

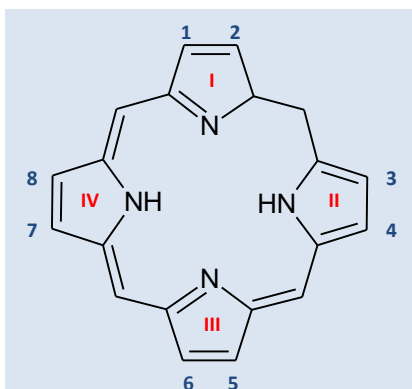
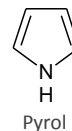
## Kapitola 9 Porfyriny, hemoglobin a bilirubin

### 9.1. Porfyriny

Porfyriny jsou organické, cyklické sloučeniny, odvozené od tetrapyrrolu *porfinu*, což je látka složená ze čtyř pyrrolových kruhů, spojených methinovými (-CH=) můstky.

Na bázi tetrapyrrolů existuje celá řada sloučenin s rozmanitými biologickými účinky, mezi něž patří např.:

- *zachycování světelné energie* (chlorofyl a další sloučeniny u sinic, řas a vyšších rostlin)
- *uvolnění energie a tvorba ATP v dýchacím řetězci* (cytochromy, cytochromoxidáza)
- *transport kyslíku* (hemoglobin, myoglobin, leghemoglobin – pigment u bobovitých rostlin)
- *antioxidační účinky* (hemoproteiny, peroxidáza, kataláza, ale také degradační produkty biliverdin a bilirubin !!)
- *buněčná signalizace* (působení hemoxygenázy a biliverdinreduktázy) aj.



#### Postranní řetězce:

Acetát	A = -CH <sub>2</sub> COOH
Propionát	P = -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Metyl	M = CH <sub>3</sub>
Vinyl	V = -CH=CH <sub>2</sub>

Vlevo je uveden vzorec **porfinu**, který je v **porfyrinech** substituován v polohách 1 – 8 různými postranními řetězci.

V **porfyrinech typu I** se pravidelně střídají dva postranní řetězce v uvedeném pořadí 1 – 8.

V **porfyrinech typu III** se pravidelně střídají dva postranní řetězce v polohách 1 – 6, v polohách 7 a 8 jsou v opačném pořadí (místo 7-8 je 8-7).

**Protoporfyrin III**, který je základem **hemu**, obsahuje M (metyl), V (vinyl) a P (propyl) v pořadí typickém pro *porfyrin III*: M, V, M, V, M, P, P, M.

Je to tedy porfyrin typu III, ale častěji se uvádí jako *protoporfyrin IX* (podle systematického řazení izomerů).

**Uroporfyriny**, byly poprvé zjištěny v moči, vyskytují se však nejen v moči, obsahují A a P.

*Uroporfyrin I* v pořadí: A, P, A, P, A, P, A, P

*Uroporfyrin III* v pořadí: A, P, A, P, A, P, P, A

**Koproporfyriny**, poprvé zjištěny ve stolici, lze je nalézt i v moči, obsahují M a P

*Koproporfyrin I* v pořadí: M, P, M, P, M, P, M, P

*Koproporfyrin III* v pořadí: M, P, M, P, M, P, P, M

#### 9.1.1. Klinické poznámky

##### 9.1.1.1. Porfyrie

Syntéza porfyrinů je poměrně složitá, což je zřejmé i ze zkráceného, stručného schématu syntézy hemu, uvedeného na stránce 9-3. Není proto divu, že na této složité metabolické cestě může dojít hned k několika závadám. Důsledkem poruchy ve vytváření hemu je *porfyrie*. Porfyrie je název pro *skupinu vrozených metabolických poruch* způsobených mutacemi genů, řídících syntézu enzymů působících při biosyntéze hemu.

#### **Bylo popsáno šest typů porfyrie,**

majících za následek *pokles aktivit enzymů* zúčastněných v syntéze hemu (důsledkem je hromadění některého z metabolitů, a to především v kůži, kostech a zubech a nález porfyrinů v moči).

Porfyrie se klasifikují

- podle nejvíce *postižených orgánů a buněk* (erytrocytické, hepatální, erytrohepatální)
- podle *projevů* (kožní a jaterní)
- podle *průběhu* (akutní a chronické).

### 9.1.1.1.1. Klasifikace porfyrií podle nejvíce postižených orgánů a buněk

#### Erytropoetické

Jsou spojené s ukládáním porfyrinů v erythrocytech; vzácné, nejvzácnější je *Günterova choroba*, dramatická, kongenitální erytropoetická porfyrie (CEP). Provázející známky jako hnědé zuby fluoreskující v UV světle, a silná fotosenzitivita způsobené ukládáním jednoho z porfyrinů, tmavě červená moč (uroporfyryn a koproporfyryn), mohou být pozorovány již od narození; později se přidává *hypertrichosis* (nadměrné ochlupení), obvykle se vyvine hemolytická anemie. Příčinou je deficit *uroporfyrynogen III kofaktor*.

**Léčba:** podávání beta-karotenu, transplantace kostní dřeně; dlouhodobější zkušenost prozatím chybí

#### Hepatální

Skupina chorob. Typická je akutní intermitentní porfyrie (AIP), vrozený (autozomálně dominantní) defekt *hydroxymethylbilan syntázy* (jiný název *uroporfyrynogen I syntáza*), vedoucí k hromadění prekurzorů hemu v játrech; abdominální bolest, zácpa, zvracení, hypertenze, hysterie, bolesti hlavy, parézy až plegie. V moči nálezy ALA, PBG, nízké hladiny sodíku a draslíku, abnormální nálezy v metabolismu cukrů a tuků.

(**intermitentní** = přerušovaný, střídavý, s přestávkami)

**Léčba:** zejména prevence - vyvarovat se látek, které vyvolávají ataky choroby (např. některá léčiva)

#### Erythrohepatální (smíšená porucha)

Protoporfyrie (EPP), dědičný defekt *ferochelatázy*, hromadí se protoporfyryn v játrech, kostní dřeni a kůži.

**Léčba:** podávání beta-karotenu, antihistaminik, fototerapie; ochranné oblečení, speciální krémy – zmírnění projevů, nikoliv léčba příčiny.

