

Produkty degradácie hému ako významné endogénne protektívne faktory

I. Očadlík, S. Oravec

Súhrn

Bilirubín bol až do roku 1987 minulého storočia považovaný za toxický odpadový produkt metabolizmu hému. Z posledných štúdií však vyplýva, že vykazuje antioxidantnú, antimutagénnu, antikomplementovú aktivitu a je významným endogénnym, protektívnym faktorom pre tkanivá. Nemenej zaujímavé vlastnosti majú aj ďalšie produkty degradácie hému – oxid uhoľnatý a biliverdín. Ide napríklad o vazodilatačné a imunomodulačné účinky oxidu uhoľnatého. Viacerí autori potvrdili, že exogénna aplikácia biliverdínu má u zvierat protektívne účinky pri experimentálnych transplantáciách. Mechanizmy, ktorými tieto látky ochraňujú tkanivá však zatiaľ nie sú do detailov preskúmané. V blízkej budúcnosti však možno očakávať výsledky prác, ktoré nielen prispejú k pochopeniu patogenézy viacerých chorôb a ich vzťahu k metabolizmu hému, ale poskytnú nám aj ďalšie možnosti v rámci prevencie a možno i liečby.

Kľúčové slová

hém – bilirubín – oxid uhoľnatý – biliverdín – protektívne faktory

Summary

Heme degradation products as important endogenous protective factors. Until 1990's in the past century bilirubin has been considered as a toxic waste product of heme catabolism. However recent data showed that it has antioxidant, antimutagen and anticomplement activity so it serves as an important protective factor for endogenous tissues. Carbon monoxide and biliverdin, the other products of heme catabolism have also interesting attributes, e.g. vasodilation and immunomodulatory effect of carbon monoxide. It was proven that biliverdin had protective effect in experimental transplantations in animals. However, complete mechanisms of protection by these substances had not yet been completely understood. The results of the next studies could provide us with deeper view to the relationship of heme metabolism and pathogenesis of some diseases, their prevention and maybe treatment.

Keywords

heme – bilirubin – carbon monoxide – biliverdin – protective factors

ÚVOD

Bilirubín bol do počiatku 90. rokov minulého storočia považovaný za toxický odpadový produkt metabolizmu hému, najmä v súvislosti s jeho potenciálom spôsobiť ireverzibilné poškodenie mozgu pri vysokých koncentráciách jeho nekonjugovanej formy, známe ako jadrový ikterus (kernikterus) novorodencov [1]. Priekopnícke práce Stockera z roku 1987 však naznačili, že bilirubín spolu s ďalšími substanciami vznikajúcimi pri degradácii hému majú významné ochranné účinky pre tkanivá, napríklad pri oxidačnom strese, endotelovej dysfunkcii, zápale či dokonca i onkogenéze.

METABOLIZMUS HÉMU

Hém má centrálnu úlohu v eukaryotických metabolických procesoch ako prostetická skupina hemoproteínov. Zúčastňuje sa na bunkovom dýchaní a oxidačnej biotransformácii v hemoglobíne, myoglobíne, cytochróme P450, NO syntáze i guanylátcykláze [2,3]. Najväčšie množstvo hému pochádza zo zostarnutých erytrocytov. Voľný hém je potenciálne cytotoxický. Dokáže rýchlo deštruovať membrány buniek a subcelulárnych štruktúr, katalyzuje peroxidáciu proteínov v membránach, cytoplazme, ako aj v sére. Je zodpovedný aj za oxidáciu LDL lipoproteínov, ktorá sa v súčasnosti považuje za dôležitú súčasť v patogenéze aterosklerózy.

