

PREGLEDNIČLANCI

INDIREKTNAHIPERBILIRUBINEMIJA DEČJE UZRASTA
KAO POSLEDICA SFEROCITOZE

Gordana BJELAKOVIĆ, Dudica MILENOVIĆ, Saša ŽIVIC,
Gordana KOSTIĆ i Bojko B. BJELAKOVIĆ

*Biohemijski institut Medicinskog fakulteta i Dečja interna klinika
Kliničkog centra u Nišu*

Hereditarna sferocitoza je nasledna hemolitička anemija i može da bude razlog hemolitičke bolesti novorođenčadi, odojčadi i male dece. Sferocitoza se javlja zbog defekta u strukturi specifičnih proteina plazma membrane eritrocita, spektrina, a moguće i ankirina. Kao posledica intrinsic ("intrakorpuskularnog") defekta u membrani, eritrociti kod hereditarne sferocitoze akumuliraju jone i vodu, i postaju sferični dva do tri pitta više od normalnih eritrocita. Zbog toga pokazuju povećanu osmotsku fragilnost i ubranu autohemolizu. Sferocitoza se najčešće otkriva ispoljavanjem simptoma hemolitične anemije: prisustvom anemije, indirektnom hiperbilirubinijom, većim prisustvom natrijuma u eritrocitima, uz istovremeno smanjenje količine kalijuma, smanjenom osmotskom rezistencijom eritrocita, blagom hipersideremijom, retikulocitozom uz pojavu sferocita i splenomegalijom. Dokazana su tri bolesnika sa sferocitozom kod kojih je posle izvršene splenektomije došlo do poboljšanja opšteg stanja i ublažavanja simptoma hemolitičke anemije.

Ključne reči: indirektna hiperbilirubinemija, sferocitoza, natrijum i kalijum

Stvaranje bilirubina

Bilirubin nastaje razgradnjom liema. Oko 90% bilirubina nastaje iz hema hemoglobina starih eritrocita, koji se razaraju unutar mononuklearnih fagocitnih ćelija slezine, jetre i koštane srži. Ostatak bilirubina nastaje iz hemo-hromoproteida, prvenstveno razgradnjom hema citohromima P450, katalize, peroksidaze, citohrom oksidaze, azot oksidaze. Manja frakcija bilirubina nastaje iz neefektivne hematopoeze, zbog prevremene destrukcije novoformiranih eritrocita u koštanoj srži ili cirkulaciji. Životni vek zrelih eritrocita, koji se nalaze u cirkulaciji, iznosi 110-120 dana. Posle tog vremenskog perioda ostareli eritrociti bivaju fagocitovani od strane makrofaga,

uglavnom u slezini, jetri i koštanoj srži gde bivaju hemolizirani. Posle hemolize eritrocita otpočinje katabolizam hemoglobina i sinteza žučnih boja, biliverdina i bilirubina. Razgradnja hemoglobina otpočinje delovanjem mikrozomalne hem oksigenaze, hem raskidajućeg enzima, koji je najzastupljeniji u slezini, jetri, koštanom tkivu i predstavlja inducibilni enzim: indukuje se supstratom, hemom i hemoglobinom. U prisustvu molekulskog kiseonika i NADPH2 mikrozomalna hem oksigenaza raskida alfa metin most hema aktiviranjem ugljenika. Ova reakcija raskidanja odvija se kroz višestepeni mehanizam koji zavisi od redukujućih ekvivalenata koji se pribavljaju pomoću mikrozomalne NADPH-citohrom P450 reduktaze, koja sadrži FAD i FMN kao prostetične grupe. Uz oslobađanje CO, Fe^{2+} i globina hem, ciklični tetrapirrol, se prevodi u linearni tetrapirrol koji ima zelenu boju te je nazvan biliverdin, prva žučna boja. Dejstvom biliverdin reduktaze, solubilnog citozolnog enzima, široko rasprostranjenog u ćelijama retikuloendotelijalnog sistema (ćelijama RES-a) biliverdin prelazi u crvenkasto obojeni linearni tetrapirrol, bilirubin (*Balisteri and Shaw, 1986; Koraćević, 1996; Devlin, 1997*).