Porfyrie s postiženými enzymy, které jsou na *počátku* metabolické dráhy (viz schéma na str. 9-3), vedou k hromadění ALA a PBG. Jedna z těchto látek, možná obě, působí toxicky na abdominální (v oblasti břicha) nervy a CNS, což vede k abdominální bolesti a neuropsychickým symptomům. Tyto látky nejsou barevné, takže se nevyskytuje kožní citlivost na světlo (fotosenzitivita).

Enzymové bloky v *pozdějších* stupních metabolismu mají za následek akumulaci různých typů porfyrinogenů, jejichž oxidační deriváty způsobují *fotosenzitivitu*, tj. reakci na viditelné světlo v oblasti 400 nm, což má za následek kožní defekty.

**Porfyriny, které neobsahují kov**, mohou absorbovat světlo určitých vlnových délek a tím dochází k excitaci elektronů - energie pohlčeného světla přesune elektrony do vyšších energetických hladin. Tyto molekuly mohou svou energii později předat jiným molekulám, např. kyslíku, za vzniku reaktivních kyslíkových atomů (singletů) a dalších destruktivních molekul – *volných radikálů*. Ty pak působí toxicky na tkáň.

**Léčba:** Úprava diety (absence alkoholu, česneku, naopak příjem vitamínů..), minimalizace denního světla; aplikace krevních transfuzí (léčba projevů nemoci), odběry žilní krve („pouštění žilou“) pro snížení zásob železa, které může být vyvolávacím faktorem, pomalé vyplavování jaterních porfyrinů pomocí farmak (cholestyramin). Léčba porfyrií je nesnadná, vzhledem k různým projevům i různému rozsahu postižení. Někdy je třeba sáhnout i k transplantaci jater.

**Poznámka:** *Porfyrinogeny*, redukované formy porfyrinů, jsou bezbarvé, *porfyriny* jsou barevné (obsahují konjugované dvojně vazby) a červeně fluoreskují.

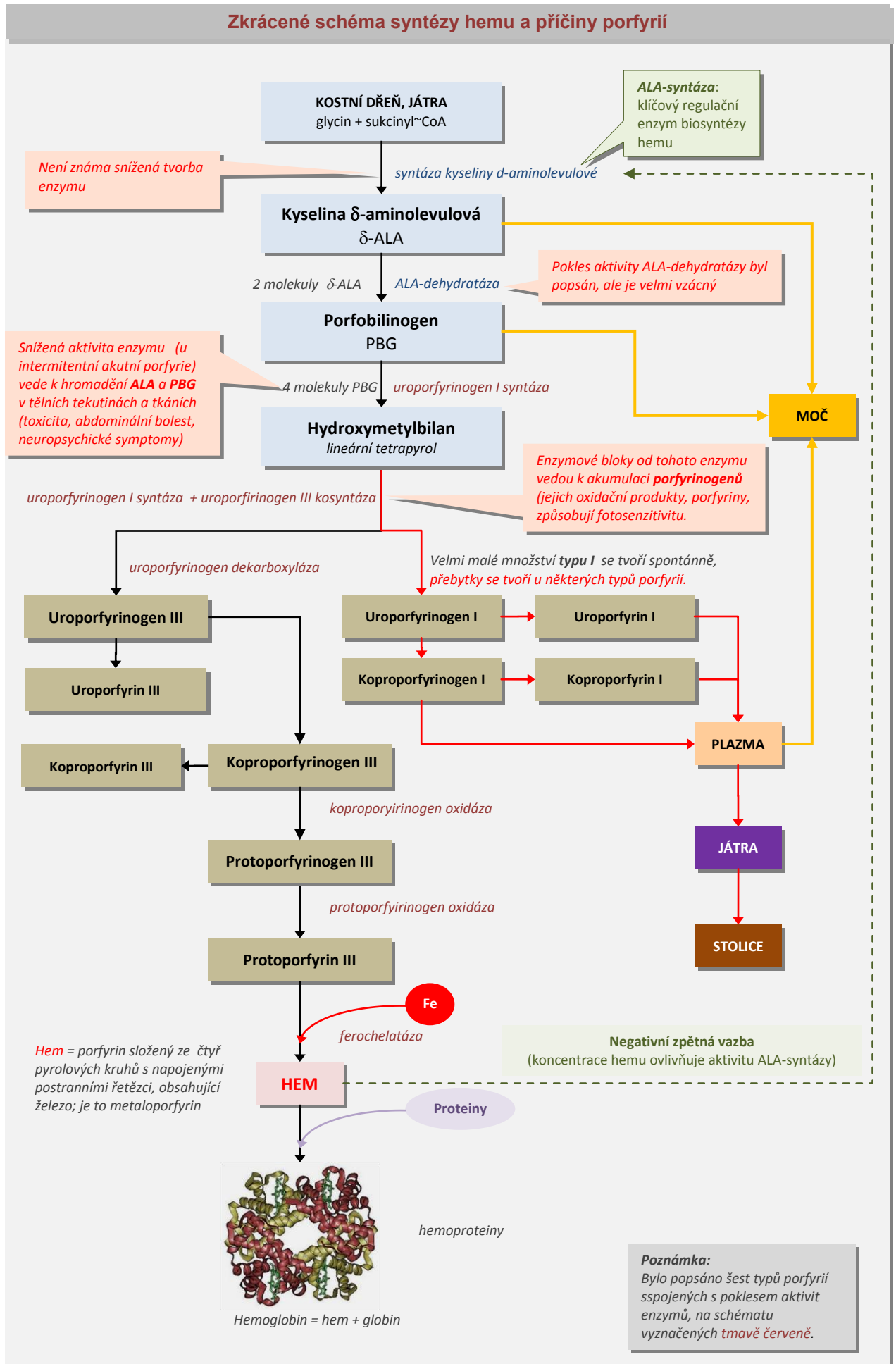
#### Hlavní nálezy u porfyrií

Moč	Stolice	Erythrocyty
PBG (+, -)	koproporfyryn (+)	protoporfyryn (+)
uroporfyryn (+)	protoporfyryn (+)	

