

# **Krevní barviva – porfyriny, hemoglobin, bilirubin**



# Porfyriny:

Poruchy metabolismu porfyrinů:

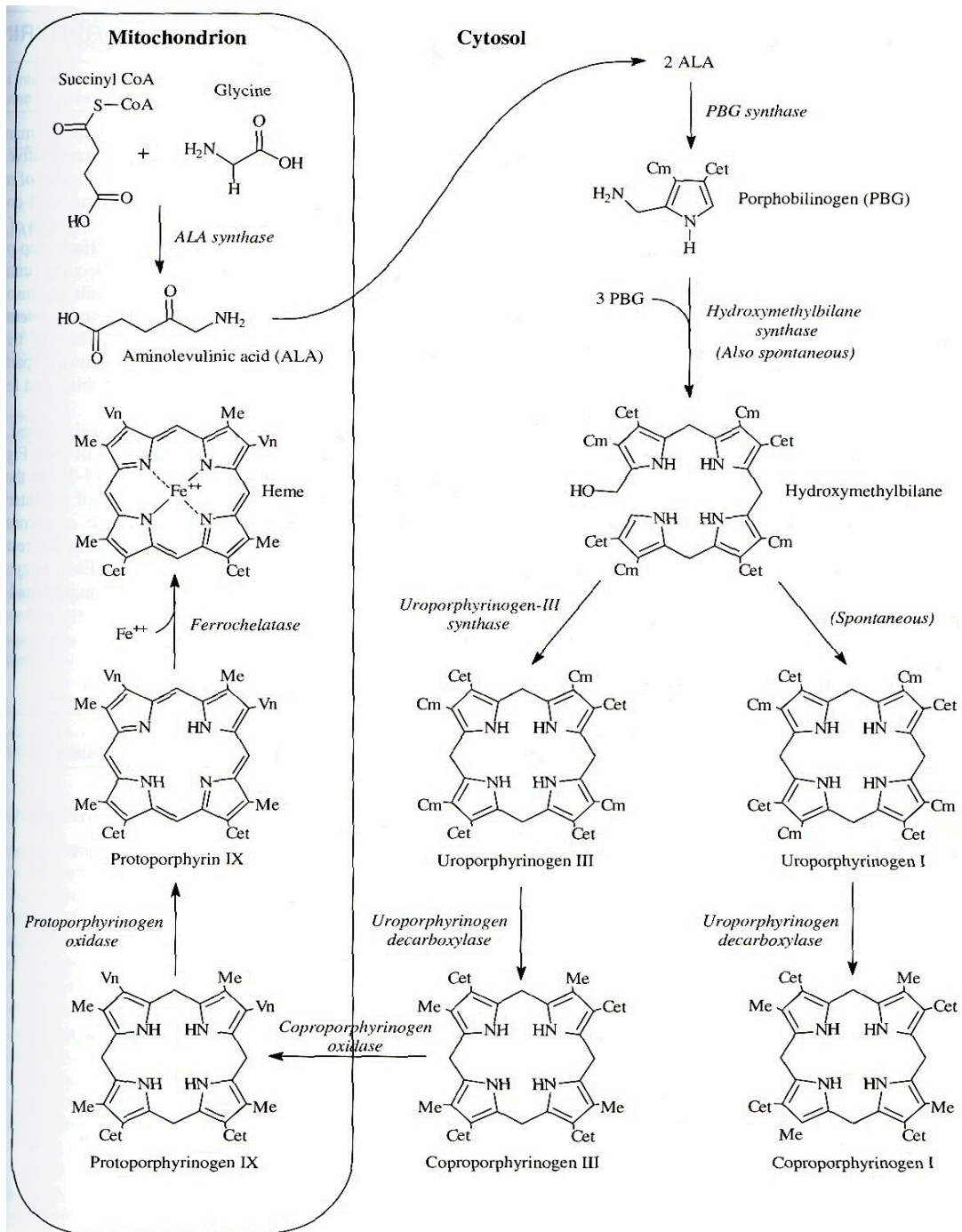
- Získané (např. při otravě olovem)
- S dědičným podkladem – **porfyrie**

Porfyriny - tetrapyroly, prekurzory hemu

- Vznikají řadou na sebe navazujících reakcí
- První je tvorba kyseliny 5 - aminolevulové (ALA) z glycinu a sukcinátu katalyzovaná syntázou kyseliny 5 – aminolevulové - popsáno osm variat
- Druhým enzymem – porfobilinogensyntáza -vznik porfobilinogenu z 2 molekul ALA

