENIN



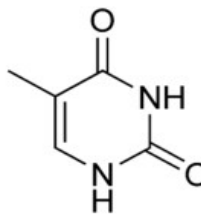
GUANIN



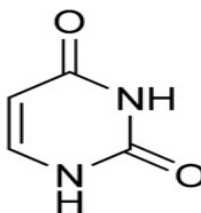
CYTOSIN



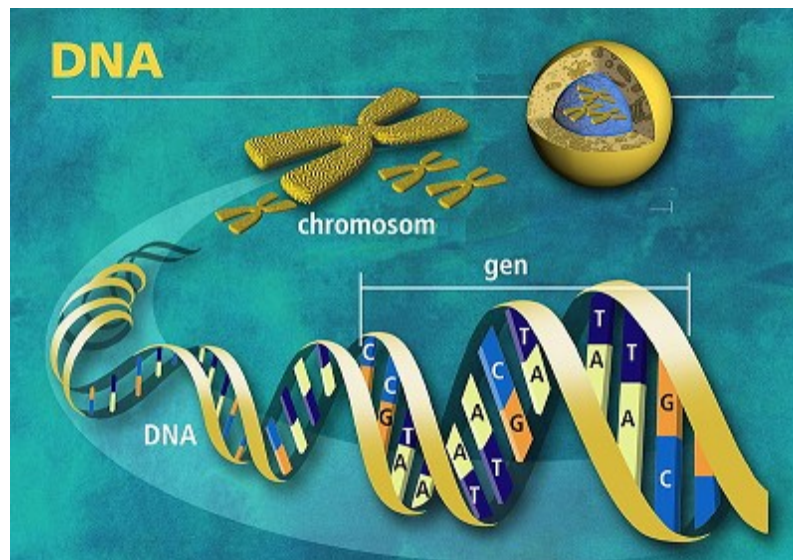
THYMIN



URACIL



Dvoušroubovice vzniká na základě vazeb pomocí vodíkových můstků mezi bázemi, které jsou vůči sobě komplementární (viz.obr.3)



Má-li DNA sloužit jako matrice pro syntézu RNA, musí se nejprve obě vlákna molekuly DNA od sebe oddělit, tj. denaturovat.

Před každým mitotickým dělením se molekuly DNA musí zdvojit. Zdvojování molekul DNA a přechod jejich nově vzniklých kopií do dceřiných buněk při každé mitóze znamená, že se do všech buněk organismu přenáší genetické informace z generace na generaci. Při mitóze se přenos genu z mateřské buňky do buněk dceřiných zabezpečuje replikací DNA.

Replikací rozumíme přenos informace z DNA do DNA. Jedná se o tzv. semikonservativní proces, kdy nově vzniklá dvoušroubovice má vždy jedno vlákno původní a druhé vlákno nově syntetizované. Klíčovou úlohu v procesu replikace má enzym DNA dependentní DNA polymerasa (existuje 5 typů tohoto enzymu). Všechny typy DNA polymeras potřebují matrici, postupují vždy od konce 5'ke konci 3'a potřebují mít k dispozici volný konec 3'nukleotidu, na který připojí fosfodiesterickou vazbou 5'místo nově zařazeného nukleotidu. DNA polymerasa nemůže zahájit syntesu de novo, pouze připojuje nový nukleotid na 3'pozici. Proces replikace zahajuje enzym primasa, což je DNA dependentní RNA polymerasa. Tento enzym vytváří na začátku replikovaného úseku nového vlákna DNA krátký RNA primer („očko“). Na jeho 3

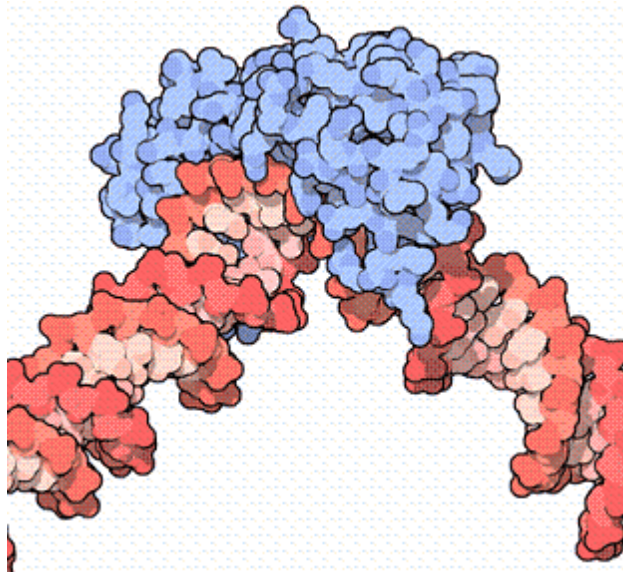
‘konec může DNA polymerasa připojit první nukleotid nového vlákna DNA. Protože obě vlákna DNA jsou antiparalelní a DNA polymerasa syntetisuje „jednosměrně“, může souvisle probíhat replikace pouze na jednom vlákně. Na zmiňovaném vlákně probíhá replikace rychleji, provádí ji δ -polymerasa, označujeme ho vláknem vedoucím. Na druhém vlákně probíhá replikace po částech (tzv. Okazakiho fragmentech), replikace je pomalejší a provádí ji α -polymerasa. DNA polymerasa provádí kontrolu zařazení komplementární base. V případě chyby vystřihne a zařadí správnou bázi. Topoisomerasy mohou přerušit fosfodiesterické vazby v okolí replikační vidlice a znovu je vytvořit.

Transkripce se přenáší informace z DNA do molekuly RNA, kdy se vytvoří vlákno RNA na principu komplementarity k vlákně DNA. Adenosin v DNA je zařazován proti Uracilu v RNA. Přepisováno je pouze jedno vlákno DNA, slouží jako matrice pro RNA, tzv. vlákno pracovní. Druhé vlákno DNA je vlákno paměťové, za běžných podmínek k jeho transkripci nedochází. Směr transkripce je stejný jako u replikace, tedy 5' → 3'. Na transkripci se podílí řada bílkovin označovaných jako transkripční faktory (TF). Váží se na jednotlivé elementy promotoru, čímž usnadňují vazbu příslušné RNA polymerázy. Prokaryotická RNA polymeráza ke své činnosti TF nevyžaduje, u eukaryot je na přítomnosti TF závislá. Jejich prostřednictvím je genová exprese přizpůsobována potřebám buňky či celého organismu (např. hormony nebo hypoxie mohou stimulovat expresi – transkripci určitých genů). Některé TF musí být nejdříve aktivovány např. fosforylací nebo odstraněním inhibitoru. TF regulují bazální transkripci. Mnohé z nich se neváží na DNA, ale jsou součástí preiniciačního komplexu, který reaguje přímo s RNA-polymerázou II. Existují: RFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF a TFIIH. TFIID se specificky váže na sekvenci TATA box.

Transkripce je zahájena navázáním TFIID do oblasti TATA boxu, pak je připojen další TF, potom RNA polymerasa s dalšími TF. Transkripcí vznikají RNA prekursorového typu, které se teprve posttranskripčními úpravami stávají definitivními funkčními molekulami RNA.

Promotor je oblast lokalizována směrem k 5'konci pracovního řetězce. Promotor označuje začátek transkripce a reguluje její intenzitu. V oblasti promotoru se často vyskytuje tzv. signální sekvence. Před začátkem transkripce bývá tzv. TATA box (obr.č.4), který obsahuje větší množství T a A. Další známou signální sekvencí v oblasti

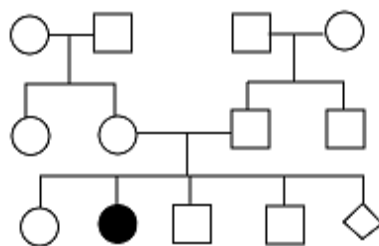
promotoru je CCAAAT box. Je zajímavé, že geny determinující enzymy citrátového cyklu, nemají ani TATA ani CAAT box .



obr.č.4, TATA box

Translace je přenos genetické informace z kódu m-RNA do pořadí aminokyselin v polypeptidu. Je nezbytné, aby v buňce kromě potřebného materiálu a energie byly přítomny ribosomy, m-RNA, t-RNA a enzymy podmiňující jednotlivé reakce. (16)

GS se dědí autosomálně recesivně (obr.č.12). Postiženy jsou stejně často muži i ženy. Rodiče jsou obvykle zdraví a bývá postižen jejich potomek (eventuálně sourozenec některého z rodičů). Jedná se o horizontální typ rodokmenu. U vzácných AR chorob často u rodičů postiženého probanda jde o příbuzenský sňatek. Riziko pro sourozence postiženého jedince je 25%. (1)



obr.č.12 :AR dědičnost

Biotransformace s kyselinou glukuronovu se týká obecně nejen nekonjugovaného bilirubinu, ale také mnoha endogenních sloučenin i xenobiotik. K tomuto účelu se vyvinuly rozličné izoformy UDP-glukuronozyltransferáz (UGT). U člověka bylo identifikováno celkem 16 transkriptů UGT, které byly rozděleny do 2 skupin: UGT 1 a UGT 2.

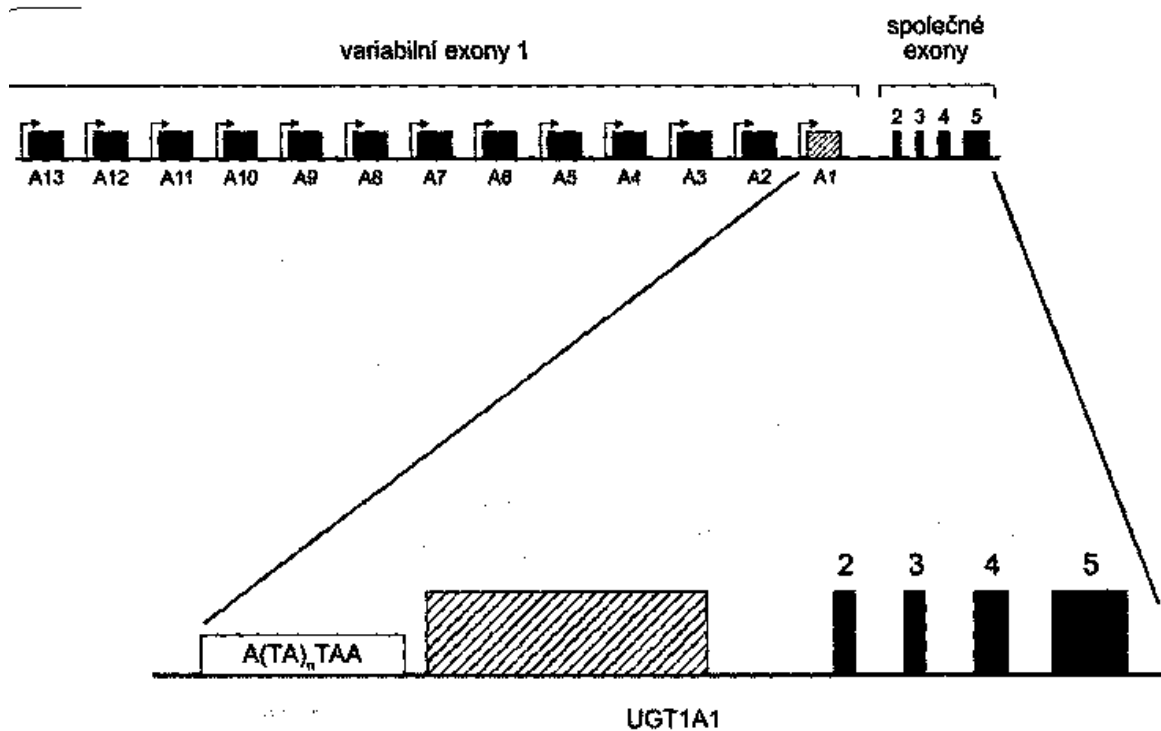
UGT2 zahrnuje podskupiny UGT2A a UGT2B. UGT2 je lokalizována na dlouhém raménku 4.chromozomu, skládá se ze 6 exonů a její produkty katalyzují glukuronozylaci endogenních substrátů včetně steroidních hormonů a žlučových kyselin. Konjugace nekonjugovaného bilirubinu s kyselinou glukuronovou je katalyzována enzymem bilirubin UDP-glukuronozyltransferázou (UGT 1A1) a dochází při ní k esterifikaci karboxylových skupin postranních karboxyetylových řetězců v pozicích C8 a C12 a ke zmíněnému uvolnění dvou intracelulárních vodíkových můstků. Enzym UGT1A1 je tedy kódován genem lokalizovaným na 2.chromozonu a označovaným jako UGT1. Tento gen kóduje například estrogener, thyroideální hormony nebo opioidy. V závislosti na této variabilitě kóduje 9 různých izoform glukuronozyltransferázy (UGT1A1-9). V jaterní tkáni člověka byly identifikovány transkripty UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 a UGT1A9. UGT1A7 je specifická pro jícen a žaludek, UGT1A8 pro jícen a tlusté střevo a UGT1A10 byly nalezena v jícnu, žlučových cestách, žaludku a tlustém střevě. Jedinou transferázou, která katalyzuje glukuronozylaci nekonjugovaného bilirubinu u člověka, je UGT1A1. Mutace v genu pro UGT1A1 s následným snížením aktivity transferázy vedou ke vzniku nekonjugovaných hyperbilirubinemií (tj. GS, Crigler-Najjarův sy).