U různých typů porfyrií se nacházejí tyto laboratorní nálezy v různých kombinacích, PBG je v některých kombinacích pozitivní, v jiných negativní

**Vrozená erythropoetická porfyrie** může vést k takovému znetvoření pacienta, že ten připomíná upíra a je možné, že tato světlem navozená toxicita může být *pramenem pověstí o upírech*: *Toxickým působením radikálů dochází ke zničení uší a nosu oběti, rty a dásně se rozkládají a odhalují červené zuby podobné tesákům. Kůže se pokrývá jizvami, hustá pigmentace a smrtelně bílá pleť ukazuje na anemii. Někteří historikové se domnívají, že v dávných dobách se postižení jedinci pokoušeli léčit tak, že pili krev (anemie se léčí krevními transfuzemi). Lidé s vrozenou erythropoetickou porfyrií se po zkušenostech se sluncem zcela jistě neodvažovali opouštět své příbytky za denního světla. Stejně tak si mohli ošklivit česnek, protože některé látky z česneku podle všeho zesilují symptomy porfyrie a z mírného záchvatu mohou učinit reakci vedoucí k agonii.*



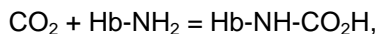


## 9.2. Hemoglobin

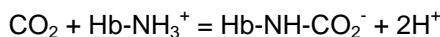
Hemoglobiny jsou porfyriny s obsahem železa vázané na protein globin. Jsou schopné vázat reverzibilně kyslík, slouží jako transportní systém kyslíku v krvi.

Hemoglobin v erythrocytech obratlovců plní dvě hlavní transportní funkce:

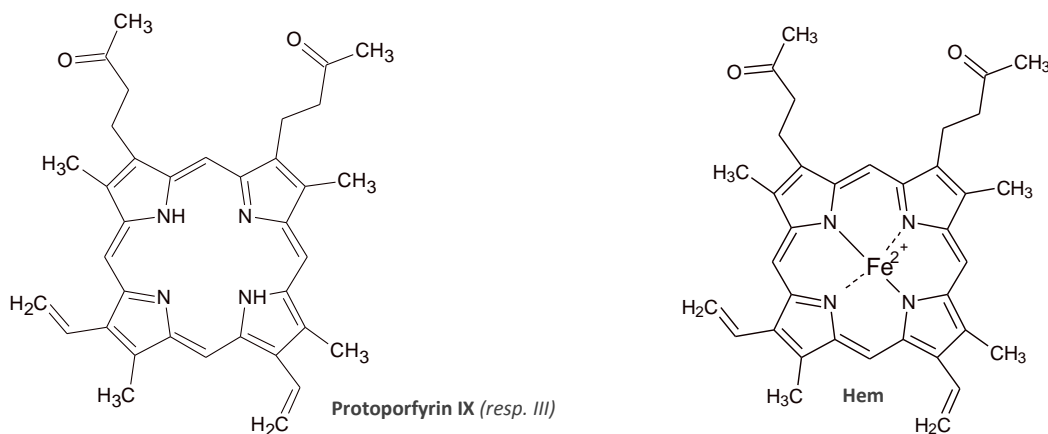
- *transport kyslíku* z dýchacího orgánu do periferních tkání
- *transport oxidu uhličitého a protonů* z periferních tkání do dýchacího orgánu, kde dojde k jejich vyloučení; oxid uhličitý se váže na aminoskupiny deoxygenovaného hemoglobinu a tvoří *karbaminohemoglobin* (obdobná reakce probíhá i s různými bílkovinami krevní plazmy za vzniku karbaminoproteinů):



nebo, přesněji, vzhledem k podmínkám v organismu



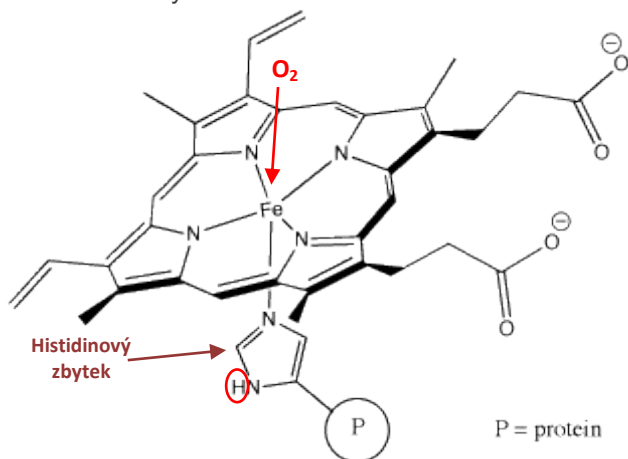
Takto, jako karbaminosloučeniny, se přepraví v artériích asi 5% celkového  $\text{CO}_2$  (ostatních 90% ve formě bikarbonátu a 5% jako fyzikálně rozpuštěný), ve vénách je to 30% (60% jako bikarbonát a 10% fyzikálně rozpuštěný; srovnej též kap.10, ABR). Deoxyhemoglobin je zásaditější povahy než oxyhemoglobin, tudíž lépe váže protony uvolněné ve tkáních, které ovšem zase uvolňuje v plicích po nasycení kyslíkem. Hemoglobin má tetramerní strukturu, skládá se vždy ze dvojic odlišných polypeptidů (monomerních jednotek), označovaných řeckými písmeny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), ale i latinkou (S). Každá podjednotka obsahuje hem.



Vzorec vlevo znázorňuje molekulu *protoporfyrinu IX*, základního porfyriu *hemu*, jehož vzorec je uveden vpravo (*protoporfyrin + Fe<sup>2+</sup>*)

Dvojmocné železo váže na svá volná koordinační místa jednak koncový histidin z  $\beta$ -globulinového řetězce, ale hlavně kyslík, aniž by přitom železo změnilo mocenství. Při navázání kyslíku se současně z histidinového zbytku uvolní protony a přispívají tak k tzv. *Bohrovu efektu* (což je *vliv oxidu uhličitého na uvolňování kyslíku z hemoglobinu*).