Porfyrie - defekt tvorby kteréhokoliv enzymu syntézy porfyrinů za stupněm ALA

- vysoká koncentrace ALA typická



# Porfyrie:

- charakterizovány hromaděním porfyrinů nebo jejich prekurzorů v některých tkáních
- zvýšenou hladinou v plasmě či v erytrocytech
- zvýšeným vylučováním porfyrinů nebo jejich prekurzorů stolicí nebo močí

Klinické příznaky:

- Fotosenzitivita – absorpce světla v oblasti 400 nm, volné radikály poškodí kožní buňky
- Akutní bolest v břiše a neurologické příznaky

# Porfyrie - koncentrace porfyrinů zvýšena

- v erytrocytech
- v játrech

## Symptomatická jaterní porfyrie ( Porfyrria cutanea tarda)

- nejčastější, patří mezi jaterní porfyrie (poškození jater)
- při nedostatku uroporfirogen dekarboxylasy. Objevuje se v pozdějším věku.

Akutní intermitentní porfyrie – porucha přeměny porfobilinogenu a porucha metabolismu steroidů v játrech (hromadí se a indukují tvorbu syntázy ALA)

Celá řada dalších typů porfyrií

Rozlišení typů - analýza porfyrinů nejčastěji v moči

- zřídka v plasmě, erytrocytech a stolici

- analýza enzymů - výjimečně, v ČR se provádí ve VFN Praha (dehydratáza 5-aminolevulátu)

# Stanovení porfyrinů a jejich prekursorů

- screeningový test s Ehrlichovým činidlem na PBG a ALA

## Kvantitativní stanovení

### Stanovení porfobilinogenu (PBG) v moči:

- Reakce porfobilinogenu v kyselém prostředí s p-dimethylaminobenzaldehydem (Ehrlichovo činidlo)
- Vznik červeného kondenzačního produktu
- Reakce není specifická
- Rozlišovací test na odlišení PBG od urobilinogenu – extrakci do chloroformu v prostředí octanu sodného
- Červené zbarvení pouze ve vodné fázi PBG
- Referenční rozmezí: do 36  $\mu\text{mol/l}$

### Stanovení 5-aminolevulátu v moči:

- 5-aminolevulát se reakcí s acetylacetonem a formaldehydem převede na fluorescenční derivát
- Stanovení HPLC metodou s fluorescenčním detektorem
- Referenční rozmezí: do 20  $\mu\text{mol/l}$

## Stanovení celkových porfyrinů:

- V okyselené moči (kys. sírová)
- **Spektrofotometrická křivka** v oblasti 350-450 nm – max. 400 nm
- Při větším podílu uroporfyriu 405 nm
- Materiál nutno chránit před světlem
- Fyziologické rozmezí je do 144 ug/l

## Stanovení jednotlivých porfyrinů:

- V okyselené moči **metodou HPLC** na reverzní fázi s použitím fluorescenčního detektoru (fosf. pufr, metanol)
- Materiál – sbíraná moč za 24 hod konzervovaná  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
Nutno chránit před světlem

- **Referenční rozmezí**

**Uroporfyriu : do 0,050  $\mu\text{mol}$  / 24 hod**

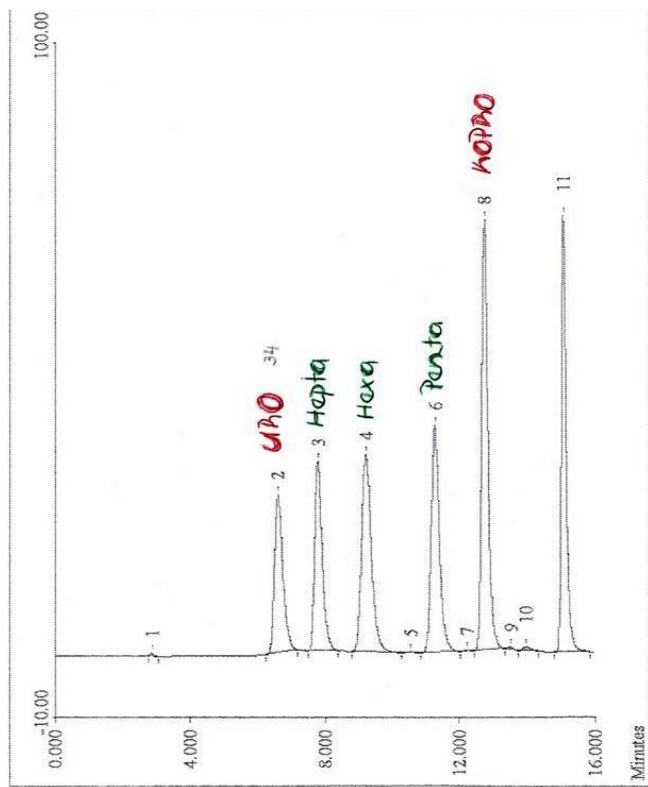
**Koproporfyriu : do 0,280  $\mu\text{mol}$  / 24 hod**