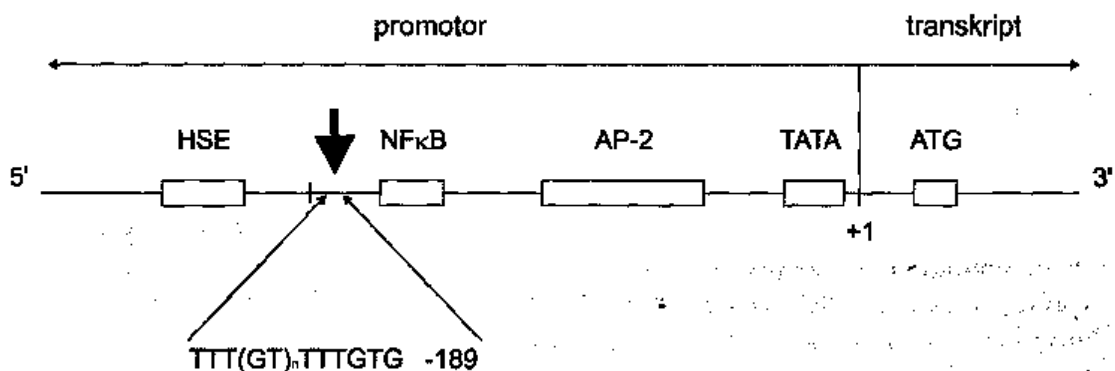
Právě GS je charakterizován sekvenční variantou v TATA-oblasti promotoru genu UGT1A1, kde se nachází vazebné místo pro transkripční faktor IID, důležitý pro iniciaci transkripce. V lidské populaci byly popsány alelické varianty A(ta)5-8TAA, přičemž fyziologická varianta A(TA)6TAA (UGT1A1*1) je spojena s normální aktivitou UGT1A1. Vložení TA do sekvence A(TA)6TAA promotoru za vzniku alely A(TA)7TAA vede ke vzniku varianty genu, označované v homozygotní podobě jako UGT1A1*28, která kóduje enzym se zhruba 30% aktivitou oproti fyziologické variantě genu (obr.8). U Criglerova-Najjarova syndromu II.typu je aktivita UGT1A1 snížena na 10%, u Criglerova-Najjarova syndromu I.typu chybí úplně.

Obr. 8 Struktura genu UGT1, kódujícího glukuronozyltransferázy s různou substrátovou specifitou. UGT1A1 kóduje izoenzym se specifitou pro bilirubin

UGT1 lokus se nachází na chromozomu 2q37, je tvořen téměř 200 000 páry bází a obsahuje celkem 17 exonů. Exon 1 kóduje substrát, který váže doménu (a tím i specifitu výsledného enzymu) a má celkem 13 variant. Exony 2–5 označujeme jako konstantní. Sestřihem primárních transkriptů se kombinuje jeden unikátní exon se všemi 4 konstantními exony.

Translací tak může teoreticky vzniknout až 13 různých enzymů s různým cílovým substrátem. Ve skutečnosti je těchto enzymů pouze 9, neboť exony 2, 11, 12 a 13 nejsou přepisovány (tvoří tzv. pseudogeny).





obr.č.6: Organizace promotoru genu pro HO -1

Monoglukuronozybil bilirubin se ve žluči snáz dekonjuguje a tento fakt je příčinou vyššího výskytu pigmentové cholecystolitiázy u jedinců s GS a Criglerovým-Najjrovým syndromem.

1.2 Játra a žlučové cesty

Játra (hepar) jsou největší žlázou.

Játra podporují štěpení a resorpci lipidů tím, že produkují žluč a žlučové kyseliny. Mají aktivní enzymový systém pro syntézu a oxidaci TAG a fosfolipidů.

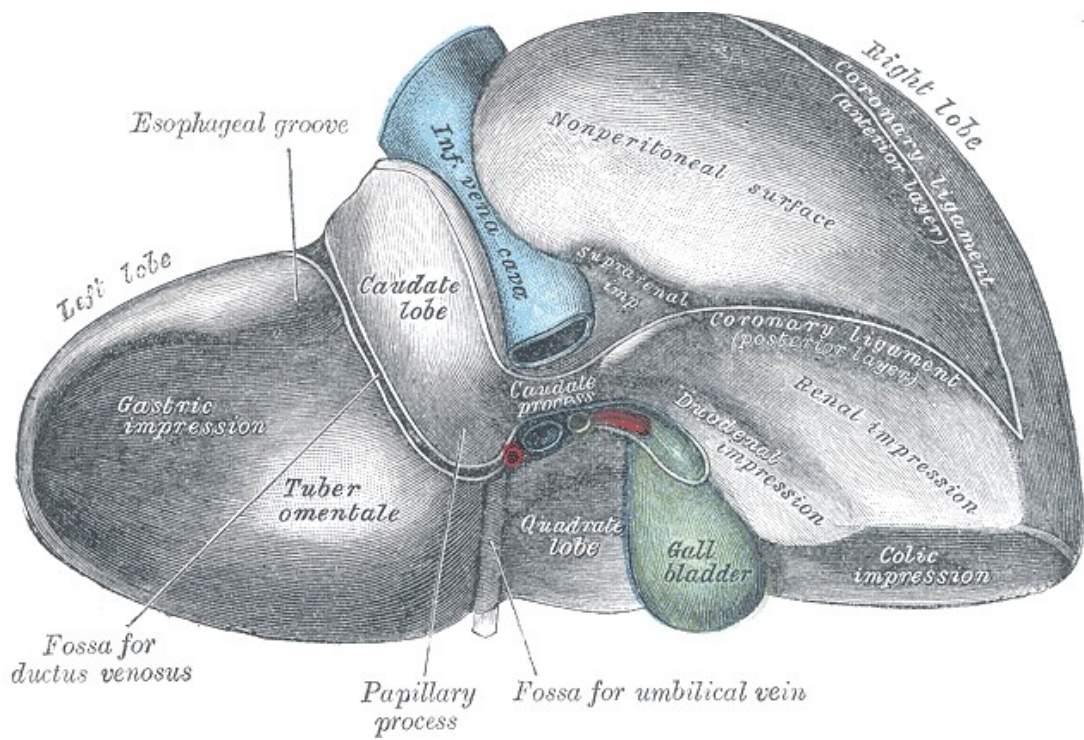
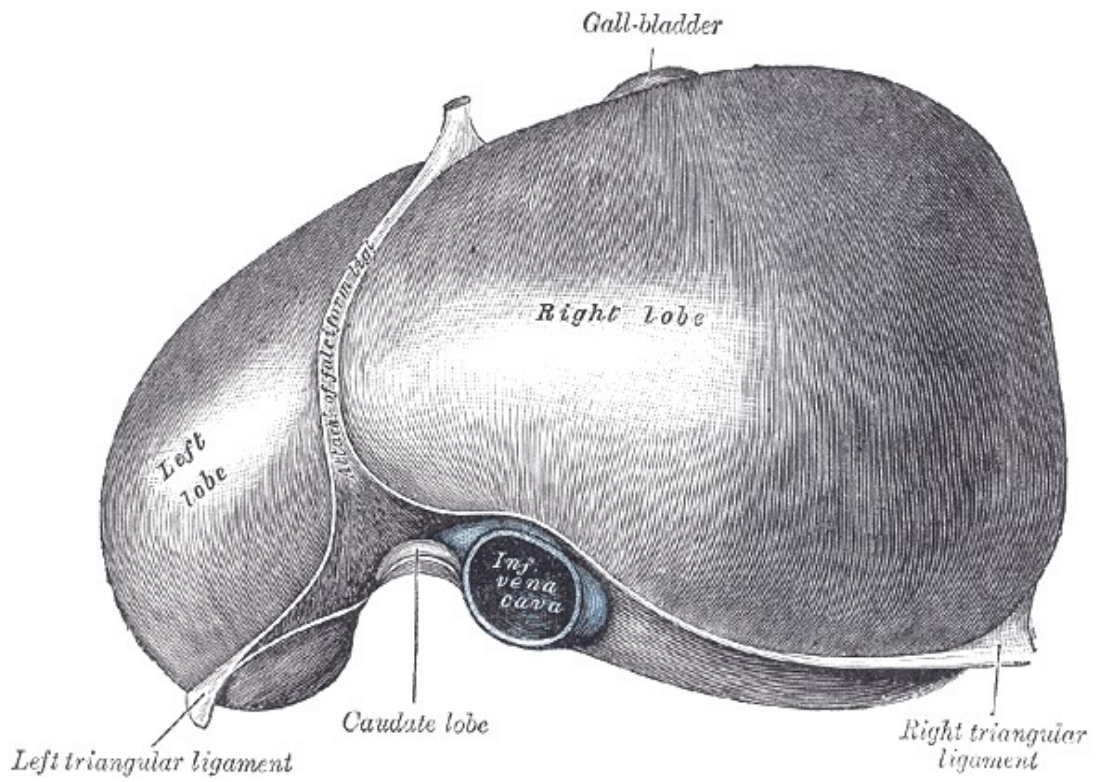
Přeměňují MK na ketolátky (tj.ketogeneze).

Probíhá v nich syntéza a metabolismus plazmatických lipoproteinů (tj. HDL, VLD, LD, IDL, chylomikronů,..). V embryonálním období jsou orgánem krvetvorby.

Váží kolem 1500 g. Mají hnědočervenou barvu, na pohmat jsou měkká, křehké konzistence. Při nárazech na jaterní krajinu dochází často k natržení jater a následnému krvácení do peritoneální dutiny.

Vyplňují pravou část supramezokolického oddílu peritoneální dutiny a jsou uložena těsně pod pravou klenbou bránice.

Obr.č.7: Játra

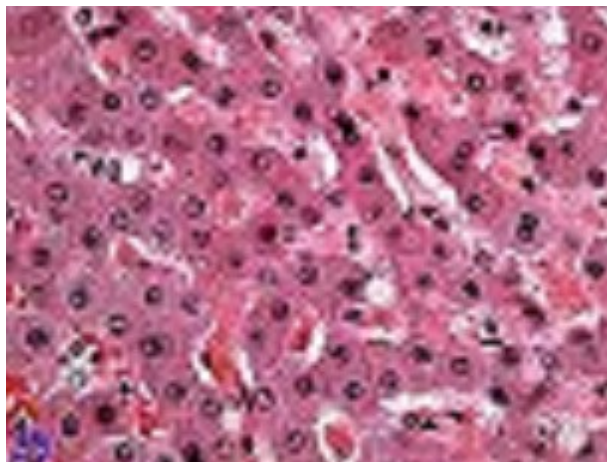


Obr.č.9: Játra – část viscerální

Tvar jater můžeme přirovnat k šikmo seříznutému ovoиду. Horní konvexní plocha, *facies diaphragmatica*, naléhá na bránici. Zhruba uprostřed diafragmatické plochy je mělký otisk srdce, *impressio cardiaca*. Dolní plochou, *facies visceralis*, naléhají játra na orgány dutiny břišní. Obě plochy do sebe zradu plynule přecházejí. Podobně zaoblený je i přechod diafragmatické a viscerální plochy na pravé straně. Vpředu je jejich přechod ostrý, *margo inferior*. Levý lalok se směrem doleva ztenčuje a přechází do vazivově změněného cípu, *appendix fibrosa hepatis*. *Facies visceralis* je mnohem tvarovanější. Jsou na ní tři zřetelné rýhy tvaru písmene H. Příčnou rýhou, *porta hepatis*, do jater vstupují cévy a nervy (*a.hepatica propria*, *v.portae*, *plexus hepaticus*) a vystupují žlučové cesty (*ductus hepaticus dex. et sin.*). Levý konec *porta hepatis* navazuje na *fissura sagittalis sinistra*, pravý na *fissura sagittalis dextra*. *Fissura sagittalis sinistra* se skládá ze dvou rýh. Přední, *fissura ligamenti teretis*, začíná na předním okraji jater a leží v ní *ligamentum teres hepatis* (vazivově přeměněná *v.umbilicalis*), která vede od pupku k *porta hepatis*. Zadní, *fissura ligamenti venosi*, obsahuje *ligamentum venosum* (zbytek *ductus venosus*). *Fissura sagittalis sinistra* rozděluje játra na levý a pravý lalok, *lobus sinister et lobus dexter*. *Fissura sagittalis dextra* je tvořena dvěma samostatnými jámami. Přední je poměrně široká *fossa vesica biliard*, ve které je uložen žlučník. Zadní, hluboká *fossa venae cavae inferioris*, přechází na zadní plochu jater. Obsahuje svisle probíhající dolní dutou žílu. V místech, kde je zanořena do jater, se do ní otevírají tři *vv.hepaticae*. Uvedené rýhy vymezují na viscerální ploše pravého laloku dvě samostatné části. Mezi oběma sagitálními rýhami a před *porta hepatis* leží *lobus quadratus*, za *porta hepatis* ne zcela oddělený *lobus caudatus*. Ten souvisí s pravým lalokem jaterním (před *fossa v.cavae inf.*) pruhem parenchymu *processus caudatus*. Levý přední roh *lobus caudatus* se poněkud zdvíhá jako *recessus papillaris*. Viscerální plocha jater naléhá na řadu břišních orgánů, které na ní zanechávají zřetelné otisky. Na přední části pravého laloku je příčně orientovaný otisk *colon transversum*, *impressio colica*, nad ním je otisk pravé ledviny a nadledviny, *impressio renalis et suprarenalis*. Mediálněji leží otisk duodena, *impressio duodenalis*. Na levém laloku je rozsáhlý otisk žaludku, *impressio gastrica*, který směrem dozadu předchází do *impressio oesophagea*. *Lobus quadratus* naléhá na *pylorus* a na přiléhající část duodena. Játra jsou uložena v peritoneální dutině, a jsou proto téměř v celém rozsahu kryta serózou, *peritoneum viscerale* (viscerální peritoneum pokrývá i žlučník). Peritoneální řasy přistupují k játrům

jednak v oblasti porta hepatis, omentum minus, jednak na diafragmatické ploše, ligamentum falciforme hepatis. Tato závěsná peritoneální řasa se dorzálním směrem rozestupuje do stran jako ligg. coronaria, která pokračují do ligamentum triangulare sinistrum et dextrum. Mezi listy peritoneálních řas a zvláště vzadu mezi rozestupující se ligamenta triangularia je povrch jater kryt adventicií. Část mezi oběma ligamenta triangularia je označována jako area nuda. (2)

Obr.č.10 : Hepatocyty



Obr.č. 11 : Portální triáda



Hlavní součástí jater je žláznový jaterní parenchym. Základní strukturální komponentou jaterního parenchymu je jaterní buňka, hepatocyt.