Kvartérní struktura je příčinou *sigmoidního tvaru saturační křivky* hemoglobinu kyslíkem. Při vysokém tlaku kyslíku (plicce) je hemoglobin prakticky zcela nasycen kyslíkem, naopak při nízkém parciálním tlaku kyslíku (tkáň), je nasycen pouze z 50%. Podrobnější informace v kapitole 10, *Vnitřní prostředí*, str. 10-35 a následující. Myoglobin, který se strukturně velmi podobná  $\beta$ -řetězci hemoglobinu (s hemem) takovýto tvar saturační křivky nemá.

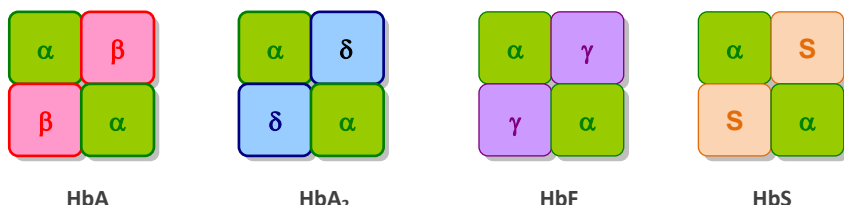


Prostorová představa umístění atomu železa v hemu a navazující zbytek histidinu (na koncové, 146. pozici v  $\beta$ -globulinovém řetězci, spodní část vzorce) a náznak vazby kyslíku (horní rovina nad vzorcem).

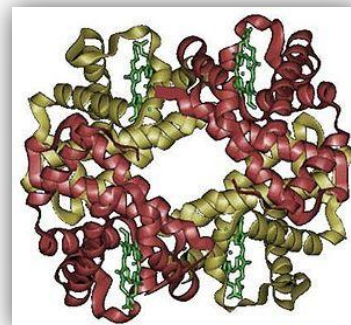
### 9.2.1. Některé hemoglobiny a jejich struktura

Hemoglobin	Popis	Složení	Novorozenci	Dospělí
HbA	Normální lidský hemoglobin	$\alpha_2\beta_2$	20 – 40%	95 – 98%
HbA <sub>2</sub>	Minoritní hemoglobin přítomný u dospělých lidí	$\alpha_2\delta_2$	0,5%	1,4 – 3,0%
HbF	Fetální hemoglobin	$\alpha_2\gamma_2$	60- 80%	0,3 – 1,0%
HbS	Hemoglobin srpkovité anémie	$\alpha_2S_2$	patologický hemoglobin	

Grafické znázornění běžných hemoglobinů



Mutace genů kódujících řetězce  $\alpha$  a  $\beta$  mohou ovlivňovat biologickou funkci hemoglobinu. Těchto mutací existuje několik stovek a pokud vedou ke změně biologické funkce hemoglobinu, hovoří se o *hemoglobinopatiích* (v tabulce výše je patologickým hemoglobin S). Typizace hemoglobinů se děje především *elektroforetickými metodami* (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, dvourozměrná elektroforéza, izoelektrická fokusace aj.).



Na obrázku je znázorněna molekula hemoglobinu, kde jsou vidět 4 globinové řetězce (2 + 2 stejné) a 4 pyrolové kruhy (hemy - zeleně).

**Methemoglobin (HbM)** má hemové železo v trojmocném stavu (oxidace  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ ), nemůže vázat kyslík a nepodílí se na jeho transportu. Na rozdíl od hemoglobinu má hnědou barvu.

**Za běžných podmínek jsou oxidována asi 3% obsahu hemoglobinu na methemoglobin.** *Methemoglobin reduktáza* udržuje hladiny methemoglobinu pod 0,1%. Chybí-li methemoglobin reduktáza, přetrvává 20 – 40% hemoglobinu v oxidovaném stavu (*methemoglobinemie*), což sice není fatální koncentrace, ale omezí dodávku kyslíku a výsledkem je přetrvávající cyanóza (modré zbarvení kůže). Snížená aktivita *methemoglobinreduktázy* z dědičných příčin je vzácná, původcem methemoglobinemie mohou být např. některá antibiotika, sulfonamidy, dusičnany (*dusičnanová methemoglobinémie kojence*) a jiná oxidační činidla. Důležitou roli v udržení redukováného stavu hemoglobinu hraje i glutation (kap. 8, str. 21, kap. 13, str. 40).

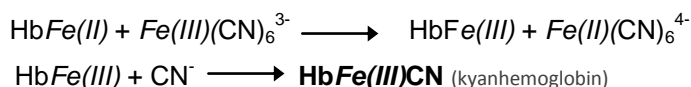
**Karboxylhemoglobin (karboxyhemoglobin)** vzniká vazbou CO na hemoglobin. Oxid uhelnatý se váže (reverzibilně) silněji než kyslík, následkem je zdušení organismu. Viz kapitola 16. *Toxikologie*

**Pro zvědavé studenty:** Otrava oxidem uhličitým ( $CO_2$ ) má jiný mechanismus – jedná se o zvýšení koncentrace  $CO_2$  v okolí postiženého, z plic se pak uvolňuje menší objem oxidu uhličitého pocházejícího z metabolismu a tím se zmenšuje prostor pro kyslík (kterého může být v okolním vzduchu dostatečné množství, ale nedokáže se uplatnit).

**Kyanhemoglobin** vzniká vazbou kyanidů na hem. V případě *cytochromoxidázy* je důsledkem bezprostřední smrt zdušením.

**Glykovaný hemoglobin** a jeho význam je podrobně rozebrán v kapitole 14. *Hormony*.

**Klasickou metodou stanovení hemoglobinu v plné krvi** je stanovení *Drabkinovým roztokem* a fotometrie kyanhemoglobinu při 340 nm. V následujících rovnicích jsou vynechány ionty, které se reakce nezúčastňují.:



Vysvětlivky:

$HbFe(II)$  = hemoglobin

$HbFe(III)$  = methemoglobin

$HbFe(III)CN$  = kyanhemoglobin

**Pro zvědavé studenty**

**Reagencie:** ferrikyanid draselný  $K_3Fe(CN)_6$ , kyanid draselný KCN a hydrogenuhličitán sodný  $NaHCO_3$ . Kalibruje se na kyanhemoglobinový kalibrátor.