Hlavným enzýmom, ktorý degraduje hém v organizme, je hémoxygenáza (HO). Tento mikrozomálny enzým degraduje hém za produkcie ekvimolárnych množstiev dvojmocného železa, oxidu uhoľnatého (CO) a biliverdínu IXa. Degradácia prebieha najmä v monocyto-makrofágovom systéme a v Kupfferových bunkách pečene. V ďalších krokoch biliverdínreduktáza konvertuje biliverdín na bilirubín a voľné dvojmocné železo je inkorporované do feritínu [4]. Bilirubín je uvoľnený do plazmy. Ako nepolárna, vo vode nerozpustná lipofilná substancia, je potenciálne cytotoxický. Preto je prenášaný vo väzbe na albumín až k sinusoidálnej membráne hepatocytov. Nasleduje jeho prenos cez

membránu a väzba na tzv. proteín Y (ligandín), ktorý zabraňuje jeho spätnému úniku do krvi. Nasledovne dochádza k jeho konjugácii s kyselinou glukuronovou prostredníctvom enzýmu uridíndifosfát-glukuronyltransferáza (UDP-GT). Týmto mechanizmom sa bilirubín stáva vo vode rozpustným a môže byť eliminovaný spolu s žľčovými kyselinami žľčou. V čreve je kyselina glukurónová z väzby uvoľnená baktériami prostredníctvom β -glukuronidázy a bilirubín je prostredníctvom reduktáz konvertovaný na bezfarebný urobilinogén. Oxidáciou urobilinogénu vznikajú urobilín a sterkobilín, ktoré sú spoločne s ich degradačnými produktmi zodpovedné za tmavé sfarbenie stolice. Časť urobilinogénu (cca 1 %) je reabsorbovaná, transportovaná portálnou vénou do pečene a opäť vylúčená do žľče (tzv. entero-hepatálny cyklus). Malé množstvo urobilinogénu je z tela eliminované močom [5].

PROTEKTÍVNE VLASTNOSTI PRODUKTOV KATABOLIZMU HÉMU

Bilirubín

Donedávna bola bilirubínu venovaná len malá pozornosť. Bol považovaný predovšetkým za marker porušenej funkcie pečene a narušenia sekrécie žľče, čo vedie k jeho prestupu do krvi a k ikteru [2]. Z posledných štúdií však vyplýva, že vykazuje antioxidantnú, antimutagénnu, antikomplementovú aktivitu a je významným endogénnym protektívnym faktorom pre tkanivá [6]. V súčasnosti sa považuje za jeden z najvýznamnejších antioxidantov in vitro aj in vivo [7]. Dokázalo sa, že zabraňuje oxidácii LDL a iných lipoproteínov, a preto pôsobí proti formácii aterómov a progresii aterosklerózy [8]. V mikromolárnych množstvách je schopný vychytávať voľné radikály efektívnejšie než α -tokoferol, ktorý bol donedávna považovaný za významný exogénny antioxidant [15]. Antiaterosklerotické vlastnosti bilirubínu boli potvrdené vo viacerých in vitro štúdiách, ako aj v experimentoch na zvieratách [9,10].

Napríklad indukcia a nadprodukcia hémoxigenázy, a tým aj bilirubínu v experimentoch na Watanabe dedične navodených, hyperlipidemických potkanoch znižovala aterosklerotickú progresiu [11]. Nepredpokladá sa, že bilirubín chráni pred tzv. primárnymi radikálmi, ako sú krátkodobé prítomné peroxynitridy, hydroxylové radikály apod. Panuje skôr domnienka, že bilirubín pôsobí na inom stupni. Fixuje primárnymi radikálmi poškodené proteíny, lipidy a DNA. Tieto poškodenia majú relatívne dlhší polčas a ich oprava si vyžaduje obyčajne dlhší čas. Bilirubín tu potom plní funkciu akéhosi fixátora skôr, než dôjde k ireverzibilnému poškodeniu [12]. Nové poznatky ohľadne hémoxigenázy a účinkov bilirubínu nás vedú k zrejmemu vysvetleniu ich antioxidantnej fyziologickej úlohy: oxidačný stres zvyšuje expresiu HO a následné zvýšenie produkcie bilirubínu špecificky inhibuje aktivitu membránovo viazanej NAD(P)H oxidázy, ktorá vytvára oxidanty vo fagocytoch a veľkej skupine nefagocytujúcich buniek.