Transport bilirubina iz ekstrahepatičnih tkiva dojetre

Stvoreni prehepatični, nekonjugovani bilirubin je potpuno nerastvorljiv u plazmi pri njenim fiziološkim pH vrednostima, jer su njegove COOH i NH grupe uključene u jake intramolekulske vodonikove veze i zato su nesposobne da reaguju sa vodom. Neconjugovani, relativno nepolarni bilirubin, poseduje sposobnost difundovanja kroz najveći broj bioloških membrana, kao što je krvno-moždana barijera, placenta, intestinalni epitel i epitel žučne kese. Stoga se rastvorljivost neconjugovanog bilirubina postiže njegovim spajanjem sa albuminima kada nastaje prehepatični, indirektni bilirubin. Vezivanje bilirubina za albumine obezbeđuje transport bilirubina iz ekstrahepatičnih tkiva do jetre, uz istovremeno sprečavanje eventualnih toksičnih efekata zbog njegove lipofilnosti. Pored reverzibilnog vezivanja za albumin jedan deo bilirubina se vezuje veoma čvrsto, kovalentno, za albumine. Ova pigmentisana frakcija ima poluživot u serumu oko 17 dana, kao i albumin. Razna jedinjenja, uključujući i sulfonamide, derivate penicilina, radioaktivna kontrastna sredstva, mogu da uklone bilirubin sa njegovih vezujućih mesta za albumin i da povećaju rizik od kern ikterusa kod novorođenčadi.

Putem sistemske cirkulacije bilirubin stiže do jetre. Metabolizam bilirubina u jetri može da se podeli u 3 stupnja: uzimanje, prihvatanje, bilirubina od strane hepatocita, konjugacija u glatkom endoplazmatskom retikulumu i sekrecija konjugovanog bilirubina u žuč.

Transport bilirubina iz sinusoidalne krvi u hepatocite zavisi od specifičnih transportnih proteina i pokazuje karakteristike "carrier" posredo-

vanog transporta, uključujući saturabilnost i kompeticiju. Preuzimanje bilirubina olakšava se putem široke fenestracije ćelija sinusoidalne obloge, što dozvoljava da proteini krvne plazme uđu u Diss-ov prostor i direktno kontaktiraju plazma membranu hepatocita. Pored transporta kroz citoplazmu hepatocita bilirubin može direktno da se transportuje sa plazma membrane na endoplazmatski retikulum (EPR) gde se vrši proces konjugacije (*Lehninger et al., 1993; Iyanagi et al., 1998*).

Glukuronidacija bilirubina

U procesu konjugacije karboksilne grupe jedne ili obe propionske kiseline, koje se nalaze bočno na bilirubinu, esterifikuju se obično sa glukuronskom kiselinom; konjugati sa drugim šećerima, glukozom ili ksilitom, stvaraju se u malim količinama. Reakciju konjugacije omogućava enzim bilirubin-UDP-glukuronil transferaza tipa 1; pri tome se gradi bilirubin-di-glukuronat uz nešto i bilirubin-monoglukuronata. UDP-glukuronil transferazu (UGTs, EC 2.4.1.17) čini familiju mikrozomalnih, membranski vezanih enzima koji katalizuju konjugaciju endogenih i egzogenih jedinjenja, pored bilirubina i steroida, žučnih kiselina i ksenobiotika, sa UDP-glukuronskom kiselinom. Na bazi sekvencijalne sličnosti UGTs, izoenzimi su podeljeni u dve familije nazvane UGT1 i UGT2. Familija UGT1 se sastoji od nekoliko izoenzima sa varijabilnim aminoterminalnim delom, a sa identičnim karboksi-terminalnim delom enzima, koji se proizvode pomoću UGT1 genom-pleksa. UGT1 izoenzimi katalizuju glukuronidaciju bilirubina i fenolu sličnih jedinjenja. UGT2 izoenzimi katalizuju glukuronidaciju steroida i kodovani su od strane posebnih drugih gena. U molekulu UGTs karboksi-terminalni region je visoko specifičan i odgovoran za vezivanje sa zajedničkim supstratom, UDP-glukuronskom kiselinom. S druge strane, varijabilni amino-terminalni deo enzimskog molekula odgovoran je za supstratnu specifičnost sa UDP-glukuronskom kiselinom (*Ikushiro et al., 1997, 1995; Novicki and Poley, 1998*). Hepatična konjugacija obezbeđuje rastvorljivost bilirubina u vodi i daje bilirubinu svojstva koja mu obezbeđuju eliminaciju iz tela čime se sprečava oštećenje CNS-a.