**KCN je prudký jed**, ale koncentrace v roztoku je malá.

Někdy je důležité stanovit i *volný hemoglobin v plazmě*, který je indikátorem *akutní destrukce erytrocytů* (hemolýza) v cévním systému. U chronických hemolytických onemocnění nemá stanovení volného hemoglobinu v plazmě praktickou hodnotu, protože volný hemoglobin je rychle vyvázan haptoglobinem a odstraněn z krve a jakýkoliv volný nenavázaný hemoglobin je bezprostředně vyloučen ledvinami (molekulová hmotnost hemoglobinu je 64 456). Volný hemoglobin se stanovuje i v transfuzní službě při *kontrolě krevních konzerv*.

Vzhledem k nízkým koncentracím vyžaduje stanovení volného hemoglobinu citlivou metodu, dobře se osvědčuje *spektrofotometrie při třech vlnových délkách: 562, 578 a 598 nm*.

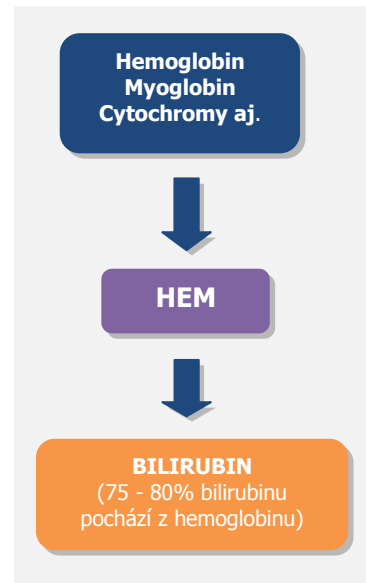
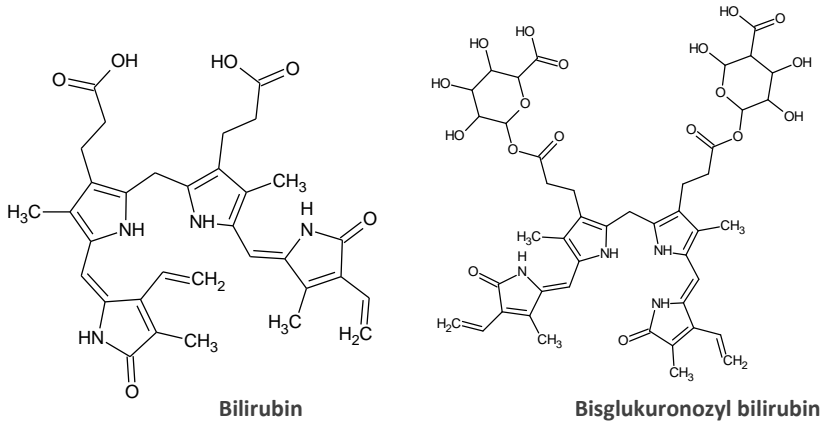


### 9.3. Bilirubin

Bilirubin vzniká ze sloučenin, které obsahují *hem*:

- z hemoglobinu,
- cytochromů,
- katalázy,
- myoglobinu aj.

Obsahují čtyři pyrolová jádra spojená můstky (metinové a methylenové). Hlavním metabolitem hemu je *bilirubin*, ze kterého dalšími přeměnami vznikají další látky (žlučová barviva, srovnej též Kapitola 5, *Analýza moči*).



#### 9.3.1. Metabolismus bilirubinu

Hlavním zdrojem bilirubinu je *hemoglobin*, který se uvolňuje ze zanikajících erytrocytů především ve slezině. Prvním produktem rozpadu hemoglobinu (iniciovaného mikrozomálním enzymem *hemoxigenázou*) je zelený *biliverdin*, který se ještě ve slezině redukuje (*biliverdinreduktázou*) na žlutooranžový *bilirubin*. Bilirubin je transportován portální krví do jater. Díky tvorbě vodíkových můstků uvnitř molekuly dochází k ukrytí hydrofilních skupin, takže je ve vodě nerozpustný a je přepravován hydrofilním nosičem, albuminem (90%), na který je vázán poměrně silnou vazbou, částečně (10%) i *apolipoproteinem D* v molekule HDL-lipoproteinu.

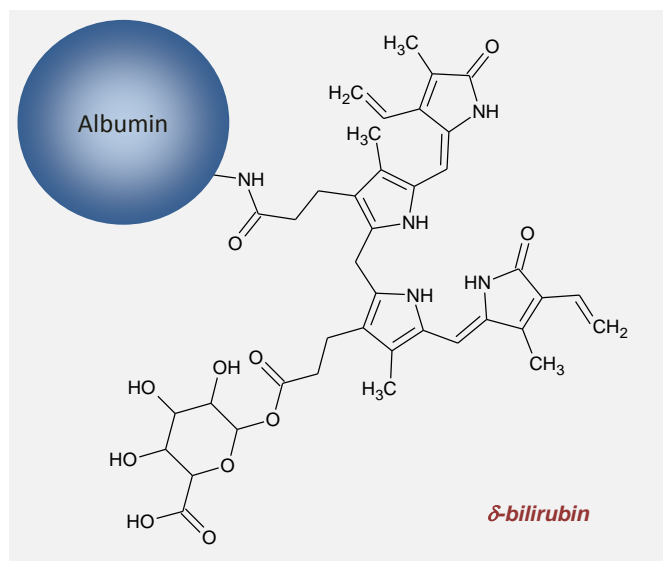
(U pacientů s portální hypertenzí obchází poměrně velké množství portální krve játra, což může u těchto pacientů vést ke zvýšené hladině bilirubinu v séru).

V jaterních buňkách se procesem zvaným *konjugace* tvoří estery bilirubinu, především s *kyselinou glukuronovou*.

Vzniká *mono-* a hlavně *diglukuronid bilirubinu* (správný název je *bisglukurozyl bilirubin*) čili *konjugovaný bilirubin* (konjugát s kyselinou glukuronovou). Enzym odpovědný za tvorbu konjugátů s kyselinou glukuronovou se jmenuje *UDP-glukuronozyltransferáza* (existuje jich více typů, pro bilirubin je to konkrétně *UGT1A1*). Touto úpravou (která je typická pro více látek, nejenom pro bilirubin) se stává bilirubin rozpustným ve vodě a může přecházet do žluči, případně může v této formě proniknout i do moči.