Tento enzým má totiž dôležitú úlohu pri oxidačnom strese indukovanej endotelovej dysfunkcii, pri hypertenzii, hyperglykémii, syndróme inzulínovej rezistencie, hyperhomocysteinémii a fajčení. Takisto je významný pri ischemicko-reperfúznom poškodení, hypertrofii ľavej komory, glomeruloskleróze. Potenciuje trombogénu zvýšením syntézy tkanivového faktora a zvyšovaním agregability trombocytov. Oxidanty produkované týmto enzýmom majú kľúčovú úlohu aj pri bronchospazme a aktivácii mastocytov. Zvýšená aktivita NAD(P)H oxidázy je aj mediátorom zvýšenej mitogénnej aktivity a prežitia buniek vo viacerých typoch nádorov. Aktivácia NAD(P)H oxidázy má svoj význam aj pri angiogenéze, v mikroglia pri Alzheimerovej chorobe a neurodegeneratívnych chorobách [13].

Hyperbilirubinémia podľa posledných poznatkov pôsobí protektívne aj pri hepatobiliárných ochoreniach. Akumulácia žľčových kyselín pri cholestatických ochoreniach vedie k devastácii hepatocytov, ich nekróze a apoptóze.

Granato dokázal, že ako nekonjugovaný, tak konjugovaný bilirubín inhibovali apoptózu indikovanú žľčovými kyselinami a potlačili produkciu voľných radikálov [14].

Štúdie z počiatku 90. rokov poukázali na skutočnosť, že hémoxigenáza nemá úlohu len v metabolizme hému. Zvýšená produkcia hémoxigenázy, najmä jej induktívnej formy, sa dokázala v experimentálnych modeloch viacerých patologických procesov, medzi inými aterosklerózy. Zvýšená aktivita HO teda pôsobí protektívne. Môže tomu nasvedčovať aj fakt, že pri veľmi zriedkavom deficite HO dochádza k hyperlipoproteinémii a rýchlej tvorbe tukových prúžkov a fibróznych plátov v stenách artérií [16].

Oxid uhoľnatý

Zdá sa, že aj ďalšie produkty degradácie hému majú protektívne účinky. Ukazuje sa, že oxid uhoľnatý (CO) pôsobí v nanomolárnych koncentráciách ako vazodilatačne účinná látka. Podobne ako známy vazodilatátor oxid dusnatý pôsobí prostredníctvom produkcie cGMP. To vedie nielen k vazodilatácii, ale aj k ďalším účinkom, ako napríklad inhibícia agregácie trombocytov a proliferácie hladkých svalových buniek či k bronchodilatácii [17,18]. Vo viacerých experimentoch sa dokázalo, že CO má aj imunomodulačné účinky. Redukuje produkciu zápalových mediátorov (IL-1 β , IL-2, IL-6 a TNF- α) a zvyšuje produkciu protizápalových cytokínov (IL-10). Takisto potláča proliferáciu T-lymfocytov. Cytoprotektívnu úlohu CO v pľúcach potvrdil napríklad Song. Pri ortotopickej transplantácii pľúc u potkana, aplikácia 500 ppm CO viedla k signifikantnej redukcii následnej apoptózy a potlačeniu expresie prozápalových génov [19]. Zdá sa teda, že aj CO, ktorý je vo vysokých koncentráciách toxický, má v organizme významné miesto v ochrane buniek.