Ekskrecija bilirubina

Solubilni konjugati prelaze u žučne kanalice, a zatim u žuč. Mala količina konjugovanog bilirubina iz žučnih kanalića vraća se, regurgituje u krvnu plazmu, čineći frakciju direktnog, konjugovanog ili hepatičnog bilirubina. Transport konjugovanog bilirubina iz hepatocita u žuč, slično procesu preuzimanja (prihvatanja), pokazuje saturabilnost i kompeticiju zbog posredovanja specifičnog nosača. Putem žuči bilirubin stiže do intestinuma; u

terminalnom ileumu i kolonu bilirubin-konjugati se hidrolizuju pomoću bakterijskih enzima - -glukuronidaza. Kao rezultat delovanja intestinalne bakterijske flore oslobođeni bilirubin se prevodi redukcijom u bezbojan d-urobilinogen. Urobilinogen trpi dalje redukcije te nastaje sterkobilinogen, koji se izlučuje fecesom. Jedan deo urobilinogena iz intestinima se reapsorbuje u krv da bi se izvestan deo tog reapsorbovanog urobilinogena preneo putem krvi do bubrega i bivao izlučen urinom.

Hereditarne nekonjugovane hiperbilirubinemije

Postoji više razloga za nastanak (pojavu) ovih hiperbilirubinemija. One sejavljaju kao posledica hiperprodukcije bilirubina kojadirektno sledi proces ubrzane hemolize eritrocita, te se javljaju u sklopu hemolitičkih anemija.

Hemolitičke anemije mogu da budu posledica defekta u samim eritrocitima, kada se radi o intrinsic hemolitičkim anemijama: one su obično hereditarne i najčešće se grupišu kao membranski, metabolički i liemoglobinski defekti. U slučaju da su faktori koji izazivaju hemolizu izvan eritrocita i deluju preko njih radi se o extrinsic hemolitičnoj anemiji: ove bemolitičke anemije su najčešće stečene. Hereditarne hemolitičke anemije javljaju se kod sledećih bolesti:

- a) Kod poremećaja u funkciji membrane eritrocita (sferocitoza);
- b) Kod poremećaja u sintezi hemoglobina: kvalitativnih i kvantitativnih hemoglobinopatija, i porfirija;
- c) Enzimopatija vezanih za metabolizam glukoze u eritrocitima glikolizom, i kod glikogenoza, i kod enzimopatija vezanih za metabolizam glutathiona u eritrocitima, i metabolizam nukleotida u eritrocitima.

Sferocitoza

Sferocitoza je nasledna hemolitična anemija koja se javlja kod novorođenčadi, odojčadi i male dece i ispoljava indirektnom hiperbilirubinemijom takvog intenziteta da kod novorođenčeta zahteva eksangvinotransfuziju ili fototerapiju, a kod odojčadi i male dece jačina hiperbilirubnemije je varijabilna. Sferocitoza se javlja zbog defekta u strukturi specifičnih proteina plazma membrane eritrocita, spektrina, a moguće i ankirina. Kao posledica intrinsic ("intrakorpuskularnog") defekta u membrani, eritrociti kod hereditarne sferocitoze akumuliraju jone natrijuma i vodu, bubre i postaju sferični dva do tri puta više od normalnih eritrocita. Zbog toga pokazuju povećanu osmotsku fragilnost i ubranu autohemolizu. Stepem nedostatka spektrina blisko korelira sa stepenom sferocitoze i ispoljavanjem simptoma hemolitične anemije.

Sferocitoza se najčešće otkriva prisustvom anemije, žuticom, tj. indirektnom hiperbilirubinemijom, retikulocitozom i splenomegalijom, kako pokazuju i naša tri bolesnika.

Proteini plazma membrane eritrocita

Dužina života eritrocita u cirkulaciji zavisi od njihovog normalnog izgleda i funkcije u čemu struktura ćelijske membrane eritrocita igra najznačajniju ulogu. Spoljašna, plazma membrana eritrocita sastoji se od 60% proteina i 40% lipida; sagrađena je, analogno ostalim ćelijskim membranama, u vidu lipidnog dvosloja u koji su ugrađeni proteini (*Montgomery*, 1993).