Konjugovaný bilirubin je na albumin vázán velmi slabě. Při déle trvající konjugované hyperbilirubinemii (viz dále) se tato slabá vazba přemění na vazbu kovalentní a vzniká tzv. *δ-bilirubin*, který přetrvává v krevním oběhu a nevylučuje se ani žlučí ani močí.

Konjugovaný bilirubin přechází z jater do žlučových cest a žlučí se dostává do tenkého střeva a odtud do tlustého střeva. Zde dochází k postupným redukcím bilirubinu na řadu látek, *žlučových barviv*. Důležitou roli v tomto procesu hrají střevní bakterie. Největší podíl tvoří *urobilinogen* a *sterkobilinogen*, které se oxidují na *urobilin* a *sterkobilin*. Tyto látky pak způsobují hnědé zabarvení stolice. Část barviv se dostává portálním oběhem do jater. Při poškození jaterních buněk prochází urobilinogen do oběhu a objevuje se v moči.



Stručné schéma metabolismu bilirubinu je uvedeno na str. 9-11.

**Nekonjugovaný bilirubin se vyskytuje v několika typech izomerů.**

Některé z nich nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky a jsou ve vodě rozpustné a pro vyloučení žlučí nevyžadují konjugaci. V dospělém organismu se vyskytují pouze ve stopových množstvích. U novorozenců je jeden z těchto izomerů zastoupen poměrně hodně, ale nezralými játry (omezená schopnost konjugace) se do žlučí, díky popsáním vlastnostem, vylučuje poměrně snadno.

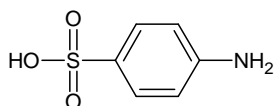
Přirozený (konfigurační) izomer *bilirubinu* ( $\alpha 1X, 4Z, 15Z$ ), převažující u savců, se snadno mění fotoexcitací na izomery, které přecházejí na stabilní a částečně polární deriváty označované názvy *lumirubin*, *cyklobilirubin* nebo *fotobilirubin II*. Tyto látky se vylučují játry, aniž by musely být konjugovány, což je principem jedné z cest, jak odstranit nadměrný bilirubin z krevního oběhu – fototerapie patologické žloutenky, nejčastěji novorozenecké.

**9.3.1.1. Metody stanovení bilirubinu**

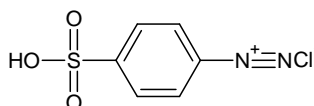
1. Metody na bázi azokopulace
  2. Metody na bázi oxidace bilirubinu na biliverdin
1. Azokopulační metody – princip: kopulace bilirubinu s diazočínidlem v kyselém prostředí na azobarvivo

**a. Jendrassik-Gróf**

Diazočínidlem je diazotovaná kyselina sulfanilová, která se získá reakcí kyseliny sulfanilové s dusitanem sodným v kyselině solné



Kyselina sulfanilová



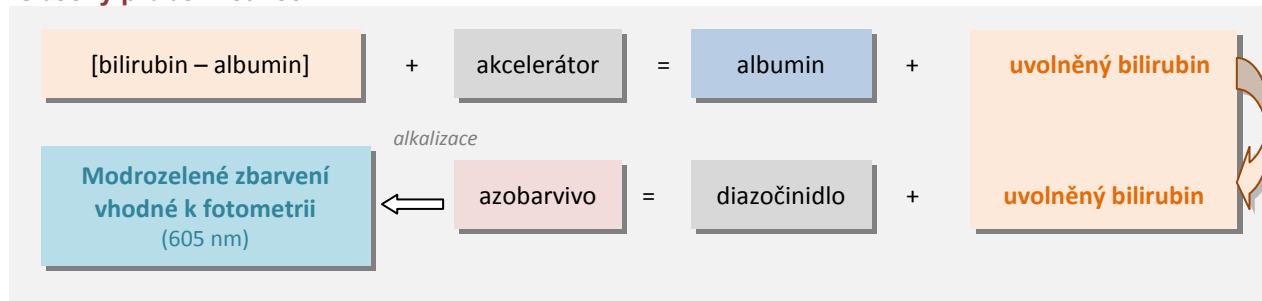
Diazotovaná kyselina sulfanilová

Konjugovaný bilirubin dává s diazočínidlem do 30 s červené zbarvení, čili reaguje přímo s čínidlem, odtud název *přímý bilirubin* (jak bylo zmíněno výš, přímo reagují s diazočínidlem i některé další formy bilirubinu, které se ovšem za normálních okolností vyskytují v zanedbatelném množství, takže nepřispívají významně k této reakci).

**Schéma reakce:**

*Mono- a diglukuronidbilirubinu + diazočínidlo = azobarvivo* (červené zbarvení; vhodné k fotometrii: 535 nm)  
 Nekonjugovaný bilirubin je nejprve nutno uvolnit z vazby na albumin pomocí *akcelerátoru*, kterým bývá např. *benzoan sodný s kofeinem*. Teprve potom je schopen reagovat s diazočínidlem za tvorby červeného zbarvení. Reaguje s čínidlem *nepřímě* (až po přidání akcelerátoru), odtud název *nepřímý bilirubin*. Pro zvýšení citlivosti reakce se směs alkalizuje (vínan sodnodraselný v NaOH) a zbarvení se změní na *modrozelené*.

Poznámka: NEPŘÍMÝ bilirubin = CELKOVÝ bilirubin minus PŘÍMÝ bilirubin

**Obecný průběh reakce:**

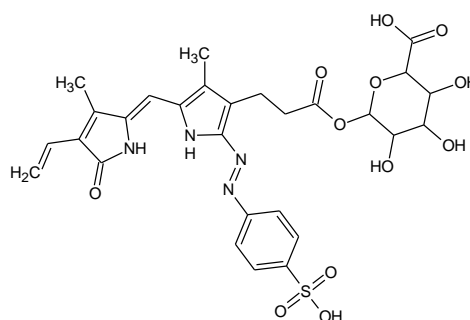
Poznámka: Je třeba si uvědomit, že touto metodou se stanovuje CELKOVÝ bilirubin!