Hepatocyty jsou uspořádány v typický trámčité epitel. Trámce jsou obvykle tvořeny 2 řadami těsně k sobě přiložených buněk. Jednotlivé trámce spolu vzájemně často anastomozují a vytvářejí složitý labyrint. V prostorech mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy. Uvnitř trámců jsou uloženy počáteční úseky žlučových kanálků – intercelulární žlučovody (žlučové kapiláry). Morfologickou jednotku parenchymu jater představuje lalůček centrální vény (lobus venae centralis). Je tvořen trámci jaterních buněk, které se sbíhají směrem k centru lalůčku, které představuje centrální véna. Jaterní lalůček má tvar nepravidelného šestibokého hranolu se zaoblenými stěnami. Lalůčky jsou k sobě těsně přiloženy. Místo, kde se stýkají 3 jaterní lalůčky, nazýváme portobiliárním prostorem. V portobiliárním prostoru nacházíme vénu (vena interlobularis, větev véna portae), dále interlobulární arterii (arteria interlobularis, větev arteria hepatica propria) a interlobulární žlučovod. Z vazivové tkáně portobiliárních prostorů odstupují jemná retikulární vlákna, která tvoří opěrnou síť pro hepatocyty i endotelové buňky jaterních sinusoid.

Z funkčního hlediska lze v jaterním parenchymu odlišit ještě lalůček portální – lobulus venae interlobularis. Tento lalůček představuje část jaterního parenchymu, která je zásobována jednou vénou a jednou arterií interlobulární. Žluč je z portálního lalůčku odváděna interlobulárním žlučovodem. Portální lalůček je útvar zhruba trojúhelníkový. V jeho středu je portobiliární prostor a hroty tvoří 3 centrální vény. V jaterním parenchymu dále odlišujeme primární acinus. Je to oblast zásobovaná jednou cirkumlobulární vénou. Acinus se skládá ze dvou trojúhelníkovitých výsečí dvou sousedních lalůčků centrální vény. Baze těchto výsečí je společná a tvoří ji spojka mezi dvěma sousedními portobiliárními prostory. Oblast primárního acinu uložená nejbližší spojnicí mezi portobiliárními prostory přichází jako první do styku s přiváděnou krví, a tím se škodlivinami v ní obsaženými. Za patologických okolností bývá nejvíce postižena. (2)

Hepatocyty jsou polyedrické, eozinofilní buňky. Každý hepatocyt je částí svého povrchu přivrácen k jaterní sinusoidě. Mezi jaterními buňkami a výstelkou sinusoid je vytvořen štěrbinovitý Disseho prostor. Na povrchu hepatocytu, který směřuje do Disseho prostoru, je vyvinuto velké množství mikrokloků. Část povrchu jaterní buňky, která je přivrácena k dalšímu hepatocytu, má přímý průběh. V této oblasti jsou vyvinuty

četné nexy. Tubulární prostor (1-2 μ m v průměru) mezi dvěma hepatocyty, do kterého se z laterálních stěn jaterních buněk vyklenují ojedinělé mikroklky. V tomto prostoru byla na buněčné membráně prokázána vysoká aktivita alkalické fosfatázy a adenosintrifosfatázy. Tyto místa jsou ohraničeny dobře vyvinutými zonulae occludentes. Představují intercelulární žlučové vývody (žlučové kapiláry).

Hepatocyt je buňka, která plní v organismu největší počet funkcí. Hepatocyty syntetizují proteiny pro vlastní potřebu i pro export. Produkují krevní bílkoviny – albumin, prothrombin, fibrinogen, transferrin a různé lipoproteiny. Syntetizované proteiny buňka nestrádá v sekrečních granulech, ale kontinuálně je uvolňuje do krevního oběhu. V hepatocytech dochází také ke stádání některých metabolitů. Sacharidy jsou stádány ve formě glykogenu, lipidy jsou zde ukládány v tukových kapénkách ve formě triglyceridů. Dochází zde také ke stádání vitamínu A. V hepatocytech probíhá glukoneogeneze i tvorba a štěpení glykogenu. Dochází tu i k deaminaci aminokyselin. Výsledným produktem tohoto procesu je urea. V játrech dochází také k detoxikaci a inaktivaci různých škodlivých látek. Toxické látky mohou být inaktivovány oxidací, metylací nebo konjugací s kyselinou glukuronovou. Tyto pochody probíhají v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů. V hepatocytech dochází k přeměně xenobiotik na méně účinné (tj. méně škodlivé) látky a k přeměně na vhodnou formu k vyloučení z těla organismu (žluči). Důležitou úlohu tu hraje zejména glukoronozyltransferáza, která kromě bilirubinu dokáže konjugovat s kyselinou glukuronovou celou řadu látek, hlavně steroidy, barbituráty, antihistaminika a antikonvulziva. (3)

Cévy jater tvoří funkční a nutritivní řečiště. Funkční řečiště tvoří v. portae, která přivádí do jater krev z nepárových orgánů břišní dutiny. Její větve se postupně dostávají k jednotlivým jaterním lalůčkům a směřují do sinusoid mezi jaterními trámci. Krev ze sinusoid se sbírá do v.centralis. Vv. centralis se postupně spojují do vv. hepaticae, které ústí do v.cava inferior. Nutritivní řečiště zajišťuje a.hepatica propria, která se postupně větví až na interlobulární arterie. Jejich terminální větvení končí rovněž v sinusoidách, jejichž krev je tedy směsí portální a arteriální krve.

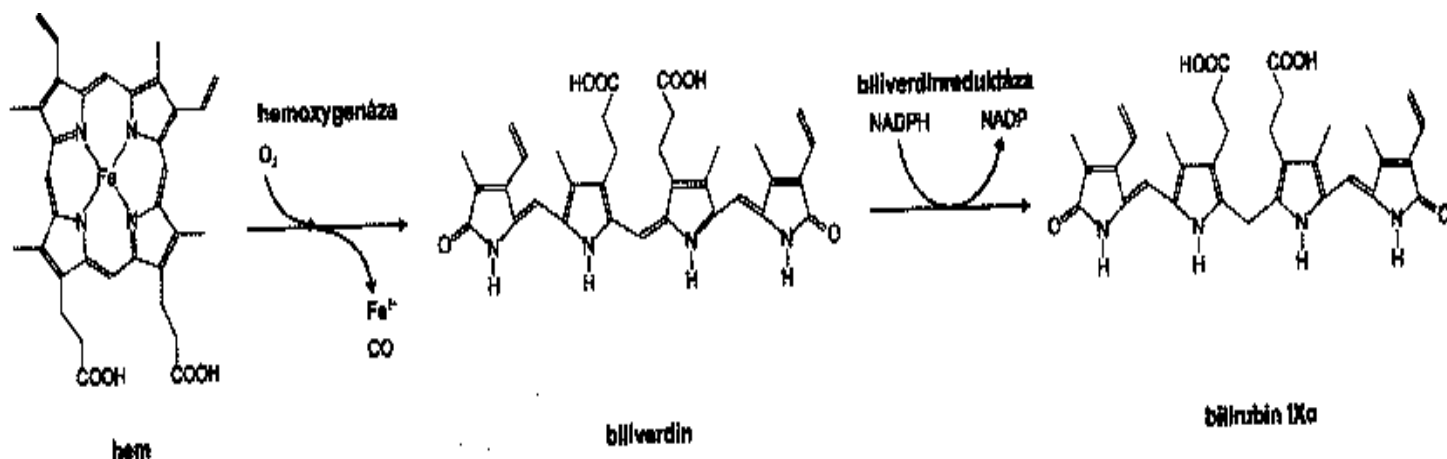
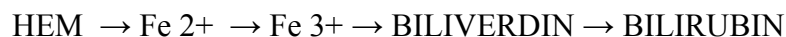
Žluč, bilis, vzniká v jaterních buňkách a obsahuje soli žlučových kyselin, žlučové hematogenní pigmenty cholesterol a řadu dalších látek. Žluč je řídká (asi 95% vody) a má zlatožlutou barvu. Z jater je odváděna žlučovými cestami. Intrahepatální žlučové cesty začínají žlučovými kapilárami mezi buňkami jaterních trámců. Postupně se spojují

a tvoří interlobulární žlučovody. Jejich spojením vznikají segmentální žlučovody, které se spojí ve dva vývody jaterních laloků, ductus hepaticus dexter et sinister a v porta hepatis opouštějí jaterní parenchym. Extrahepatální žlučové cesty vystupují z porta hepatis jako ductus hepaticus dex. et sin. a v porta hepatis nebo pod ní se spojují do ductus hepaticus communis – probíhá v ligamentum hepatoduodenale. Asi 4 cm od porta hepatis se spojuje s ductus cysticus a jako ductus choledochus sestupuje k descendentní části duodena. Ductus choledochus probíhá v ligamentum hepatoduodenale (pars supraduodenalis) vpravo od a.hepatica propria a před v.portae. Kaudálněji se klade za duodenum (pars retroduodenalis) a pak mezi hlavu pankreatu a duodenum (pars pancreatica). Prochází stěnou duodena (pars intramuralis) a otevírá se spolu s ductus pancreaticus major na papilla duodeni major. Vyústění ductus choledochus na papilla duodeni major je v klidové fázi uzavřeno pomocí m.sphincter ampullae hepatopancreaticae – Oddiho svěrač. Žluč se nad touto překážkou hromadí, zvyšuje se tlak ve žlučových cestách, plní se ductus choledochus a žluč přetéká skrze ductus cysticus do žlučníku, vesica biliaris.

Žluč se ve žlučníku hromadí a je zahušťována vstřebáváním vody, získává charakter nasyceného roztoku. Soli žlučových kyselin z roztoku vypadávají v podobě mikroskopických krystalů. Hustá žlučnicková žluč (má zelenou barvu) je při přechodu tráveniny ze žaludku do duodena reflexně vyprazdňována (při vyprazdňování žlučníku hrají velkou roli také hormony gastrointestinálního traktu – např. cholecystokinin). V duodenu se žluč po smíchání s tráveninou podílí na emulgaci tukových složek tráveniny, a tím usnadňuje činnost lipáz. Pokud je vyprazdňování žlučníku narušeno, žluč zůstává ve žlučníku, proces krystalizace dále pokračuje a ve žluči vznikají kameny, cholelithiasis. (2)

1.3 Bilirubin

Bilirubin je žlučové barvivo, které vzniká katabolismem hemu:



Obr. 5 Katabolická dráha hemu

Již v roce 1847 Rudolf Virchow popsal přítomnost krystalů červeného pigmentu v prokrvácených tkáních. V roce 1864 Georg Städler nejen, že izoloval ze žluče tmavě červený pigment a poprvé ho nazval bilirubinem (slovo bilirubin je odvozeno z latiny: *bilis* - žluč, *ruber* - červený), on byl také první, kdo dal do souvislosti s tímto pigmentem žluté zbarvení kůže a sliznic u pacientů s jaterními chorobami. Také první přišel s hypotézou, že bilirubin je pigment vznikající v krevní cirkulaci z hemu. Paul Ehrlich v roce 1883 popsal diazoreakci bilirubinu a v roce 1916 prokázali van den Bergh (po kterém je diazoreakce pojmenována)

spolu s Mullerem dva různé typy bilirubinu u člověka. Prvním typem je bilirubin reagující v diazoreakci přímo – tento typ se fyziologicky vyskytuje pouze ve žluči a odpovídá bisglukuronozyl bilirubinu = konjugovanému s kyselinou glukuronovou. Druhým typem byl bilirubin reagující s diazočínidlem pouze za přítomnosti akcelerátoru (alkoholu) – tento typ bilirubinu se fyziologicky vyskytuje v krvi = nekonjugovaný.