Membrana eritrocita sadrži 10 do 15 glavnih, ključnih, proteina i bezbroj manjih proteina koji se javljaju bilo u vidu integralnih membranskih proteina ili u vidu perifernih membranskih proteina lociranih na spoljašnjoj ili unutrašnjoj strani plazma membrane eritrocita. Integralni membranski proteini prolaze kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane, interreaguju sa hidrofobnim ćelijskim jezgrom i čvrsto su vezani. Tu spadaju funkcionalno značajni transportni proteini, kao što su proteini za razmenu anjona Cl i HCO_3 , glikoforin, glikoproteinski površinski antigen i drugi. Pefirni membranski proteini, koji se nalaze na citoplazmatskoj površini ćelijske membrane, čine strukturni proteini kao što su spektrin, aktin, protein 4,1, ankirin i neki enzimi eritrocita (3-fosfoglicerin aldehid dehidrogenaza). Ovi proteini su vezani međusobno kao i za integralne proteine. Spektrin i ankirin su periferni membranski proteini i čine deo citoskeleta. Razlozi za nedostatak, deficit spektrina i ankirina se intenzivno ispituju. Sferični eritrociti brzo gube porciju lipidnog dvosloja iz plazma membrane eritrocita i progresivno postaju sferični dok stare u cirkulaciji (*Sesil*, 1994).

Molekularna osnova sferocitoze

Prilikom ispitivanja mehanizma destrukcije eritrocita kod hereditarne sferocitoze utvrđeno je da hereditarni sferociti imaju smanjeni životni vek kod samih bolesnika, kao i kada se ubrizgaju normalnim osobama sa prisustvom slezinom; njihov život se gotovo normalizuje kod bolesnika ili kod zdravih osoba posle splenektomije. Životni vek zdravih eritrocita je normalan kada se daju u vidu transfuzije bolesnika sa hereditarnom sferocitozom. Tako je defekt eritrocita intrakorpuskularni, ne prenosi se, i uzrokuje značajnu destrukciju ćelija samo u prisustvu slezine. Posle splenektomije i dalje perzistiraju sferociti ali se smanjuje njihova destrukcija, što govori da je slezina glavno mesto patološke, abnormalne, destrukcije eritrocita. Slezina bolesnika je karakteristično prepunjena krvlju i sadržaj bilirubina u spleničnoj veni značajno nadmašuje nivo bilirubina u perifernoj krvi. Hereditarni sfe-

rociti obeleženi sa ^{15}C i ponovo injicirani bolesnicima ili zdravim osobama se sekvstriraju samo u slezini i nigde više, a pre početka destrukcije njihovo vreme cirkulacije kroz slezinu je patološki (abnormalno) prolongirano.

Laboratorijska dijagnostika sferocitoze

Laboratorijski nalaz je isti kao kod svih hroničnih hemolitičkih procesa: anemija (mada ima bolesnika bez anemije), povećano prisustvo retikulocita, blago do umereno povećanje indirektno-reagujućeg (nekonjugovanog) bilirubina u serumu, povećana ekskrecija fekalnog sterkobilina. U plazmi nema ili ima vrlo malo, hemoglobina. Hemoglobin oslobođen iz hemoliziranih eritrocita kataboliše se u bilirubin na mestu destrukcije te se radi o "ekstra-vaskularnoj" hemolizi. Sferični eritrociti su dehidratirani te je MCHC (koncentracija hemoglobina u eritrocitima) povećana u 50% bolesnika. Težina manifestacije bolesti zavisi od ravnoteže između brzine destrukcije eritrocita i brzine kompenzatorne produkcije eritrocita. Eritropoetski odgovor na anemiju kod ove bolesti je obično brz, zbog čega anemija može da bude minimalna uprkos umereno ubrzanoj destrukciji eritrocita; kod približno 10-20% bolesnika, naročito mladića, nivo hemoglobina može da bude sasvim normalan. Za bolesnike sa ikterusom i retikulocitozom, a koji nemaju ili imaju slabu anemiju, kaže se da imaju "kompenzovanu formu" hemolitičke anemije.

Literatura

Balister, F. B. and Shaw, M. L. (1986). Liver function, in: Tietz. W.N.: Textbook of Clinical hemistry, 1373-1433.

Koraćević, D. (1996). Hemoglobin i metabolizam porfirina, u: Biohemija, Koraćević D., Bjelaković G., Dorđević V., Nikolić J., Pavlović D., Kocić G. Savremena administracija. Beograd, 526-579.

Devlin, M.T. (1997). Biochemistry with clinical correlation. Fourth edition. Wiley liss.

Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M. (1993). Principles of biochemistry. Second edition. Worth Publishers.

Iyanagi, T., Emi, Y. and Ikushiro, S. (1998). Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. Biochem. Biophys. Acta, 1407, 173-184.

Ikushiro, S., Emi, Y. and Iyanagi, T. (1997). Protein-protein interactions between UDP-Glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes. Biochemistry, 36, 7154-7161.