Vzhledem k vlastnímu zbarvení séra je vhodné provádět vlastní slepý vzorek (porovnávací vzorek) a zbarvení séra od výsledné absorbance odečíst. **Hemolýza snižuje výtěžek reakce!**

**Poznámka:** Reakci popsali v roce 1938 dva pánové v práci *Jendrassik L, Gróf P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins*. *Biochem. Zeitschrift* 1938;297:82-9., od té doby prošla reakce četnými úpravami a modifikacemi.

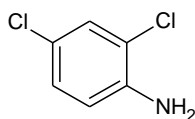
**Modifikací metody** podle Jendrassika-Grófa je úprava podle *Doumase*: Hlavní změnou je, že do reakční směsi se na závěr přidává tzv. *STOP-reagencie*, která působí destrukci nadbytečného diazotačního činidla a tím umožňuje stanovit přímý bilirubin v alkalické oblasti, kde je stanovení citlivější. V tomto provedení tedy pro obě formy bilirubinu (konjugovaný i nekonjugovaný) se používá jedna kalibrační křivka. Metoda je málo ovlivněna hemolýzou a je vhodná pro stanovení bilirubinu u novorozenců.

**Poznámka:** Někdy se bilirubin u novorozenců stanovuje tzv. přímou fotometrií naředěného séra ve vhodném médiu (např. ve fyziologickém roztoku) při dvou vlnových délkách. Tato metoda se v současnosti nedoporučuje, protože mnohá séra se při ředění zakalí a výsledky takto obdržené jsou nesprávné.

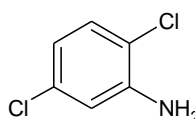


Produkt diazotační reakce – **azobilirubin**  
(jeden ze dvou izomerů)

### a. Stanovení pomocí dichloranilinu



2,4-dichloranilin



2,5-dichloranilin

V tomto uspořádání je diazotačním činidlem buď 2,4- nebo 2,5-dichloranilin, reakční směs navíc obsahuje detergent. Fotometrie při 540 – 560 nm.

Stanovení je ovlivněno vysokými koncentracemi močoviny a kreatininu, hemolýzou a chylozitou séra.

**Diagnostické sady Erba-Lachema s.r.o.:** Bilirubin celkový DCA Liquid 500 (Bil T DCA L 500), Bilirubin přímý DCA Liquid 500 (BIL D DCA L 500).

**Poznámka:** Diazoniová sůl dichloranilinu je dichlorfenyl-diazonium-... Moderním kapalným činidlem pro stanovení bilirubinu je stabilizovaná diazoniová sůl 3,5-dichlorofenyl-diazonium-tetrafluorborát (DPD), která jako US patent č. 5112769, byla navržena pro stanovení přímého bilirubinu. Používá se zejména v automatických analyzátoch, např. soupravy Beckman-Coulter OSR 6112 a OSR 6212 pro použití na analyzátoch řady Beckman-Coulter AU.

## 2. Oxidace bilirubinu na biliverdin

- a. Použitím *bilirubinoxidázy*, enzymu oxidujícího bilirubin na biliverdin, lze stanovit specificky bilirubin. Měří se pokles absorbance způsobený změnou barvy (ze **žlutooranžové** na zelenou). Metoda je vhodná i pro stanovení bilirubinu u novorozenců.

**Poznámka:** diagnostickou soupravu dodává např. francouzská firma CHEMELEX

- b. Místo bilirubinoxidázy se používá *vanadát* v prostředí detergentu. Stanovení není prakticky ovlivněno ani hemolýzou ani chylozitou séra.

**Poznámka:** diagnostickou soupravu vyrábí japonská firma WAKO, případně čínská firma Mindray; obdobnou metodu českého původu vyrábí a dodává firma SKALAB Svitavy; v původní variantě byla místo vanadu použita měď, v poslední verzi metody je použit ferrikyanid

### Referenční hodnoty:

*Celkový bilirubin* (T-Bil, t-Bil, total bilirubin): většina metod uvádí horní limit do 17,1  $\mu\text{mol/l}$

*Konjugovaný bilirubin* (D-Bil, d-Bil, direct bilirubin): přibližný horní limit je 5  $\mu\text{mol/l}$

## 9.3.2. Žloutenky a hyperbilirubinemie

Při hodnotách bilirubinémie *nad 35  $\mu\text{mol/l}$*  dochází ke žlutému zbarvení kůže a sliznic – vzniká *ikterus* neboli *žloutenka*.

Žloutenky vypadají různě, takže původní dělení bylo do tří základních typů. Rozeznával se ikterus:

- *flavinový* (jasně žlutý, nejčastěji doprovází hemolytické stavy, subjektivní stav nemocného bývá dobrý),
- *rubínový* (zbarvení dočervena, doprovází onemocnění jaterní tkáně) a
- *verdinový* (žlutozelený, doprovází cholestázu, bývá tmavá moč, což je způsobeno přítomností konjugovaného bilirubinu).

Toto dělení velmi dobře koresponduje s následujícím dělením podle *vztahu k játrům*.



**9.3.2.1. Dělení žloutenek podle vztahu k játrům:**

1. *Prehepatální* (hemolytická, předjaterní)
2. *Hepatální* (jaterní)
3. *Posthepatální* (obstrukční, z uzávěru žlučových cest)

**1. Hemolytická žloutenka (viz schéma)**

**Příčina:** jakýkoliv stav, který zvyšuje destrukci erytrocytů (zvýšená tvorba a odbourání hemoglobinu).

**Biochemické nálezy:**

- krev – vyšší hodnota nekonjugovaného bilirubinu
- moč – pozitivní Ehrlichova reakce, zkouška na bilirubin negativní

**Hemolytické onemocnění novorozenců (HON):**

**Příčina:** neslučitelnost v ABO Rh systému. Za určitých okolností může (např. fetomaternální krvácení) dojít v případě inkompatibility v ABO Rh systému dítěte a matky k tvorbě protilátek v těle matky proti krvinkám plodu. Nejčastěji se tvoří protilátky proti antigenu D (Rh inkompatibilita). Dalšími příčinami HON mohou být protilátky proti anti-c, Kell (K a k), Duffy (Fya), Kidd (Jka a Jkb), MNS (M, N, S a s), anti-C a anti-E. Ke styku matčiny krve a krve plodu dochází při porodu (potratu, mimoděložním těhotenství, předčasném odlučování placenty, amniocentéze aj.). Vytvořené protilátky při dalším těhotenství pronikají přes placentu do oběhu plodu a způsobují hemolýzu, která vyústí v novorozeneckou žloutenku a dochází k ohrožení plodu. Neslučitelnost v Rh systému vyžaduje podání *Rh antiséra IgG anti-D* do 48 hodin po porodu, potratu a umělém přerušení Rh-negativním ženám, aby krvinky plodu D-pozitivní, které případně pronikly do matčina krevního oběhu, byly zničeny a nemohly vést k tvorbě protilátek.