Enzym UGT1A1 je v hepatocytu lokalizován na hladkém endoplazmatickém retikulu. UGT1A1 katalyzuje tvorbu mono- i bisglukuronozyl bilirubinu, přičemž kapacita tvorby bisglukuronozyl bilirubinu je výrazně nižší ve srovnání s produkcí monoglukuronozyl bilirubinu. GS, který se vyznačuje částečným chyběním UGT1A1, se snižuje poměr bis- a monoglukuronozyl bilirubinu ve žluči.

Exprese UGT1A1 je regulována nukleárními receptory: PXR (pregnanový X-receptor, CAR (konstitutivní androstanový receptor), GR (glukokortikoidní receptor), AhR (arylový uhlovodíkový receptor) a HNF1 α (hepatocytární nukleární faktor). Výše uvedené faktory stimulují transkripci UGT1A1 přes tzv. fenobarbitalový enhancerový modul (PBREM, phenobarbital-responsive enhancer module), který je výrazně polymorfní. (6)

HEM \rightarrow Fe²⁺ \rightarrow Fe³⁺ \rightarrow BILIVERDIN \rightarrow BILIRUBIN

Hem patří do skupiny tetrapyrolových sloučenin a slouží jako prostetická skupina pro hemoproteiny (hemoglobin, myoglobin, cytochrom P-450, katalázu, peroxidázy nebo mitochondriální cytochromy). Kromě hemu a jeho degradačních produktů – bilirubinu a biliverdinu – patří mezi tetrapyrolové sloučeniny kobalamin = vit.B12, chlorofyl a tzv. biliny, které slouží jako akcesorní světlosběrné pigmenty z rostlinné říše. (6)

Poruchy metabolismu bilirubinu \rightarrow ikterus.

Ikterus = žloutenka, je žluté zbarvení kůže a sliznic dané zvýšeným množstvím bilirubinu. Pro zvýšenou koncentraci bilirubinu v séru (krvi) se používá termín hyperbilirubinémie. Lehce zvýšená koncentrace bilirubinu se nemusí projevit zjevným ikterem, resp. může být patrna jako tzv. subikterus.

Obr.č. 12 :Ikterus- žluté zbarvení kůže



Obr. č. 13 : Ikterus – žluté bělmo očí



Podle místa vzniku se ikterus dělí na:

- *prehepatální
- *hepatální
- *posthepatální

Prehepatální ikterus je způsoben nadměrným vznikem bilirubinu při zvýšeném rozpadu červených krvinek, inefektivní erythropoeze apod. Játra nejsou schopna zpracovat zvýšenou nabídku bilirubinu, proto je v krvi zvýšeno množství bilirubinu nekonjugovaného. Bilirubin se nachází v moči, kde je však přítomen urobilinogen a urobilin.

Intrahepatální ikterus je způsoben poruchami v játrech. Buď jde o poruchu na úrovni metabolismu bilirubinu: vychytáváním, konjugace a vylučování z hepatocytu. Dále

vznik ikteru souvisí s rozpadem hepatocytů a uvolněním bilirubinu do cirkulace. Zvýšená hladina typu bilirubinu (konjugovaný, nekonjugovaný) závisí na postiženém procesu. Může jít o GS, Crigler-Najjar sy, hepatitidu či cirhózu.

Posthepatální ikterus je způsoben poruchou odtoku žluči, tj.cholestázou. V tomto případě stoupá v krvi koncentrace bilirubinu konjugovaného. Bilirubin se nedostává do stolice, která má světle šedou barvu (je acyklická). V moči není urobilinogen (který normálně z bilirubinu vzniká ve střevě).

(4)

Metabolismus bilirubinu nastává především v játrech a lze ho rozdělit do tří procesů:

1. příjem bilirubinu buňkami jaterního parenchymu – v plasmě se vyskytuje navázaný na albumin (pozor na ATB – blokují vazebné místo na albuminu), v játrech je bilirubin odstraněn z albuminu a přijat sinusoidami do hepatocytu
2. konjugace bilirubinu v hladkém ER
3. sekrece konjugovaného bilirubinu do žluči

Bilirubin je málo rozpustný v plasmě a vodě. V plasmě se vyskytuje navázaný na protein, zejména na albumin (ve 100 ml plasmy je na albumin pevně navázáno asi 25 mg bilirubinu v místech o vysoké afinitě). Přebytek bilirubinu je navázaný slabě a může se snadno oddělit a difundovat do tkání. Některá farmaka (např. antibiotika) soutěží s bilirubinem o vysoce afinitní místo na albuminu, tzn. některá farmaka mohou odstranit bilirubin z vazby s albuminem a vyvolat tak významný klinický efekt.

V játrech je bilirubin odstraněn z albuminu a přijat sinusoidálním povrchem hepatocytů pomocí nosičem zprostředkovaného satureovatelného systému. Tento systém usnadněného transportu má značnou kapacitu, takže i za patologických podmínek není tento systém místem limitujícím rychlost metabolismu bilirubinu. Uskutečňuje rovnováhu bilirubinu napříč sinusoidální membránou hepatocytů.

Čistý záchyt bilirubinu bude záviset na jeho odstraňování následnými metabolickými cestami :

V játrech je bilirubin konjugován – přidáním polární skupiny k bilirubinu jej játra přeměňují na formu rozpustnou ve vodě, která může být následně vyloučena do žluči.

Proces zvýšení rozpustnosti ve vodě = polarizace bilirubinu je zprostředkován konjugací. Většina vylučovaného bilirubinu je ve formě **bilirubindiglukosiduronátu**. Vznik intermediárního monoglukosiduronátu bilirubinu je katalyzován **uridindifosfátglukoronáglukosiduronáttransferasou(UDP-glukosiduronáttransferasou)**, enzymem, který se vyskytuje v hladkém endoplasmatickém retikulu.

Bilirubin je vylučován do žluči – sekrece konjugovaného bilirubinu do žluči nastává aktivní transportem, který pravděpodobně limituje rychlost celkového metabolismu bilirubinu v játrech. Za fyziologických podmínek je všechen bilirubin vylučován do žluče jako konjugovaný. Pouze po fototerapii může být ve žluči zjištěno významné množství nekonjugované formy.

Konjugovaný bilirubin je redukován střevními bakteriemi na urobilinogen – jakmile dosáhne konjugovaný bilirubin ilea a tlustého střeva, glukosiduronáty jsou B-glukosiduronátasami rozloženy a pigment je následně zredukován na skupinu bezbarvých tetrapyrrolových sloučenin nazývaných urobilinogeny. Normálně je většina bezbarvých urobilinogenů tvořených ve střevě účinkem fekální flóry oxidována na urobiliny.

Hyperbilirubinemie způsobuje žloutenku. Když přesáhne koncentrace bilirubin v krvi 10mg/l (17,1 μ mol/l), dochází k hyperbilirubinemii. Ta může být způsobena buď produkcí většího množství bilirubinu než mohou játra normálně vylučovat, nebo selháním poškozených jater vylučovat bilirubin produkovaný v normálním množství. I když nejsou játra poškozena, obstrukce exkretčních jaterních cest brání exkreci bilirubinu, tzn. také způsobí hyperbilirubinémii.

Ve všech uvedených případech se bilirubin hromadí v krvi, a když dosáhne určité koncentrace (asi 20-25mg/l), difunduje do tkání, které tím zežloutnou = žloutenka = ikterus.

V závislosti na typ přítomného bilirubinu v plasmě, tj. nekonjugovaného nebo konjugovaného, může být hyperbilirubinémie klasifikována buď jako retenční nebo jako regurgitační.

Pouze nekonjugovaný bilirubin může přecházet hematoencefalickou bariérou do centrálního nervového systému. Encephalopatie z hyperbilirubinémie (Kernikterus) může nastat pouze ve spojení s nekonjugovaným bilirubinem. Naproti tomu v moči může být pouze konjugovaný bilirubin tzv. **cholurická žloutenka** (cholurie = přítomnost žlučových sloučenin v moči) se vyskytuje pouze při regurgitační hyperbilirubinémii. **Acholurická žloutenka** nastává při nadbytku nekonjugovaného bilirubinu.

I při rozsáhlé hemolyse je zvýšení nekonjugovaného bilirubinu pouze mírné (\leq mg/l, 68,4 μ mol/l), díky velké kapacitě jater, které metabolizují bilirubin. Pokud je však přeměna bilirubinu poškozena buď získaným defektem nebo vrozenou abnormalitou, dojde k nekonjugované hyperbilirubinémii.

Novorozenecká „fyziologická žloutenka“

- tento přechodný stav je nejčastější příčinou nekonjugované hyperbilirubinémie. Je výsledkem zrychlené hemolysy a nezralosti jaterního systému pro příjem, konjugaci a vylučování bilirubinu. Není snížena pouze aktivita UDP-glukosiduronátransferasy, ale patrně je snížena syntéza substrátu pro tento enzym, kyseliny glukuronové. Jelikož je zmnožen bilirubin nekonjugovaný, může pronikat hematoencefalickou bariérou, když jeho koncentrace v plasmě přesáhne hodnotu při které může být pevně vázán na albumin (200-250 mg/l). To má za následek hyperbilirubinemickou toxickou encefalopatii, neboli Kernikterus, která může způsobit mentální retardaci. Novorozencům se žloutenkou se podává fenobarbital, protože systém metabolizující bilirubin lze takto indukovat, a tento postup je účinný. Mimo to, vystavení viditelnému světlu (fototerapie) může zvýšit jaterní exkreci nekonjugovaného bilirubinu jeho přeměnou na další deriváty (geometrické isomery), které jsou vylučovány do žluče.

Criglerův-Najjarův syndrom typu I (vrozená nehemolytická žloutenka)

- tato vzácná autosomálně recesivní porucha, je způsobená primárním metabolickým defektem konjugace bilirubinu. Je charakteristická těžkou vrozenou žloutenkou, jelikož v játrech dědičně chybí aktivita UDP-glukosiduronátransferasy. Onemocnění je obvykle fatální během prvních 15 měsíců života. (Bylo popsáno několik dospívajících dětí, které neměly obtíže až do puberty. Tyto děti byly léčeny fototerapií s částečným

poklesem hladiny bilirubinu v plasmě.) U pacientů s Criglerovým-Najjarovým syndromem typu I neměl fenobarbital účinek na tvorbu bilirubinglukosiduronátu. Pokud není prováděna léčba, sérový bilirubin obvykle přesáhne koncentraci 200 mg/l.

Criglerův- Najjarův syndrom typu II

-toto dědičné onemocnění je patrně způsobeno mírným defektem v systému konjugace bilirubinu a má benignější průběh. Koncentrace sérového bilirubinu obvykle nepřekročí 200 mg/l, ale všechny nahromaděný bilirubin je nekonjugovaný. Je překvapivé, že žluč těchto pacientů obsahuje bilirubinmonoglukosiduronát. Předpokládá se, že genetický defekt může postihovat jaterní UDP-glukosiduronáttransferasu, která přidává druhou glukuronovou skupinu k bilirubinmonoglukosiduronátu. Pacienti s tímto syndromem mohou příznivě reagovat na léčbu velkými dávkami fenobarbitalu.

Etiologickou příčinou obou syndromů jsou mutace lokalizované různě v UGT 1A1 genu. Na rozdíl od Gilbertova syndromu se tyto mutace nacházejí v kódující oblasti genu.

Konjugovaný bilirubin přechází do moče - protože je konjugovaný bilirubin ve vodě rozpustný, lze jej detekovat v moči pacientů s konjugovanou heperbilirubinemií, tzv. cholurická žloutenka.

Chronická idiopatická žloutenka (Dubinův-Johnsonův syndrom) - tato autosomálně recesivní porucha se jeví jako konjugovaná hyperbilirubinémie v dětství nebo během dospělosti. Je způsobena defektem jaterní sekrece konjugovaného bilirubinu do žluče. Sekreční porucha není omezena pouze na bilirubin, ale postihuje také sekreci konjugovaných estrogenů a pokusných látek, jako např. barvivo sulfobromftalein. U pacientů s Dubin-Johnsonovým syndromem je příznačný obsah abnormálního pigmentu v centrilobulární oblasti hepatocytů.

Obstrukce žlučových cest způsobuje konjugovanou hyperbilirubinémii uzávěrem jaterních žlučových cest nebo žlučovodů. Bilirubin přechází z krve do jaterních buněk normálně, porucha je v exkreci. V důsledku toho je konjugovaný bilirubin neabsorbován do jaterních vén a lymfatických cév.

Cholestatická žloutenka je termín, který se používá pro všechny formy mimojaterní obstrukční žloutenky, tj. i pro ty, které jsou způsobené poruchou hepatocytů a jsou také charakterizovány konjugovanou hyperbilirubinémií.

Část konjugovaného bilirubinu se může kovalentně vázat na albumin – pokud v plasmě přetrvávají vysoké koncentrace konjugovaného bilirubinu, část se může kovalentně vázat na albumin (delta-bilirubin). Díky tomu má tento podíl delší poločas v plasmě, než obvyklý konjugovaný bilirubin. Proto v rekonvalescenci obstrukční žloutenky, kdy hladin konjugovaného bilirubinu poklesne na normální hodnotu, tato forma ještě přetrvává. To vysvětluje, proč někteří pacienti zůstávají žlutí delší dobu, i když hladina bilirubinu v krvi klesla k normě.