Biliverdín

Na rozdiel od bilirubínu, biliverdín je rozpustným a netoxickým produktom

degradácie hému, ktorý je však rýchlo konvertovaný na bilirubín. Viacerí autori potvrdili, že exogénna aplikácia biliverdínu vykazuje protektívne účinky. Yamashita zistil, že podanie biliverdínu pred transplantáciou srdca u zvierat viedlo k zvýšeniu prežívania transplantátov. Bolo to podmienené zníženou infiltráciou leukocytov a inhibíciou proliferácie T-lymfocytov [20]. Podobne aj Fondevila dokázal, že perfúzia transplantátu pečene biliverdínom viedla u zvierat k významnému zníženiu apoptózy, expresie NO syntázy, infiltrácie leukocytov a aktivácie prozápalových génov. Naopak, došlo k rýchlejšiemu nástupu funkcie transplantátu a aktivácii antiapoptotických génov a tým k zvýšeniu prežívania [21].

Indukcia hémoxygenázy, napríklad bunkovým stresom, vedie teda k tvorbe molekúl s významnými antioxidantnými, antiapoptotickými a imunomodulačnými účinkami. Ukazuje sa, že tieto produkty majú omnoho väčší potenciál, ak pôsobia v kooperácii.

AKO BY SA UVEDENÉ POZNATKY MOHLI UPLATNIŤ V KLINICKEJ PRAXI?

Jednou z možností je aplikácia látok, ktoré by zvyšovali aktivitu hémoxygenázy v tkanivách. Tento potenciál má relatívne veľká skupina látok. Napríklad kyselina acetylsalicylová a statíny, ktoré sú široko predpisované v prevencii kardiovaskulárnych ochorení, sú schopné indukovať HO [22]. Podobné účinky má probukol, rapamycín, etanol, NO, CO, dopamín, diklofenak, COX-2 inhibítory, PPAR- γ aktivátory a ďalšie.

Substancie, ktoré ovplyvňujú konjugáčny enzým bilirubínu (UDP-GT) a zabraňujú oxidácii bilirubínu, by mohli efektívne zvyšovať jeho koncentrácie. Inhibícia aktivity UDP-GT však musí byť pod prísnu kontrolou, nakoľko tento enzým sa zúčastňuje aj konjugáčnych reakcií s toxínmi a karcinogénmi. Zatiaľ výhodné vlastnosti vykazuje urikozurický liek probenecid. Tento inhibuje transport kyseliny UDP-glukurónovej z cytoplazmy, kde je syntetizovaná do endo-

plazmatického retikula, kde je lokalizovaný UDP-GT. Probenecid týmto mechanizmom napríklad predlžuje polčas acetaminofénu z 2,51 hodiny na 4,3 hodiny a lorazepam z 14,3 hodín na 33 hodín [23]. Konjugácia prostredníctvom sulfátu nie je narušená. Aj preto sa uvažovalo o podávaní probenecidu na predĺženie pôsobenia iných liekov. Vzhľadom na to, že je to veľmi dobre tolerovaný liek, vykazuje sľubný potenciál.

Iné lieky ovplyvňujú hyperbilirubinému inhibíciou transportéru, ktorý sa zúčastňuje pečenej vychytávania bilirubínu. Liečivá, ktoré sú chemicky hydrofóbne anióny môžu súťažiť s membránovým transportným proteínom pre bilirubín, napríklad antituberkulotikum rifampicín. Súčasná administrácia probenecidu a rifampicínu dokáže dosiahnuť hladiny bilirubínu približujúce sa pacientom s Gilbertovým syndrómom [24].

Konečne existujú liečivá, ktoré kompetitívne inhibujú väzbu bilirubínu na albumín. Príkladom je valproát, avšak vzhľadom na indikáciu tohto lieku a potenciálne vedľajšie účinky nepripadá jeho použitie zatiaľ do úvahy.

Ako bolo uvedené, bilirubín znižuje aktivitu NAD(P)H oxidázy v tkanivách. Preto ovplyvnenie tohto enzýmu predstavuje ďalšie terapeutické možnosti.