**Heptaporfyriu : do 0,014  $\mu\text{mol}$  / 24 hod**

**Hexaporfyriu : do 0,006  $\mu\text{mol}$  / 24 hod**

**Pentaporfyriu : do 0,005  $\mu\text{mol}$  / 24 hod**

## Obr.2: Chromatogram s píky jednotlivých porfyrinů





# Hemoglobin

- Červeně zbarvená bílkovina obsažená v erythrocytech
- Patří mezi konjugované bílkoviny - spojením bílkoviny s organickým komplexem obsahujícím kov
- Hemoglobin **tvořen z hemu** (protoporfyrin IX s navázaným  $\text{Fe}^{2+}$ ) a bílkoviny globin
- Globin je tvořen 2 polypeptidickými řetězci  $\alpha$  a dvěma řetězci  $\beta$
- Molekula ve tvaru čtyřstěnu
- Každý **globinový řetězec** je v jednom rohu, **porfyrinové řetězce** jsou umístěny v dutinách řetězců s **atomem Fe uprostřed**
- Molekula sestává ze čtyř hemů, obsahuje 4 atomy Fe
- U dospělých - hemoglobin tvořen z 96% HbA ( $\alpha 2 \beta 2$ )
- Z 2-3% HbA2 (obsahuje  $\delta$  řetězce a značí se  $\alpha 2 \delta 2$ )
- Fetální hemoglobin (HbF) dominuje ve fetálním životě
  - Během prvního roku života dítěte ubývá
  - U dospělých asi 1%.
  - Skládá se ze dvou  $\alpha$  a dvou  $\gamma$  řetězců

# Deriváty hemoglobinu:

V hemoglobinu železo ve formě  $\text{Fe}^{2+}$ , v oxidované i neoxidované formě oxygenovaný hemoglobin se nazývá oxyhemoglobin

- **Methemoglobin** – vzniká z hemoglobinu oxidací železa na  $\text{Fe}^{3+}$ 
  - Nemůže vázat kyslík
  - Běžně konc. pod 1,5%
  - Kongenitální methemoglobinémie - údržba  $\text{Fe}^{2+}$  narušena nedostatkem NADH methemoglobin reductázy
  - Metabolická acidóza nebo kóma - zvýšení konc. methemoglobinu
  - Hladiny nad 70% mohou být letální
- **Karboxyhemoglobin** – vzniká při otravách s oxidem uhelnatým
- **Sulphemoglobin** – degradační produkt hemoglobinu v silně kyselém prostředí
- **Karbaminohemoglobin** – fyziologický komplex s oxidem uhličitým

# Talasémie, Hemoglobinopatie

## Hemoglobinopatie:

- Strukturální abnormality jednoho či druhého globinového řetězce ( záměna aminokyseliny v řetězci).
- Více než 700 typů - většina se klinicky nemanifestuje
- Více než 100 druhů anemií má nestabilní  $\alpha$  či  $\beta$  globinové řetězce – nestabilní hemoglobinová hemolytická anémie
- Srpkovitá anémie - u homozygotů defekt tvaru erytrocytů, anémie, bolest kloubů, infarkt různých orgánů - S forma hemoglobinu ( záměna kys. glutamové za valin)

## Talasémie:

- Dědičné poruchy - změna poměru syntézy jednoho či druhého globinového řetězce
- $\alpha$  -talasémie (Afrika, jihovýchodní Asie) – redukce  $\alpha$  řetězců
- $\beta$  -talasémie (Středomoří, Indie, jižní Čína) – redukce  $\beta$  řetězců
- Množství variant, kombinace talasémií
- Někdy bez klinických příznaků, jindy s výraznou anémií