Urobilinogen v moči je klinickým indikátorem – za normálních podmínek jsou v moči pouze stopy urobilinogenu. Při úplné obstrukci žlučvodů není v moči prokazatelný, jelikož bilirubin nemá přístup do střeva, kde je přeměňován na urobilinogen. Přítomnost bilirubinu v moči bez urobilinogenu tedy předpokládá obstrukční žloutenku, buď intrahepatální nebo posthepatální. (7)

Hemolytická anemie (HA) je onemocnění způsobené předčasným a nedostatečně kompenzovaným rozpadem červeným krvínek – hemolýzou. Je-li předčasný rozpad erytrocytů kompenzován dostatečnou novotvorbou, anemie nevznikne. Hemolýza probíhá většinou v makrofágo-monocytovém systému sleziny a jater, tj. extravaskulární hemolýza. Vzácnější je rozpad cirkulujících erytrocytů v krevním oběhu, tj. intravaskulární hemolýza. Rozpad erytrocytů vede v obou případech ke zvýšení hladiny nepřímého bilirubinu a k poklesu haptoglobinu. Dochází ke zvýšení hladiny LDH a v moči nacházíme urobilinogen. Pro intravaskulární hemolýzu je charakteristický nález volného hemoglobinu a hemosiderinu v moči a zvýšení hladiny volného hemoglobinu v krvi. Organismus se snaží odstranit anemii zvýšením erytropoezy a do periférie se ve velkém počtu vyplavují nezralé erytrocyty = retikulocyty.

(10)

Vzrůst urobilinogenu v moči lze také pozorovat při zvýšené destrukci krvínek z jiných příčin (např. při perniciosní anemii).

(7)

1.4 Laboratorní hodnoty

Crigler-Najjar syndrom typu I (CNS 1)

CNS 1 je charakterizován hladinou celkového bilirubinu kolem 345 $\mu\text{mol/l}$ (310 - 755 $\mu\text{mol/l}$). Neléčené formy onemocnění mají fatální konec kolem 1.-2. roku života. CNS 1 s dědičností autozomálně recesivní (AR).

Crigler-Najjar syndrom typu 2 (CNS 2)

U CNS 2 se hladina bilirubinu většinou pohybuje pod 345 $\mu\text{mol/l}$ a afekce je mnohdy detekována v pozdějším věku. CNS 2 s dědičností autozomálně dominantní (AD).

Tab.č.1: Laboratorní hodnoty

	Crigler - Najjar sy	
	typ 1	typ 2
celkový sérový bilirubin (mg/dL)	18-45 (kolem ≥ 20)	6-25 (kolem ≤ 20)
celkový sérový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	nad 345 $\mu\text{mol/l}$	pod 345 $\mu\text{mol/l}$
rutinní rest jater	normální	normální
odpověď na fenobarbital	ne	snížení hladiny bilirubinu na $\leq 25\%$
Kernikterus	obvykle	vzácně
histologie jater	normální	normální
barva moči	bledá nebo bezbarvá	pigmentová
frakce bilirubinu ve žluči	$\geq 90\%$ nekonjugovaný	větší frakce monokonjugáty
aktivita UGT 1A1	chybí, někdy stopově	markantně redukovaný
dědičnost autosomálně	recesivní	dominantní
	Gilbert sy	
celkový sérový bilirubin (mg/dL)	kolem 4 mg/dL	
celkový sérový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	kolem 25 $\mu\text{mol/l}$	
rutinní rest jater	normální	
odpověď na fenobarbital	snížení hladiny bilirubinu na normál	
Kernikterus	ne	

histologie jater	obvykle normální, někdy pigment lipofuscin
barva moči	normální
frakce bilirubinu ve žluči	hlavně dikonjugáty, monokonjugáty zvýšené
aktivita UGT 1A1	redukovaný
dědičnost autosomálně	recesivní

(22)

1.5 Diferenciální diagnostika GS

Criglerův- Najjarův syndrom I i II věrohodně „napodobuje“ GS. K rozlišení je třeba vyšetřit konjugáty bilirubinu v duodenální žluči. Normální hladiny ALT, AST, ALP, GMT a standartní hladiny žlučových kyselin vyloučí GS. Hemolytickou anemii vyvrátíme normálními hladinami hemoglobinu a standartním počtem retikulocytů.

1.6 Prevence, popř. léčba GS

Léčba je pouze symptomatická.

Pro snížení hyperbilirubinémie lze použít barbituráty (phenobarbital), kyselinu salicylovou, kofein, některá ATB, vitamín B3, C a D, stopové prvky - zinek a vápník.

Jako hepatoprotektiva (syn. hepatika) se označuje různorodá skupina látek, která se používá při hepatitidách a toxických i jiných poškozeních jater. Ochranný vliv na jaterní buňky se připisuje vitagenům, jako jsou cholin, methionin, arginin, inositol a další. Dále se používají látky s projektivními účinky na hepatocyty, jako jsou kyselina thioktová (acidum thiocticum), silymarin, kterému se připisuje stabilizační účinek na membránu hepatocytů, induktor mikrosomálních enzymů flumecinol, prekurzor kyseliny orotové orazamid, dipeptid ornitinu a aspartátu, které ovlivňují využití amoniaku, jaterní extrakty, esenciální fosfolipidy, nenasycené mastné kyseliny, glukosa a další léčiva. (8)

Doporučena je pravidelná, pestrá a vyvážená strava (dostatek ovoce a zeleniny) s omezením tuků a chemických přísad. Osvědčilo se pití zeleného čaje, bylinkového čaje z máty peprné, šťáva z červené řepy.

Především v léčbě novorozenecké žloutenky se osvědčila fototerapie. Obecně je dokázáno, že u lidí pobývajících v tropických oblastech se méně často vyskytuje hyperbilirubinémie.

1.7 Antioxidanty

Lidské tělo potřebuje v klidu asi 250 ml/min. kyslíku (asi 350 l/den). Jeho potřeba se samozřejmě zvyšuje při fyzické námaze. V těle se přitom nemohou vytvořit žádné podstatné rezervy kyslíku, při přerušení jeho dodávky. Největší část kyslíku spotřebovaného buňkami organismu (až 90%) je využito v aerobním energetickém metabolismu pro výrobu ATP.

V našem organismu neustále vznikají částice, které pro nás představují trvalé potenciální nebezpečí. Tyto částice, odborně nazývané volné radikály, jsou vysoce reaktivní, "neúplné" (nenasyčené) molekuly, které jsou schopné přijmout vazebný elektron jiné sloučeniny, se velmi ochotně spojují s jinými sloučeninami a mění je. Mohou tak poškodit buňky, oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Volné radikály jsou látky, které se v těle tvoří při látkové přeměně, při obraně před bakteriemi a při expozici ultrafialovým nebo ionizačním zářením.

Kyslík se může organismu stát toxickým. Toxicita kyslíku závisí na výši jeho parciálního tlaku a na délce expozice tkání jeho zvýšenému tlaku (koncentraci). Toxicitu kyslíku způsobuje tvorba volných kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály vznikají při využívání kyslíku mitochondriemi jako konečného příjemce elektronů. Až 2% spotřebovaného kyslíku se nepřemění přímo na vodu, ale dá vznik superoxidu = kyslíkový radikál s jedním volným elektronem (O_2^-). Superoxid spontánně přechází na méně reaktivní peroxid vodíku (H_2O_2). Tato reakce je významně urychlována enzymem superoxidodismutázou, který je přítomen téměř ve všech buňkách. Kyslíkové radikály poškozují různé makromolekuly (lipidy, bílkoviny, nukleové kyseliny, sacharidy) v buněčné i v mezibuněčné hmotě.

V případě lipidů dochází k jejich peroxidaci v místě nenasyčených vazeb mastných kyselin, u proteinů k jejich fragmentaci nebo přidání karbonylových skupin, u nukleových kyselin ke změně jednotlivých nukleotidových bází, přerušení DNA řetězce a k příčnému spojování bází. Kyslíkové radikály mají krátkou životnost. Existuje proto rovnováha mezi vznikem a zánikem kyslíkových radikálů, jejíž výsledkem je jejich aktuální koncentrace. Ta se často označuje pojmem „oxidativní stres“. Významným zdrojem kyslíkových radikálů jsou situace, kdy se v tkáni zvyšuje spotřeba kyslíku činností mitochondrií v důsledku nahromadění ADP. Zdrojem kyslíkových radikálů mohou být také některé léky (např. cytostatika bleomycin nebo adreomycin) nebo jiné chemické látky. Peroxidace lipidů je také zdrojem volných radikálů, je zodpovědná na žluknutí potravin, poškození tkání in vivo → příčina rakoviny, zánětů, aterosklerosy atd. Peroxidace in vivo je katalyzována sloučeninami obsahující hem, lipoxygenasami, které jsou obsaženy v trombocytech a leukocytech. (21)

Látky, které mají schopnost volné radikály zničit, resp. blokovat, se nazývají antioxidanty.

Potrava obsahuje řadu látek, které jsou zdrojem volných radikálů nebo jejich vznik podporují:

- dusitaný
- chlór
- kyslíkové radikály, kyslík, ozón, peroxidy, kysličníky a jejich reaktivní sloučeniny (s volným vazebným elektronem na skupině obsahující kyslík)
- uhlovodíky (benzopyren)
- těžké kovy
- železo a měď, zejména v určitých sloučeninách a kombinacích působí jako volné radikály
- herbicidy, pesticidy
- jako volné radikály mohou působit i jinak cenné polynenasycené tuky
- tuky přepálené a vlivem tepla, světla a času za přístupu vzduchu zoxidované (žluklé)

Mnoho oxidantů pochází z okolního prostředí, nebo vlivem okolního prostředí stoupá jejich produkce v těle a má ničivé účinky. Mezi tyto činitele patří UV- a další ionizující

(ionizační) záření, látky znečišťující ovzduší, toxické průmyslové chemikálie, pesticidy, kontaminované potraviny, cigaretový kouř a drogy. Také stres je jednou z mnoha příčin snižování hladiny antioxidantů v lidském těle v moderní době. Tyto faktory přispívají k nemocnosti a stárnutí většinou skrze proces, kdy kyslík reaguje s jistými sloučeninami a vytváří volné radikály kyslíku. *Kyslík je vlastně paradoxně nejčastější složkou a nejvýznamnějším zdrojem volných radikálů.*

Účinek antioxidantů zeslabuje chlorovaná pitná voda, některá umělá sladidla a z léků projímadla, některé hormonální léky a antikoncepční pilulky. (19)

2. CÍL PRÁCE

2.1 Heterozygot vs. Homozygot

V diplomové práci jsme vyhodnocovali počet pacientů jednotlivého genotypu, tj. homozygota nebo heterozygota, a tím zmapovali situaci v české populaci.

2.2 Bilirubin a klinika

Práce vysvětluje metabolismus bilirubinu, jeho poruchy a následky z toho vyplývající. Zaměřuje se hlavně na jeho vztah s hemoglobinem, nejsou opomenuty farmakogenetické aspekty.

2.3 GS a oxidativní stres

Bilirubin se stává přínosný pro svoji schopnost vychytávat singletní kyslík při oxidačním stresu. Nelze opomenout cytoprotektivní účinky biliverdinreduktázy.

3. METODIKA

3.1 Soubor vyšetřených pacientů

Zpracovávali jsme data od 82 normálních homozygotů (genotyp 6TA/6TA), 102 heterozygotů (6TA/7TA) a 32 homozygotů (7TA/7TA).

Bylo vyšetřeno 217 pacientů, z toho 56 mužů a 161 žen, ve věku 10-66 let.

3.2 Vyšetřovací metoda

Pro zpracování odebraných vzorků byla použita metoda PCR a sekvenace. Doba zpracování vzorků trvá 10-14 dní, statimové vyšetření je zhotoveno do 3 dnů.

Sekvenování DNA

Sekvenování je metoda, která stanoví primární strukturu nukleové kyseliny, tj. určení její nukleotidového pořadí. Používá se Langerova enzymová metoda, v některých případech metoda dle Maxima a Gilberta. Obě techniky poskytují směs oligonukleotidů, často značených radionuklidem, které začínají určitým nukleotidem a končí v náhodném místě řetězce. Směs různě dlouhých oligonukleotidů se rozdělí elektroforézou v polyakrolovém gelu. Detekce jednotlivých řetězců se provádí pomocí autoradiografie. Analyzované molekuly se nejprve rozštěpí na vzájemně se překrývající fragmenty požadované délky, které se klonují ve vhodném vektoru. Značené produkty polymerační reakce se elektroforeticky rozdělí a vyhodnocením autoradiografického obrazu se určí nukleotidové pořadí analyzovaného fragmentu DNA. Pořadí nukleotidů v celé molekule DNA se zjistí na základě analýzy nukleotidových sekvencí překrývajících se fragmentů.

Sekvenování DNA vyžaduje: vyhledání příslušného klonu v genomové nebo cDNA-knihovně, jeho namnožení a izolaci nekombinované DNA, vyštěpení cílové DNA-sekvence a její oddělení od vektorové DNA.