Ikushiro, S., Emi, Y. and Iyanagi, T. (1995). Identification and analysis of drug-responsive expression of UDP-Glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) isozyme in rat hepatic microsomes using anti-peptide antibodies. Archives of Biochemistry and Biophysics, 324, 267-272.

Nowicki, M. and Poley, R.J. (1998). The hereditary hyperbilirubinemias. Baill. Clin. Gastroenterol., 12, 355-366.

Jandl. J. and Cooper, R. (1978). Hereditary spherocytosis, in: The methabolic basis of inherited disease. Stanbury J., Wyngaarden J., Fredrickson D. McGraw-Hill Book company, 1396-1409.

Lux, E. S. (1994). Hereditary defects in the membrane or metabolism of the red cell, in: Cecil textbook of medicine, Wyngaarden, Smith, Bennett, 19 edition, Saunders, 857-860.

HYPERBILIRUBINEMIE DEL'AGE ENFANTIN COMME CONSEQUENCE DE LA SPHEROCYTOSE

Gordana BJELAKOVIĆ, Dudica MILENOVIĆ, Saša ŽIVIĆ,
Gordana KOSTIĆ et Bojko B. BJELAKOVIĆ

*Institut biochimique de la Faculte de la medecine et Clinique interne
des enfants du Centre clinique de Niš*

Spherocytose hereditaire est l'anemie hemolytique hereditaire est peut etre la raison de la maladie hemolytique des nouveau-nes, des nourrissons et de petits enfants. Spherocytose apparatt par default dans la structure des protides specifiques de la plasme de la membrane d'erythrocyte, ou ankyrin. Comme consequence de l'intrinseque (intracorpulaire) default dans la membrane, les erythrocytes chez la spherocytose hereditaire accumulent les ions du natrium et l'eau, ils gouflent et deviennent spheriques deux or trois fois plus que les erythrocytes normaux. La spherocytose est le plus souvent decouverte par la manifestation des symptomes de l'anemie hemolytique: par la presence de l'anemie, par l'hyperbilirubinemie indirecte, par la plus grande presence du natrium, par la baisse simultanee de la quantite du potassium, par la reduction de la resistance osmotique des erythrocytes, par la douce hypersideremie, par la reticulocytose contre l'apparition des spherocytes et la spleno megalie. On a confirme chez trois patients avec la spherocytose chez qui, apres la splenectomie est arrive l'amelioration de l'etat general et l'attenuation des symptomes de l'anemie hemolytique.

Les mots cles: Hyperbilirubinemie indirecte, spherocytose, natrium et potassium des erythrocytes

INDIRECT HYPERBILIRUBINEMIA OF THE CHILD AGE AS A CONSEQUENCE OF SPHEROCYTOSIS

Gordana BJELAKOVIĆ, Dudica MTLENOVIĆ, Saša ŽIVIĆ,
Gordana KOSTIĆ and Bojko B. BJELAKOVIĆ

*Biochemistry Institute of the Faculty of Medicine and the Children Internal
Clinic of the Clinic Center, Niš*

The hereditary spherocytosis is an inherited hemolytic anemia; it can be the cause of the hemolytic disease of newborns, infants and small children. The spherocytosis appears due to a defect in the structure of the specific plasma proteins of the erythrocyte membrane, that is, of the spectrin, and, as sometimes possible, of the ankyrin as well. As a consequence of the intrinsic ("intracorpuseular") defect in the membrane, the erythrocytes at the hereditary spherocytosis, accumulate sodium ions and water; thus, they become swollen and spherical two to three times than the normal erythrocytes. That is why they exhibit increased osmotic fragility and quickened antihemolysis. The spherocytosis is most often revealed by perceiving the symptoms of the hemolytic anemia, that is, by the presence of anemia, indirect hyperbilirubinemia, a greater presence of sodium in the erythrocytes along with the simultaneous reduction of the amount of potassium, the reduced osmotic resistance of the erythrocytes, mild hypersideremia and reticulocytosis in addition to the appearance of spherocytes and splenomegaly. The paper presents the cases of three patients who, after being subjected to splenectomy, have shown the improvement of the general state as well as mitigation of the hemolytic anemia symptoms.

Key words: Indirect hyperbilirubinemia, spherocytosis, sodium and potassium of erythrocytes

Autor: Prof. dr sci Gordana Bjelaković, specijalista iz biohemije, Biohemijski institut Medicinskog fakulteta u Nišu; kućna adresa: Niš, Nikole Kopernika 47/8.

(Rad je uredništvo primilo 15. maja 2000. godine)