# Stanovení hemoglobinu

- Nejčastěji v plné krvi
- Stopy v séru, plasmě, moči a stolici - na základě pseudoperoxidázové aktivity - hem obsahující  $\text{Fe}^{2+}$  katalyzuje oxidaci některých barviv benzidinového typu peroxidem vodíku

**Stanovení Hb v plné krvi s hexakynoželezitanem (Drabkin) – referenční metoda** (dříve jako součást stanovení krevního obrazu, 1966 mezinárodní standard, pomalá a nesnadno se automatizuje, toxický odpad):

- Hb se lyzačním roztokem (hypotonický pufr) uvolní z erytrocytů
- $\text{Hb} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \rightarrow \text{MetHb} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$
- $\text{MetHb} + \text{CN}^- \rightarrow \text{MetHbCN}$
- Vznik kyanidového komplexu, měří se fotometricky při 540 nm

# Stanovení Hb v plné krvi

- **Součástí stanovení krevního obrazu** (na hematologických automatech ):
  - nejprve se **přídavkem speciálního roztoku zlyzují erytrocyty**
  - pak se přidá transformační roztok – vzniká **komplex lauryl sulfát sodný – Hb** (Sysmex) nebo **imidazol – Hb**.
  - vzniká opticky stálý komplex barevný komplex – stanoví se **fotometricky**
    - metoda rychlá, netoxická, snadno se automatizuje, přesně měří i vzorky s obsahem methemoglobinu a kontrolní krve
- **V biochemii jako součást ABR analyzátorů** - měření absorpce světla v plné krvi (využití rozptylu světla červenými krvinkami - světelným zdrojem je laser

## Referenční interval hemoglobinu v plné krvi

- M 130-175 g/l
- Ž 120-165 g/l

# Stanovení derivátů hemoglobinu

( v plné krvi)

- Provádí se na oximetrech -samostatné přístroje
  - oximetrický modul součást přístrojů na ABR
- Deriváty hemoglobinu - měří se **spektrofotometricky** na základě Lambert-Beerova zákona
- Stanovuje se celkový hemoglobin, oxyhemoglobin, karboxylhemoglobin, methemoglobin a sulfhemoglobin
- K methemoglobinu i sulfhemoglobinu jsou rovněž popsány fotometrické metody

# Stanovení hemoglobinu

## Stanovení glykovaného hemoglobinu:

- Stanovení frakce HBA 1c zvýšené u diabetiků
- Metodou HPLC na spec. přístrojích

## Stanovení hemoglobinu ve stolici:

- Screening na OK – viz. screeningová stanovení

## Stanovení hemoglobinu v moči:

- Součást chemické analýzy moče s diagnostickými proužky



# Stanovení volného hemoglobinu v plasmě nebo séru

- Metoda pro zjištění intravaskulární hemolýzy
- Hranice - nad 300 mg Hb/l patologická
- Šetrný odběr - nádobka s heparinátem litným, stáčet při 2000ot/min

Ruční metoda:

- Absorpční spektrum při 340 – 600 nm, derivuje se max. 403 – 405 nm

Metoda na automatickém analyzátoru:

- semikvantitativní stanovení
- využívá měření sérových indexů (hemoglobin, lipidy, bilirubin).
- proměřuje se absorbance při šesti vlnových délkách (480, 505, 570, 600, 660 a 700 nm)

# Identifikace hemoglobinových variant

- Dříve se používala elektroforéza
- Dnes dominují molekulární techniky, imunometody, HPLC, kapilární elektroforéza a MS