Dlouhé molekuly DNA se dále fragmentují a vzniklé štěpy se subklonují ve vektorech odvozených od fága M13. Je-li známa restriční mapa analyzované DNA, je možné fragmentaci provádět odpovídajícími restričními enzymy. Nebyla-li restriční analýza provedena, použije se náhodná enzymová nebo mechanická fragmentace DNA, kterou se získají řetězce vhodné délky. Vznikne tak vysoký počet vzájemně se překrývajících klonů, které se postupně sekvenují.

Náhodný způsob fragmentace DNA

Soubor překrývajících se fragmentů vhodné délky se získá náhodnou fragmentací analyzované DNA. Provádí se částečným štěpením směsí restričních endonukleas, jejichž rozpoznávací sekvence se často vyskytují v DNA. Molekula DNA se mechanicky rozbije ultrazvukem. Nejprve se studovaná DNA rozbitím cirkularizuje,

aby se zajistilo náhodné rozbití molekuly na fragmenty o přibližně stejné délce. Tyto fragmenty se izolují gelovou elektroforézou a po zarovnání jejich konců se spojí s linearizovaným fágovým vektorem. Rekombinantní DNA se potom transformují vhodné bakteriální buňky. Izolovaná jednořetězcová DNA virových partikulí jednotlivých klonů slouží jako templář pro sekvenování Langerovou technikou. Na základě analýzy překrývajících se DNA-sekvencí jednotlivých klonů se určí nukleotidové pořadí celé analyzované molekuly.

Řízené sekvenování

Sekvence delší než 500 nukleotidů vložené do fága se sekvenují po úsecích. Jedna z variant řízeného sekvenování je založena na postupném posunu primerového místra podél DNA-templátu. Univerzální sekvenční primer se použije k sekvenování koncového úseku analyzované DNA. Po zjištění této sekvence se nasyntetizuje oligonukleotidový primer podle její koncové části a použije se pro sekvenování dalšího úseku DNA. Podle koncové sekvence tohoto úseku se obdobně připraví další primer a celý cyklus se opakuje, dokud se nedokončí sekvenování celého inzertu.

Alternativní způsobem je vytvoření souboru zkracujících se fragmentů vzniklých postupným exonuleasovým odštěpováním nukleotidů z jednoho konce vložené DNA.

PCR (polymerázová řetězová reakce)

(polymerase chain reaction) je metoda zmnožení určité sekvence DNA. Její specifčnost je založena na použití dvou výchozích nukleotidových jednotek (primerů), které hybridují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Vzorek DNA je nejdříve zahříván, aby se oddělila obě vlákna, primery se nechají navázat na DNA a každé vlákno je kopírováno DNA-polymerasou počínajíc od primeru. Dvě vlákna DNA slouží pak jako matrice pro syntesu nové DNA ze dvou primerů. Opakování cyklů denaturace, připojení primerů k jejich komplementárním sekvencím a prodlužování připojených primerů DNA polymerasou vede k exponenciálnímu množení segmentů DNA a definované délce.

Fragmentální analýza

Fragmentová analýza umožní přesné stanovení velikosti DNA fragmentů s využitím kapilárové elektroforézy s následnou laserovou detekcí.

Fluorescentní značení a současné detekce různých barev umožní detekci vícerych, navzájem se překrývající fragmentů vhodných pro PCR aplikace. Velikost fragmentů se vypočítá podle velikostní křivky.

(14,16,5,25)

3.3 Genealogické vyhodnocení

Rodokmenové údaje (tj. genealogie) se staly klíčovými pro zpracování tématu GS. V každé zdravotní dokumentaci jednotlivého pacienta bylo přiloženo genetické vyšetření a hematologické a biochemické laboratorní nálezy.

Údaje ze zdravotní dokumentace jednotlivých pacientů byly opsány a statisticky zpracovány.

4. VÝSLEDKY

Celkem bylo vyšetřeno 217 pacientů, z toho 56 mužů a 161 žen.

Z 218 vzorků DNA bylo určeno 83 homozygotů 6TA/6TA, 102 heterozygotů 6TA/7TA a 32 homozygotů 7TA/7TA.

Procentuální zastoupení námi vyšetřovaných pacientů činí 39,52 % homozygotů 6TA/6TA, heterozygotů 6TA/7TA 46,79% a 14,68% homozygotů 7TA/7TA.

Frekvence heterozygotů v české populaci je udávána až 40%. Frekvence homozygotů v české populaci až 12%.

Námi stanovené výsledky se jen nepatrně liší od výsledků, které poskytl SZÚ.

Data byla statisticky zpracována testem X^2 (chí-kvadrát) a Fisherovým testem.

Tabulka č.3: Genotyp a četnost specifických onemocnění přehledně ukazuje rozdíly ve výskytu jednotlivých chorob u různých genotypů. Samozřejmě je třeba vzít v úvahu počet vyšetřovaných vs. výskyt choroby (tj. Genotyp 5TA/7TA se vyskytl pouze u 1 pacienta, tomu odpovídá snížený celkový výskyt chorob).

Tab.č.3: Genotyp a četnost specifických onemocnění

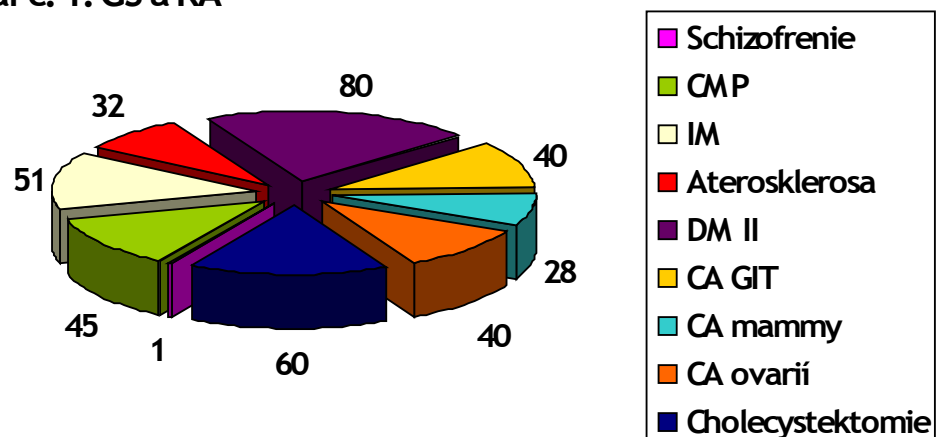
Choroby	6TA/6TA	%	6TA/7TA	%	7TA/7TA	%
Schizofrenie	0	0	0	0	1	3,13
CMP	3	3,61	0	0	10	31,25
IM	6	7,23	2	1,96	8	25
Aterosklerosa	14	16,97	3	2,94	5	15,63
DM II	30	36,14	50	47,62	22	68,75
CA mammy	0	0	0	0	6	28,6
CA GIT	20	24,09	28	27,45	6	18,75
Ca ovaríí	15	25,4	10	12,35	12	57,1
CHE	3	3,61	4	3,92	8	25

Tab.č.4 : GS a RA (rodinná anamnéza) + graf č.1 se zabývá celkovým výskytem chorob u vyšetřovaných rodin probandů. Nejvyšší % zaujímá diabetes mellitus II. typu, na druhém místě typicky „žlučnicková“ choroba, třetí místo obsadili zástupci kardiovaskulárních onemocnění : infarkt myokardu a cévní mozková příhoda. Zastoupení jednotlivých chorob odpovídá zastoupení chorob v běžné populaci.

Tab.č.4: GS a RA

Choroby	Počet
Schizofrenie	1
CMP	45
IM	51
Aterosklerosa	32
DM II	80
CA GIT	40
CA mammy	28
Ca ovarií	40
Cholecystektomie	60

Graf č. 1: GS a RA

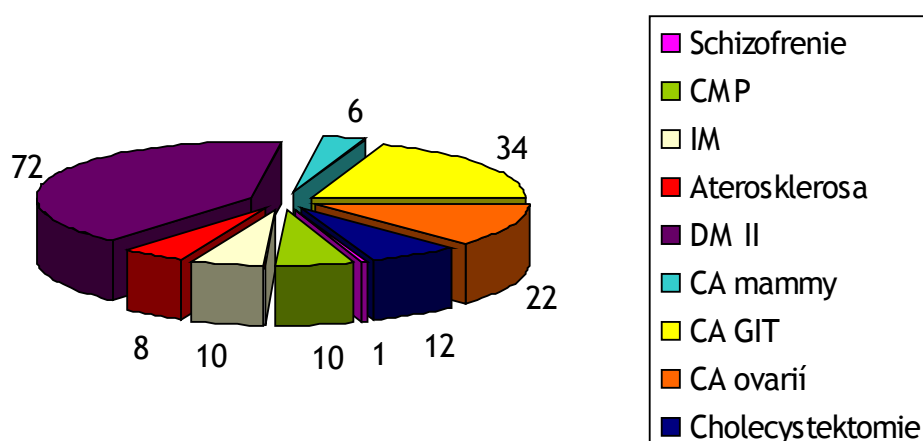


V tab.č.5: GS a specifická onemocnění + graf.č.2 je shrnut procentuální výskyt nemocí u suspektních GS (proto nejsou zhodnoceni pacienti s genotypem 6TA/6TA). Na prvním místě četnosti je opět DM II, druhé nejpočetnější jsou karcinomy. Na třetím místě četnosti se umístila cholecystoektomie, resp.cholecystolitiáza.

Tab.č.5: GS a specifická onemocnění

Choroba	6TA/7TA+ 7TA/7TA	%
Schizofrenie	1	0,74
CMP	10	7,46
IM	10	7,46
Aterosklerosa	8	5,97
DM II	72	53,73
Ca mammy	6	4,47
Ca GIT	34	25,37
Ca ovarií	22	16,42
Cholecystektomie	12	9,09

Graf č.2: GS a specifická onemocnění



Tab.č.6: Genotyp a specifická onemocnění

Choroba	Skupina	n celkem	n ano	n ne	6TA/6TA	6TA/6TA	6TA/7TA	P celkové
					6TA/7TA	7TA/7TA	7TA/7TA	
Schizofrenie	6TA/6TA	83	0	83	nelze	0,2782	0,2388	0,0548
	6TA/7TA	102	0	102				
	7TA/7TA	32	1	31				

CMP	6TA/6TA	83	3	80	0,0884	0,0001	0,0001	0,0001
	6TA/7TA	102	0	102				
	7TA/7TA	32	10	22				
IM	6TA/6TA	83	6	77	0,0824	0,0138	0,0002	0,0001
	6TA/7TA	102	2	100				
	7TA/7TA	32	8	24				
Aterosklerosa	6TA/6TA	83	14	69	0,0011	0,8723	0,0190	0,0041
	6TA/7TA	102	3	99				
	7TA/7TA	32	5	27				
DMII	6TA/6TA	83	30	53	0,0787	0,0016	0,0508	0,0062
	6TA/7TA	102	50	52				
	7TA/7TA	32	22	10				
Ca mammy	6TA/6TA	59	0	59	nelze	0,0002	0,0002	0,0001
	6TA/7TA	81	0	81				
	7TA/7TA	21	6	15				
Ca GIT	6TA/6TA	83	20	63	0,6047	0,5391	0,3237	0,5971
	6TA/7TA	102	28	74				
	7TA/7TA	32	6	26				
Ca ovarií	6TA/6TA	59	15	44	0,0460	0,0083	0,0001	0,0001
	6TA/7TA	81	10	71				
	7TA/7TA	21	12	9				
CHE	6TA/6TA	83	3	80	0,6129	0,0015	0,0012	0,0001
	6TA/7TA	102	4	98				
	7TA/7TA	32	8	24				

Podle výsledků tabulky č.6 se podařila prokázat statisticky významná závislost mezi zdravými (tj.6TA/6TA) a homozygoty (7TA/7TA)u 6 chorob:

CMP (hladina významnosti 0,001), IM (0,05), DM II (0,01, Ca mammy (0,001), Ca ovarií (0,01) a CHE (0,01). U zbývajících 3 chorob se statisticky významná závislost neprokázala.

5. DISKUZE

5.1 Bilirubin, farmakogenomika a medicína

Asi 90% veškerého nekonjugovaného bilirubinu se v systémové cirkulaci váže na hlavní transportní bílkovinu = albumin. Zbývajících 10% je v cirkulaci vázáno na apolipoprotein D v molekule HDL-lipoproteinu. Stejně jako ostatní sloučeniny vázané na albumin není nekonjugovaný bilirubin filtrován ledvinami a hlavní cestou jeho vylučování je sekrece játry do žluče po konjugaci s kyselinou glukuronovou. Avšak albumin je schopen nekovalentní vazbou vázat i konjugovaný bilirubin. Konjugovaný bilirubin se váže na stejné vysoce afinitní vazebné místo pro nekonjugovaný bilirubin, ale s podstatně nižší afinitou.

Není zcela objasněn intracelulární transport konjugovaného bilirubinu z jaterních mikrozomů ke kanalikulární membráně. Přikláním se ke klíčové úloze cytoskeletárního proteinu radixinu, který váže protein ABCC2 (kanalikulární přenašeč konjug. bilirubinu) ke kanalikulární membráně.