ZÁVER

Pohľad na bilirubín a ďalšie produkty metabolizmu hému sa za posledné dve desaťročia zásadne zmenil. Bilirubín bol dovtedy považovaný za toxický odpadový produkt, podobne ako aj CO. Až začiatkom deväťdesiatych rokov minulého storočia sa ukázalo, že tieto substancie majú svoju fyziologickú úlohu v organizme. Početné práce viacerých autorov dokázali protektívne vlastnosti bilirubínu i biliverdínu v ateroskleróze i onkogenéze a to najmä pri ich zvýšených hladinách. Mechanizmy, ktorými pôsobia protektívne pre tkanivá, však zatiaľ nie sú do detailov preskúmané. Výskumy sa však uberajú správnym smerom a v blízkej budúcnosti možno

očakávať výsledky, ktoré nielen prispedia k pochopeniu patogenézy viacerých chorôb, ale poskytnú nám aj ďalšie možnosti v rámci prevencie a možno i liečby.

Literatúra

- Tomaro ML, Battle AM. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(3): 216-220.
- Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004; 66(4): 773-779.
- Siow RCM, Hideyo S, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 1999; 41(2): 385-394.
- Tmorita T. Heme Oxygenase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(9): 1786-1795.
- Kuntz E, Kuntz HD. *Hepatology. Principles and practice*. 2. ed. Berlin: Springer 2006.
- Marilena G. New Physiological Importance of Two Classic Residual Products: Carbon Monoxide and Bilirubin. *Biochem Mol Med* 1997; 61(2): 136-142.
- Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC et al. Higher Serum Bilirubin Is Associated With Decreased Risk for Early Familial Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(2): 250-255.
- Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP et al. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006; 114(14): 1476-1481.
- Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994; 269(24): 16712-16719.
- Wu T-W, Fung KP, Wu J et al. Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(6): 859-862.
- Ishikawa K, Sugawara D, Goto J et al. Heme Oxygenase-1 Inhibits Atherogenesis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Circulation* 2001; 104(15): 1831-1836.
- Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM et al. Bilirubin Is an Effective Antioxidant of Peroxynitrite-Mediated Protein Oxidation in Human Blood Plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352(2): 165-174.
- McCarthy MF. „Iatrogenic Gilbert syndrome“ – A strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin. *Med Hypotheses* 2007; 69(5): 974-994.
- Granato A, Gores G, Vilei MT et al. Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes. *Gut* 2003; 52: 1774-1778.

15. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance. *Science* 1987; 235: 1043-1046.
16. Stocker R, Perella MA. Heme Oxygenase-1: A Novel Drug Target for Atherosclerotic Diseases? *Circulation* 2006; 114: 2178-2189.
17. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylat cyclase. *Mol Pharmacol* 1987; 32: 497-504.
18. Cardell LO, Ueki IF, Stjarne P et al. Bronchodilation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related Messenger. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 1065-1068.
19. Song R, Kubo M, Morse D et al. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol* 2003; 163(1): 231-242.
20. Yamashita K, McDaid J, Ollinger R et al. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J* 2004; 18(6): 765-767.
21. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004; 40(6): 1333-1341.
22. Lee TS, Chang CC, Zhu Y et al. Simvastatin Induces Heme Oxygenase-1: A Novel Mechanism of Vessel Protection. *Circulation* 2004; 110: 1296-1302.
23. Abernethy DR, Greenblatt DJ, Ameer B et al. Probenecid impairment of acetaminophen and lorazepam clearance: direct inhibition of ether glucuronide formation. *J. Pharmacol Exp Ther* 1985; 234(2): 345-349.
24. Campbell SD, De Morais SM, Xu JJ. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chemico-Biological Interactions* 2004; 150(2): 179-187.

MUDr. Ivan Očadlík,
doc. MUDr. Stanislav Oravec, CSc.

II. interná klinika LF UK,
FNŠP v Bratislave