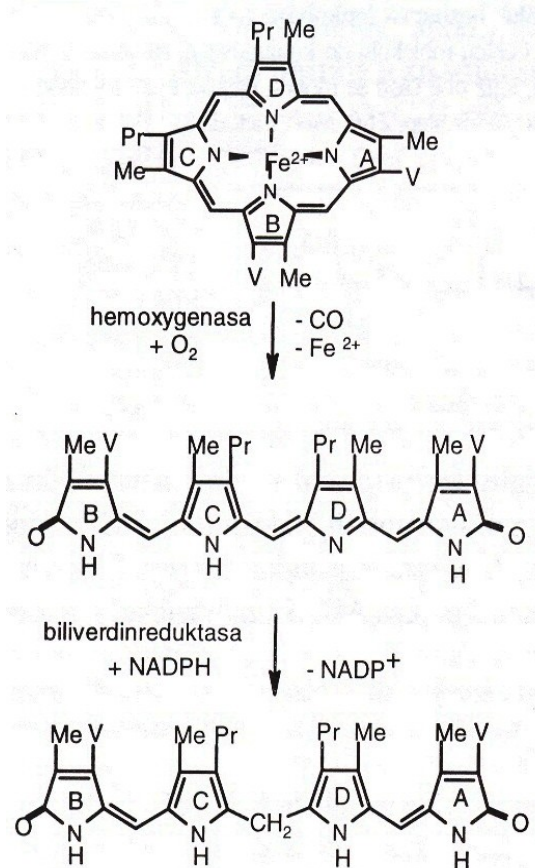
# Bilirubin

- Doporučená rutinní metoda: Jendrassik – Gróf, fotometrické metody s DCA a DPD
- Referenční metoda: Doumas – Perry

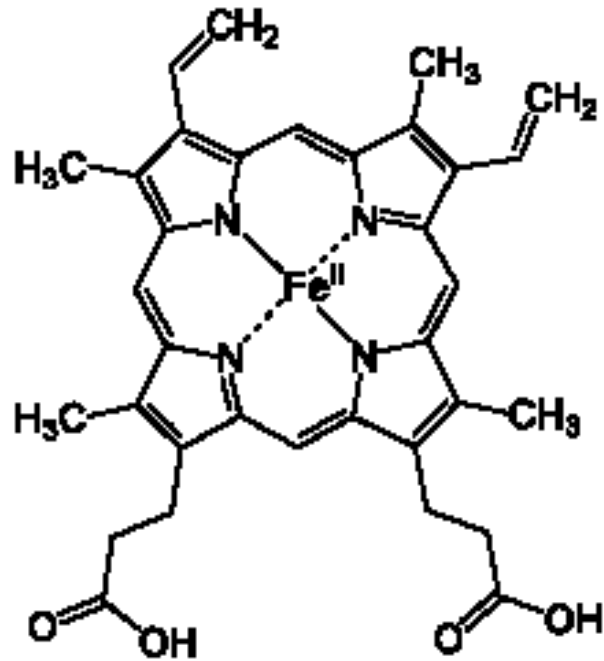
# Bilirubin

- Lineární tetrapyrolové barvivo
- Vzniká z uvolněného hemoglobinu při rozpadu erytrocytů
- Není jednotná látka - řada tetrapyrolů
- Erytrocyty zanikají a hemoglobin metabolizuje ve slezině
- Vznik biliverdinu, ten redukován na bilirubin
- Bilirubin vázaný na albumin transportován do jater
- V játrech extrahován hepatocyty a navázán na kyselinu glukuronovou – stává se ve vodě rozpustným
- Konjugovaný bilirubin vylučován žlučovými cestami do tenkého střeva.
- Tam redukce na další barevné produkty (urobilinogen, sterkobilinogen)
- Část vstřebána zpět do jater - část vylučována močí a stolicí

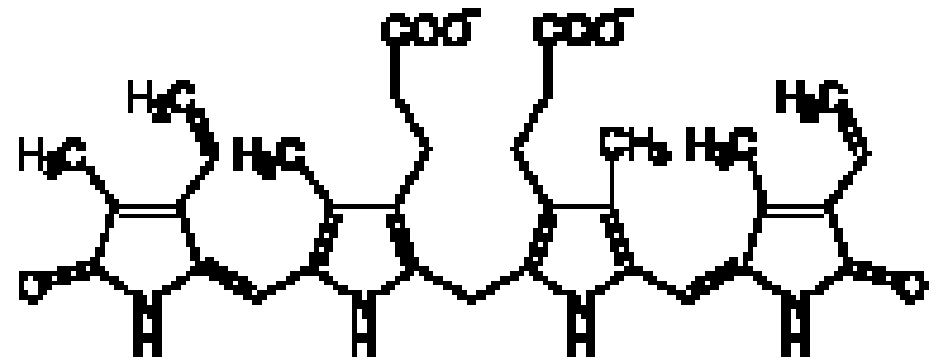
# Obr.3: Konverze hemu na biliverdin a redukce biliverdinu na bilirubin