Je zajímavé, že játra nejsou jediným orgánem v těle, která vlastní enzymovou výbavu pro aktivitu UGT1A1. Aktivita UGT1A1 byla rovněž prokázána ve sliznici tenkého střeva. Bylo dokonce popsáno významné snížení sérového bilirubinu u nemocných s Criglerův-Najjarovým syndromem po transplantaci tenkého střeva. (6)

Hlavní eliminační cestu bilirubinu z lidského těla představuje konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou a sekrece konjugátů bilirubinu do žluče. Nekonjugovaný bilirubin však může být katabolizován monoxygenázami systému cytochromu P-448. Tyto enzymy nejsou fyziologicky v játrech příliš exprimovány, jejich exprese se však výrazně zvyšuje za podmínek nekonjugované hyperbilirubinemie. Tyto monoxygenázy jsou indukovatelné např. látkou **indol-3-karbinol**. Výzkum ukazuje, že indol-3-karbinol je efektivní i při nádorech prostaty. Firestone z univerzity v Kalifornii vedl v roce 1999

zajímavou laboratorní studií na krysách, která dokázala, že indol-3-karbinol dokáže blokovat buněčný cyklus na G1 receptoru nádorových buněk efektivněji než tamoxifen. V roce 2003 byla tato studie zopakovaná a potvrzená na lidských karcinomových buňkách prostaty. Indol-3-karbinol indukoval blokádu buněčného cyklu na G1 receptoru, inhiboval syntézu prostatického specifického antigenu PSA syntetizovaného v LNCaP nádorových buňkách prostaty, inhibicí CDK (cyklin-dependentní kináza) a stimulací inhibitora p16 CDK. Prvotní studie, kterou vedl Bradlow v letech 1994 byla určená na zjištění schopnosti indol-3-karbinolu stimulovat syntézu 2 α -hydroxyestronu (2-OHE1). Experimentální testy zahrnovaly dvě skupiny žen. Jedna testovací a druhá kontrolní, 20 žen v každé skupině. Pacientky z první skupiny dostávaly indol-3-karbinol 400 mg každý den po dobu 3 měsíců, zatím co kontrolní skupina dostávala placebo. Standardní biochemické krevní testy a měření ukazatelů 2-OHE1/16 α -OHE1 byli vykonané každých 30 dní. Tyto studie ukazují, že biochemické parametry byli identické v obou skupinách, testovací i kontrolní. U 17 z 20 pacientek z testovací skupiny došlo ke zlepšení ohledně markerů ve prospěch koeficientu metabolitu estradiolu 2-OHE1 a na této hladině zůstali i v průběhu dalších 3 měsíců po přerušení podávání indol-3-karbinolu.

V další placebem kontrolované klinické studii se u pacientek s dysplazií děložního čípku, st. CIN II a III potvrdila statisticky spolehlivá regrese nálezu v porovnání s kontrolní skupinou. Pacientky dostávaly 200-400 mg indol-3-karbinolu denně po dobu 12 týdnů. V testovací skupině se pozorovala úplná regrese nálezu v 48%, oproti placebo se v kontrolované skupině nezaznamenal ani jeden případ regrese. Tyto skutečnosti přivedli autory k závěru, že indol-3-karbinol je schopný ovlivňovat metabolismus estrogenů.

V roce 1997 byli vykonané podobné klinické testy ve Spojených státech amerických pod záštitou Preventivního fondu výzkumu rakoviny. V klinické studii bylo testovaných 60 žen. Byli rozdělené do třech skupin: kontrolní skupina (placebo), skupina s nízkou dávkou indol-3 karbinolu (50, 100 a 200 mg denně) a skupina s vysokou dávkou indol-3-karbinolu (300 a 400 mg denně). Indol-3-karbinol byl podáván denně po dobu 4 týdnů. Koeficienty 2-OHE1/16 α -OHE1 byli měřené u všech účastníků jako biomarkery terapeutické efektivity podávaného preparátu. Hlavní výsledky této studie byli stručně sumarizované následovně:

Vedlejší účinky byly nepřítomné ve 100% všech případů. Minimální dávka způsobující posun v koeficientech 2-OHE1/16a-OHE1 byla 300 mg. Doporučená preventivní dávka byla 300-400 mg.

Další klinická studie efektivity indol-3-karbinolu byla také vedena pod záštitou Preventive Cancer Research Fund v roce 1998. V této studii ženy, dobrovolnice ve věku 35-47 let, užívali indol-3-karbinol v denní dávce 400 mg 2 měsíců. Výrazně zvýšená hladina 2 α -hydroxyestronu (2-OHE1) v krvi potvrdila vysokou klinickou účinnost indol-3-karbinolu. Stabilní, více jak dvojnásobný nárůst hladiny 2 α -hydroxyestronu oproti 16 α -hydroxyestronu (OHE1) byl důkazem adekvátní regulace metabolismu estrogenu a důkazem příznivých účinků indol-3-karbinolu.

Tyto účinky indol-3-karbinolu v ovlivňování mastopatie, myomů dělohy a dysplazií děložního čípku byli klinicky testované proto, aby potvrdili početné experimentální záznamy o jeho vysokých léčebných účincích ve farmakologické regulaci různých hyperplastických stavů. (12)

Tímto způsobem by mohlo dojít k farmakologické terapii závažných nekonjugovaných hyperbilirubinemií.

Bilirubin inhibuje NADPH-oxidázu, důležitý enzym v patogenezi řady onemocnění. Bilirubin také zmírňuje alergické reakce a stabilizuje žírné buňky. Kasuistická klinická data naznačuje, že hyperbilirubinemie by mohla působit proti bronchiálnímu astmatu. (6)

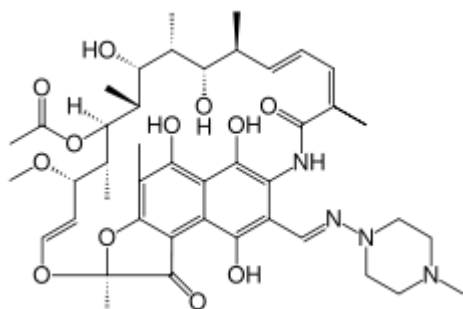
Prognóza GS je velice příznivá. Pacientova pracovní a sportovní zátěž není nijak omezená. Léčba není nutná, většina pacientů s benigní hyperbilirubinemií žádnou léčbu nepotřebuje. V případě subjektivních potíží lze indikovat hepatoprotektiva + jaterní dietu.

Intenzivně se zkoumá možné zvýšení hladiny bilirubinu v krevním séru. Denní produkce bilirubinu téměř 4x převyšuje doporučený příjem vitamínu C a 20-30 x doporučený příjem vitamínu E.

Hladinu bilirubinu (interferencí s enzymem UGT 1A1) zvyšuje např. urikosurikum **probenecid**. Urikosurika zvyšují vylučování kyseliny močové ledvinami. Urikosurika

jsou organické kyseliny (organické aniony), které inhibují v proximálním tubulu nefronu tubulární transport jiných organických látek. Probenecid byl původně vyvinut jako látka umožňující udržet vyšší hladinu penicilinu. Mechanismus hyperbilirubinemického účinku probenecidu spočívá v inhibici transportu UDP-glukuronové kyseliny z cytoplasmy do endoplazmatického retikula, kde je využívána pro konjugační procesy.

Podobným mechanismem zvyšuje hladiny bilirubinu i antituberkulotikum **rifampicin**.



Obr.č.15: Rifampicin

Rifampicin nebo také rifampin (dle americké nomenklatury) je baktericidní antibiotikum ze skupiny rifamycinů. Jedná se semisyntetický produkt izolovaný z [plísně *Amycolatopsis rifamycinica*](#). Rifampicin je dominantním lékem při léčbě [tuberkulózy](#) a [lepry](#). Je účinný rovněž proti infekcím způsobených bakteriemi rodů *Listeria*, *Legionella*, *Haemophilillus*, *Neisseria*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici RNA v bakteriálních buňkách, tím je znemožněna transkripce do mRNA a nedochází k syntéze proteinů.

Transport UDP-glukuronové kyseliny inhibuje i nesteroidní antirevmatikum **diklofenak**, derivát kyseliny fenyloctové. Rychle a úplně se absorbuje z GIT, vrchol plazmatické hladiny je za 2-3 hodiny. Metabolizuje se v játrech hydroxylací a konjugací a vylučuje se močí i žlučí. Většina nesteroidních protizánětlivých látek inhibuje také účinky chemotaktických látek a imunitních komplexů na neutrofilů, kde jejich působením dochází k uvolnění proteáz, prozánětlivých faktorů, volných radikálů i leukotrienů B₄. Konkrétně u diclofenacu vystupuje do popředí blokáda tvorby a vychytávání volných radikálů. (8)

Gen UGT1A1 je vysoce polymorfní, a to jak v oblasti promotoru, tak v kódujících oblastech. UGT1A1 glukuronozyluje kromě bilirubinu i glutation, pohlavní hormony, **amtryptilin**, **ketokonazol**, inhibitory proteáz, **ketoprofen**, některá xenobiotika. Byla popsány řada polymorfních kombinací jednotlivých variant genu, např. UGT 1A1*28 (GS), UGT 1A3, UGT1A6, AGT 1A7. Jakákoliv z těchto polymorfní varianta může vést k nedostatečné biotransformaci specifických léků. (6) V případě GS se jedná o inhibitor topoizomerázy **irinotecan**, používá se v terapii kolorektálního karcinomu. Základní látka s protinádorovými účinky byla v r.1966 izolována z rostliny *Camptotheca acuminata*. Je to alkaloid, nazvaný camptothecin (CPT). V r.1985 byl nalezen mechanismus jeho protinádorového účinku. Je jím inhibice topoizomerázy I (TOPO I). TOPO I se váže na jeden řetězec DNA a přerušuje ho. Vznikne ireparabilní jednovláknový zlom, který je pro buňku letální. Aby byl vliv CPT významný, musí být obsah TOPO I v buňce vysoký. Právě to má klíčový význam: zatímco ve zdravých buňkách lidských tkání je TOPO I málo, v nádorových buňkách (zejména v buňkách kolorektálního karcinomu) je jí značné množství. Zavedením irinotecanu a oxalplatinu do léčby metastatického karcinomu tlustého střeva došlo k výraznému zlepšení léčebných výsledků. První výsledky studií v kombinaci irinotecanu s fluorouracilem a leucovorinem, které přinesly zásadní obrat do léčby, byly publikovány v roce 2000. Ve FN MOTOL bylo od roku 1999 do 2004 léčeno 51 nemocných kombinací 180 mg/m² irinotecanu v 90 minutové infuzi první den s následným bolusovým podáním leucovorinu 200 mg/m² a 400mg/m² bolusovou aplikací 5-FU s nasedající 22 hodinovou infuzí první a druhý den každého cyklu po 14 dnech (FOLFIRI). Kompletní léčebné odpovědi bylo dosaženo u 6 nemocných (11,76 %), parciální odpověď u 11 (21,57 %), ke stabilizaci onemocnění došlo u 23 (45,1 %) nemocných a 11 (21,57 %) nemocných progredovalo na této léčbě. Medián přežívání v našem souboru byl 18 měsíců (95% CI, 16,93–19,07). Medián trvání odpovědi byl 9 měsíců (CI 95% 8,25–11,5). Kombinace FOLFIRI je léčbou pro první linii metastatického kolorektálního karcinomu prodlužující přežití se zvládnutelnými nežádoucími účinky a při zachování dobré kvality života. Nicméně začlenění nových přípravků biologické cílené léčby může nadále zlepšit přežívání nemocných s touto diagnózou. (14)

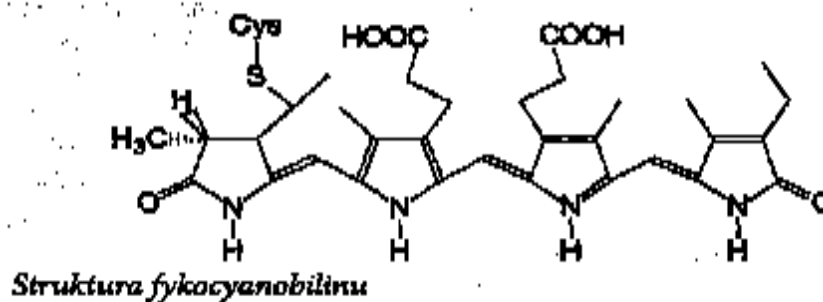
Indinavir patří mezi retrová antivirotika – tyto látky blokadou virové reverzní transkriptázy brání přepisu virové RNA. Podáním těchto látek se zpomalí průběh HIV infekce a prodlouží se délka i kvalita života pacientů s AIDS. Léčba indinavirem (je

metabolizován prostřednictvím cytochromu CYP 4503A4 (částečně i enzymem UGT1A1) způsobuje nekonjugovanou hyperbilirubinémii a zvýšenou hemolýzu. Diskutabilní je indikace indinaviru jedincům s GS, kteří mají již primárně sníženou aktivitu konjugačního enzymu.

Etinylestradiol je estrogenní složka perorální antikoncepce, který je také metabolizován enzymem UGT1A1. U žen s GS byla shledána snížená citlivost k tomuto hormonu. (6)

5.2 Alternativní zdroje hyperbilirubinémie

Alternativní cesta navýšení sérového bilirubinu by mohla představovat zpracování tzv.fykobilinů.