# Hemová skupina, bilirubin



hem



bilirubin

## Bilirubin- přímý a nepřímý

- Přímý - dává po přidání směsi diazočinidel k séru přímo zbarvení
- Přímý odpovídá bilirubinu konjugovanému - podíl, který již prošel játry, kde byl konjugován
- Bilirubin nepřímý – nerozpustný ve vodě, vázaný na albumin, dosud játry neprošel
- Nekonjugovaný je třeba uvolnit z vazby na albumin (kofeinu, benzoátu sodného)
- Sérum nutno chránit před přímým světlem – pokles

# Referenční hodnoty

- Bilirubin celkový S/P:
    - dospělí do 20  $\mu\text{mol/l}$
    - novorozenci 1den do 100  $\mu\text{mol/l}$
    - novorozenci 2dny do 120  $\mu\text{mol/l}$
    - novorozenci 3dny do 205  $\mu\text{mol/l}$
  - Bilirubin přímý S/P:
    - dospělí do 5  $\mu\text{mol/l}$
- U 0 arb. jednotek



## Stanovení bilirubinu - historie:

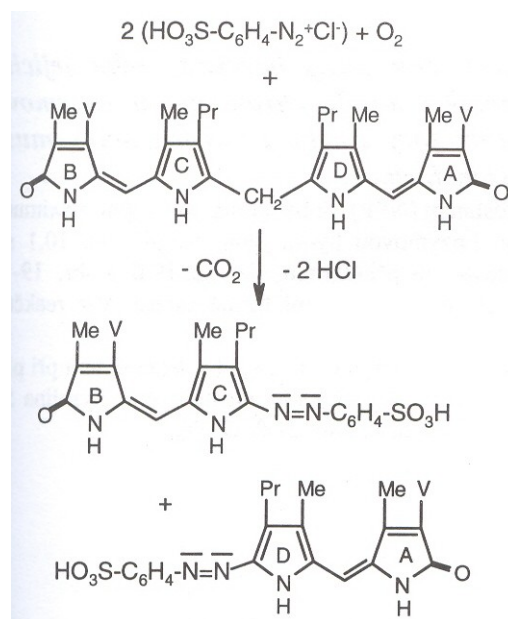
- a) bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou - Ehrlich v r. 1883 - současné metody z reakce vychází
- b) Tradiční metoda - papírová a tenkovrstvá chromatografie.  
Čtyři frakce – nekonjugovaný, mono a dikonjugovaný a vázaný na protein

# Stanovení bilirubinu celkového a přímého s diazotovanou kyselinou sulfanilovou

## Metoda Jendrassik – Gróf ( r. 1938):

- Celkový bilirubin - po přidavku akceleratoru - kofein + benzoát (Při stanovení bilirubinu konjugovaného se tento krok vynechá)
- Přidat diazotovanou kyselinu sulfanilovou (činidlo z dusitanu sodného a kyseliny sulfanilové)
- Vznik červeně zbarveného azobilirubinu s abs. max. 440 nm (interferuje hemolýza)
- Modrá forma azobilirubinu – po 10 minutách k reakci přidat NaOH a vínan sodno-draselný - 600 nm, hemolýza nevadí
- Při stanovení přímého bilirubinu reakci zastavit kyselinou askorbovou

## Obr. 4: Kopulace bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou - tvorba azobilirubinu



# Stanovení bilirubinu

## **Metoda Doumase - Perry (r. 1985):**

- Vychází z metody Jendrassik – Gróf, všechny kroky optimalizovány a specifikovány

## **Stanovení bilirubinu celkového s DPD:**

- Jako akcelerátor používá detergent (nedochází k precipitaci proteinů), silně kyselé prostředí
- Rychlá reakce dichlorofenyldiazonium tetrafluoroborátu (DPD) s bilirubinem - tvorba azobilirubinu
- Hemolýza interferuje u dospělých

# Stanovení bilirubinu

## Stanovení bilirubinu celkového s derivátem kyseliny sulfámové:

- Nový typ diazoniové soli
- Reagencie se používají přímo, v analyzátoru velmi stabilní
- Potlačena interference hemolýzy

## Enzymové stanovení bilirubinu přes biliverdin:

- Oxidace bilirubinu kyslíkem na zelený biliverdin – s bilirubinoxidasou
- Měří se pokles absorbance – 424 - 465 nm

## Stanovení bilirubinu přímou spektrofotometrií u novorozenců:

- Absorbance se měří při 454 nm
- Metoda nelze použít u starších dětí nebo dospělých - výsledky by mohla ovlivňovat přítomnost karotenu a jiných pigmentů