Obr.č.16: Struktura fycocyanobilinu

Fykobiliny jsou teratrapyrolové molekuly - tetrapyrolová část molekuly má velmi podobnou strukturu jako bilirubin a biliverdin (viz.obr. 6) a vyskytují se pouze u sinic, bakterií a sladkovodních řas. Fykobiliny vznikají degradací hemu působením enzymů HO za vzniku biliverdinu s jeho redukcí biliverdinreduktázou a následnou izomerizací na jednotlivé fykobiliny. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že fykobiliny mají účinky nejen antioxidační, ale také protizánětlivé a antialergické. Široké využití perorálních bioaktivních tetrapyrolů není možné z hlediska výtěžnosti v něm obsaženému bilirubinu. Intenzivně se zkoumá možné zvýšení hladiny bilirubinu v krevním séru. Denní produkce bilirubinu téměř 4x převyšuje doporučený příjem vitamínu C a 20-30 x doporučený příjem vitamínu E. Denní produkce bilirubinu je cca 300-400mg/den. Terapeutický účinek by nastal až po konzumaci min.500g/den. (6)

5.3 Diagnóza GS

Pigmentové žlučové kameny se vyskytují jednak u pacientů s monoglukuronozyl bilirubinu ve žluči (tj. snadněji se dekonjuguje), jednak u pacientů trpící hemolytickou anemií nebo u pacientů s poruchou erytropoézy.

Kapacita UGT1A1 (potřebná ke konjugaci bilirubinu na obou karboxylových skupinách) nestačí zvýšenému přísunu bilirubinu do tkáně → snižuje se poměr bis- a monoglukuronozyl bilirubinu.

Prognóza GS je velice příznivá. Pacientova pracovní a sportovní zátěž není nijak omezená. Léčba není nutná, většina pacientů s benigní hyperbilirubinemií žádnou léčbu nepotřebuje. V případě subjektivních potíží lze indikovat hepatoprotektiva a jaterní dietu.

V patologicky orientované literatuře se uvádí výskyt GS až 7%, převážně mužů. Jaterní tkáň nevykazuje patologické změny. Po 30. roce života se enzymatická porucha spontánně upravuje.(22)

Potvrzením diagnózy GS se pacientům uleví → nejedná se o žádné vážné onemocnění (jaké si může pacient vsugerovat na základě symptomů).

5.4 Bilirubin a oxidativní stres

Hyperbilirubinémie představuje „zabijáka“ volných radikálů, tzv. nahromaděný bilirubin se projevuje antioxidačním účinkem.

Tato schopnost umožňuje výrazně snížit rozvoj aterosklerózy koronárních a periferních cév a onemocnění podmíněné oxidačním stresem, především ischemickou chorobu srdeční (ICHS). Dále se tento ochranný účinek týká cév mozku → nižší incidence cévní mozkové příhody (CMP).

6. ZÁVĚR

Z 218 vzorků DNA bylo určeno 83 homozygotů 6TA/6TA, 102 heterozygotů 6TA/7TA a 32 homozygotů 7TA/7TA.

Procentuální zastoupení námi vyšetřovaných pacientů činí 39,52 % homozygotů 6TA/6TA, heterozygotů 6TA/7TA 46,79% a 14,68% homozygotů 7TA/7TA.

Frekvence heterozygotů v české populaci je udávána až 40%. Frekvence homozygotů v české populaci až 12%.

Námi stanovené výsledky se jen nepatrně liší od výsledků, které poskytl SZÚ.

Incidence onemocnění se nijak výrazně neliší od výskytu chorob obecně v české populaci. U příbuzných I. a II. typu (RA) i u vyšetřovaných pacientů měl nejvyšší výskyt diabetes mellitus II. typu, stejně jako u pacientů s genotypem 6TA/7TA + 7TA/7TA .

Cholecystitida s cholecystolitiásou (následovaná cholecystektomií) se u rodin vyskytovala na druhém místě, u GS pacientů na čtvrtém místě (Ca ovarií se nevyskytuje u mužů). Cholecystolitiásu můžeme proto označit jako chorobu spojenou s GS. Naproti tomu nízký výskyt karcinomu u susp. GS potvrzuje obecně známý fakt, že jedinci s GS mají prokazatelně nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění. 25% . (23) Výskyt karcinomu gastrointestinálního aparátu lze vysvětlit nadměrnými nároky na organismus, který má narušený metabolismus bilirubinu. Vyšší výskyt karcinomu ovarií popírá protektivní vliv genotypu UGT 1A1*28.

Nižší výskyt (cca 10%) kardiovaskulárních chorob ve sledovaném souboru potvrzuje teorii o bilirubinu jako důležitém antioxidantu, který chrání kardiomyocyt před ischemií a cévy před aterosklerózou.

Podle zpracovaných výsledků se podařilo prokázat statisticky významná závislost mezi zdravými (tj.6TA/6TA) a homozygoty (7TA/7TA)u 6 chorob: CMP (hladina významnosti 0,001), IM (0,05), DM II (0,01, Ca mammy (0,001), Ca ovarií (0,01) a CHE (0,01). U zbývajících 3 chorob se statisticky významná závislost neprokázala. Podle výsledků tabulky č.6 se podařilo prokázat statisticky významná závislost mezi zdravými (tj.6TA/6TA) a homozygoty (7TA/7TA)u 6 chorob:

CMP (hladina významnosti 0,001), IM (0,05), DM II (0,01, Ca mammy (0,001), Ca ovarií (0,01) a CHE (0,01). U zbývajících 3 chorob se statisticky významná závislost neprokázala.

Při uvažování všech 3 skupin genotypů (6TA/6TA, 6TA/7TA, 7TA/7TA) závisí výskyt 7 chorob (mimo schizofrenii a Ca GIT) na genotypu statisticky významně na hladině významnosti 0,01 resp.0,001.

Statisticky významný rozdíl je mezi zdravými (6TA/6TA) a heterozygotem (6TA/7TA) jen pro aterosklerosu (0,1) a pro Ca ovarií (0,05).

Statisticky významný rozdíl mezi heterozygoty (6TA/7TA) a homozygoty (7TA/7TA) je u CMP (0,001), IM (0,001), aterosklerosy (0,05), Ca mammy (0,001), Ca ovarií (0,001) a CHE (0,01).

Zatím se však nepodařilo zajistit vyšší dodávku bilirubinu do organismu tak, aby byla stravitelná a zcela využitelná.

Ve sledovaném souboru jsme nezaznamenali u pacientů starších 30. let ústup obtíží spojených s dg GS (naopak hladina bilirubinu po zátěži dosahovala 40 $\mu\text{mol/l}$).

7. SEZNAM LITERATURY

1. Otová B. A kol.: Lékařská biologie a genetika, Karolinum, 2008, 178-80-246-1594-3
2. Grim M., Druga R.: Základy anatomie 3. Trávicí, dýchací, močopohlavní a endokrinní systém, Galén, 2005, 80-7262-302-8
3. Konrádová V., Uhlík J., Vajner L.: Funkční histologie, H a H vyšehradská s.r.o., 2000, 80-86022-80-3
4. Nečas E. A kol.: Patologická fyziologie orgánových systémů část II, Karolinum, 2003, 80-246-0674-7
5. Křemen J., Pohlreich P., Stříbrná J.: Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně, Karolinum, 1998, 80-7184-504-3
6. Vítek L.: Bilirubin a interní choroby, Grada, 2009, 978-80-247-2351-8
7. Muray R.K., Granner D.K., Rodwell V.W.: Harperova biochemie, Nakladatelství a vydavatelství H a H, 1998, 80-85787-38-5
8. Hynie S.: Farmakologie v kostce, Triton, 2001. 80-7254-181-1
9. Musil J.: Molekulové základy klinické biochemie, Grada Avicenum, 1994, 80-7169-056-2
10. Anděl M., Gregor P., Horák J.: Hematologie díl IIIb, Galén, 2001, 80-7262-085-1
11. www.wikipedia.org/wiki/Gilbertův_syndrom
12. Věda pro praxi, Medicína 5/V, p. 1-6
13. Prausová J., Kubíčková K., Linke Z.: Irinotecan v kombinaci s 5-fluorourcilem a leukovorinem v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu, Čas.Lék.čes., 2005, pp.747-751
14. Kapras J., Kohoutová M.: Kapitoly z lékařské biologie a genetiky III., Karolinum, 2007, 978-80-246-0001-7
15. Soukupová M., Soukup F.: Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II., Karolinum, 2005, 80-7184-581-7
16. Ledvina M, Stoklasová A.: Kompendium středoškolské chemie, Votobia, 1997, 80-7198-191-5
17. http://cs.wikipedia.org/wiki/Nukleová_báze
18. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Radikál>

19. www.celostnimediceina.cz/co_je_bilirubin.html
20. Nečas E.a kol.: Obecná patologická fyziologie, Karolinum, 2000, 80-246-0051X
21. Povýšil C. a kol.: Speciální patologie II.díl, Karolinum, 2003, 80-7184-484-5
22. www.pr-lab.cz
23. Kalousová et al.: Decreased levels of advanced glycation end-product in patients with Gilbert syndrome. Cell Mol Biol. 2005. vol..51, p.387-392
24. Schwertner HA, Vitek L.:Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin, Atherosclerosis 2008, p. 1043-1046
25. www.pathology.cz/molnabidka8.asp

8. PŘÍLOHY

Obr.č. 17 : Ostropestřec mariánský (Silybum marianum)

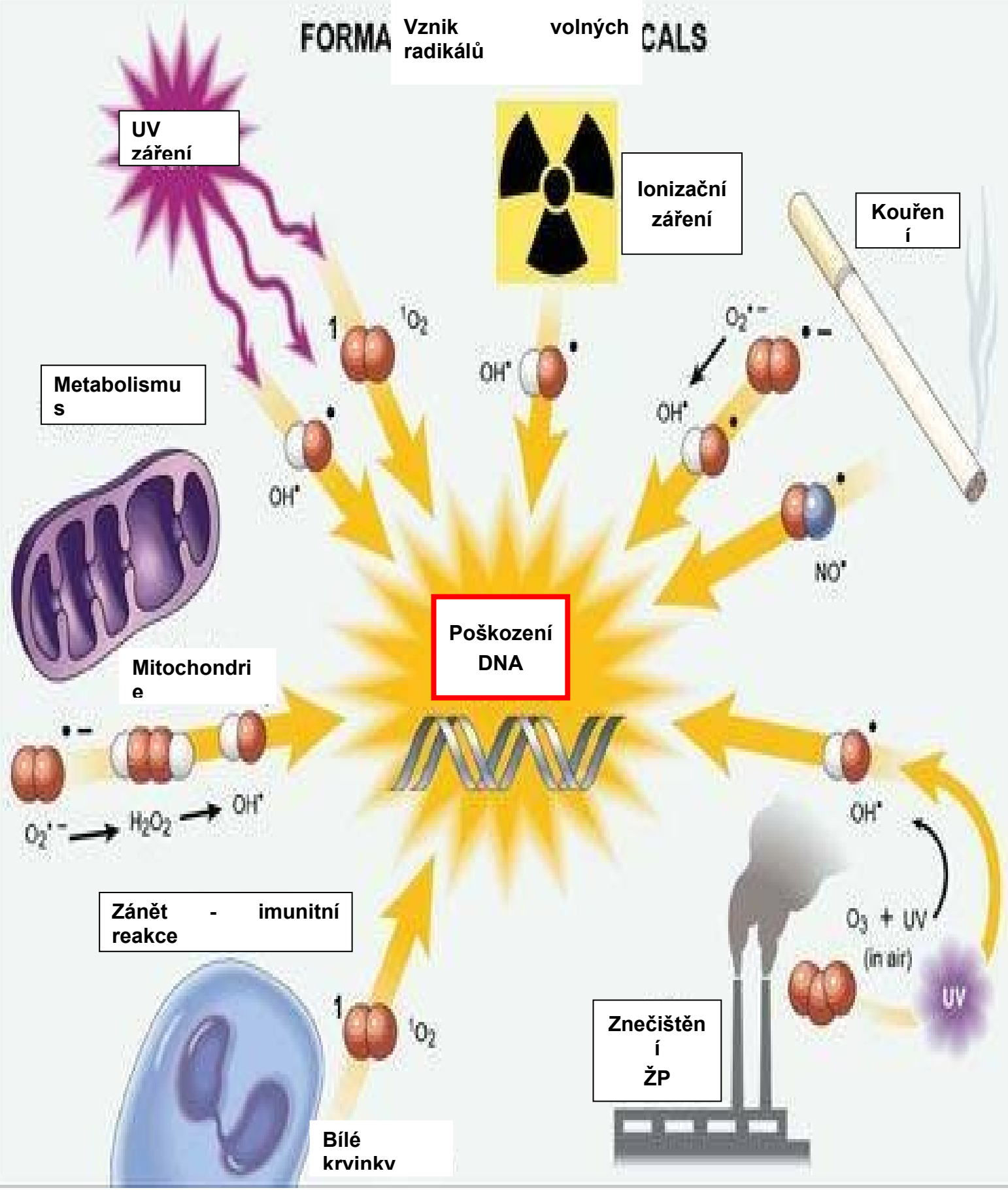


☐



Obr.č.18: Ostropestřec – potravinový doplněk

FORMA Vznik radikálů **volných** **CALS**



Obr.č.14: Vznik volných radikálů