**Biochemický nález:** bilirubin v pupečníkové krvi nad 70  $\mu\text{mol/l}$ , pokles hemoglobinu, důležitá je *dynamika* procesu. Stoupá-li nekonjugovaný bilirubin, může dojít až k přestupu do mozkové tkáně (bazální ganglia – jádrový ikterus) rezultující v trvalé poškození až smrt dítěte! Indikace k tzv. výměnné transfuzi.

**Bilirubinoidy v plodové vodě:** zbarvení plodové vody žlučovými barvivy (tzv. *bilirubinoidy*, bližší viz v kapitole 16, *Biomarkery*); stanovují se na základě analýzy absorpční křivky.

**2. Hepatální žloutenka (parenchymální – viz schéma)**

**Příčina:** poškození jaterních buněk (jaterního parenchymu)

**Příklad:** žloutenky po různých jaterních jedech (chloroform, fosfor, chlorid uhličitý), žloutenky způsobené toxiny, virem infekční hepatitidy, městnáním v jaterních cévách u srdečního selhání, žloutenky při cirhózách

**Biochemické nálezy:**

- krev – zvýšeny hodnoty konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu, zvýšena hodnota urobilinogenu
- moč – vzestup urobilinogenu, Ehrlichova reakce pozitivní, bilirubin pozitivní

**Poznámka:** je-li narušena schopnost jaterní buňky konjugovat bilirubin, nestoupá hladina konjugovaného bilirubinu ani v krvi ani v moči

**3. Obstrukční žloutenka (viz schéma)**

**Příčina:** ucpání jaterního nebo společného žlučvodu. Barvivo se resorbuje do jaterních žil a lymfatických cest.

**Biochemické nálezy:**

- krev – vzrůst konjugovaného bilirubinu, později i nekonjugovaného (příčinou je zpomalení konjugace vlivem městnání)
- moč – bilirubin pozitivní, urobilinogen negativní

**Poznámka:** v tomto případě je acholická stolice (tj. chybí zbarvení žlučovými barvivy)

**9.3.2.1.1. Klinické poznámky**

**Přehled laboratorních nálezů u jednotlivých typů žloutenek (dělení podle vztahu k játrům)**

Ikterus	S-bilirubin nekonjugovaný	S-bilirubin konjugovaný	U-bilirubin	U-urobilinogen
prehepatální	↑	-	-	+
hepatální	↑	+	+	+
posthepatální	N	+	+	-

Legenda k tabulce: ↑ = zvýšeno; N = normální/fyziologický; - = negativní; + = pozitivní  
(volně podle Racek a kolektiv: *Klinická biochemie, Galén, Praha 1999*)

### 9.3.2.2. Dělení žloutenek podle typu bilirubinu nacházejícího se v krvi

V tomto se spíše než o dělení žloutenek mluví o dělení **hyperbilirubinémii**, a to na nekonjugované, smíšené a konjugované.

#### 1. Hyperbilirubinémie nekonjugované - příčiny

- Nadměrný vznik bilirubinu** (všechny hemolytické anémie, vrozené i získané, včetně hemolytické nemoci novorozence; fyziologický ikterus novorozence); další příčinou je vznik bilirubinu přímo v kostní dřeni (defektní erythropoéza), extravaskulární hemolýza, nadprodukce bilirubinu z nehemoglobinových zdrojů
- Porucha vylučování bilirubinu a jeho konjugace** (nezralost transportních systémů - podíl na fyziologické žloutence novorozenců, získané či vrozené defekty transportu bilirubinu na sinusoidálním pólu hepatocytu, přechodné familiární hyperbilirubinémie, Gilbertův syndrom, nezralost konjugačního systému u novorozenců, vrozené či získané defekty konjugace bilirubinu)

**Poznámka pro zvědavé studenty:** Gilbertův syndrom je způsoben mutací genu pro UGT1A1 (viz [str.](#) 7-30), která vede ke snížení aktivity této transferázy, tudíž i ke snížení procesu konjugace (tj. glukuronozylace nekonjugovaného bilirubinu) a tak ke vzniku nekonjugované hyperbilirubinémie. Také se snižuje poměr bis- a monoglukuronozyl bilirubinu ve žluči, tzn. ve prospěch monoglukuronozyl bilirubinu, a protože monoglukuronozyl bilirubin se ve žluči snáze dekonjuguje, je snížení tohoto poměru příčinou vyššího výskytu žlučových kamenů z vypadávajícího nekonjugovaného bilirubinu (pigmentové cholelitiázy) u jedinců s Gilbertovým syndromem.

#### 2. Hyperbilirubinémie konjugované

**Příčina:** Porucha odtoku žluči - obstrukce žlučových cest; kámen zaklíněný v koncové části choledochu (žlučovodu), nádor žlučových cest nebo hlavy pankreatu, porucha střevního metabolismu aj.

**Poznámka:** Stejný laboratorní nález se nachází i u některých onemocnění, které nemají za příčinu obstrukci žlučových cest (např. dědičně způsobená porucha exkrece konjugovaného bilirubinu jaterní buňkou)

#### 3. Hyperbilirubinémie smíšené

**Příčina:** Poškození hepatocytů  $\Rightarrow$  porucha vylučování a konjugace (virová hepatitida, jiná virová či bakteriální onemocnění, toxická poškození jater – bakteriální toxiny při sepsi, chloroform, tetrachlórmetan, toxiny muchomůrky zelené)

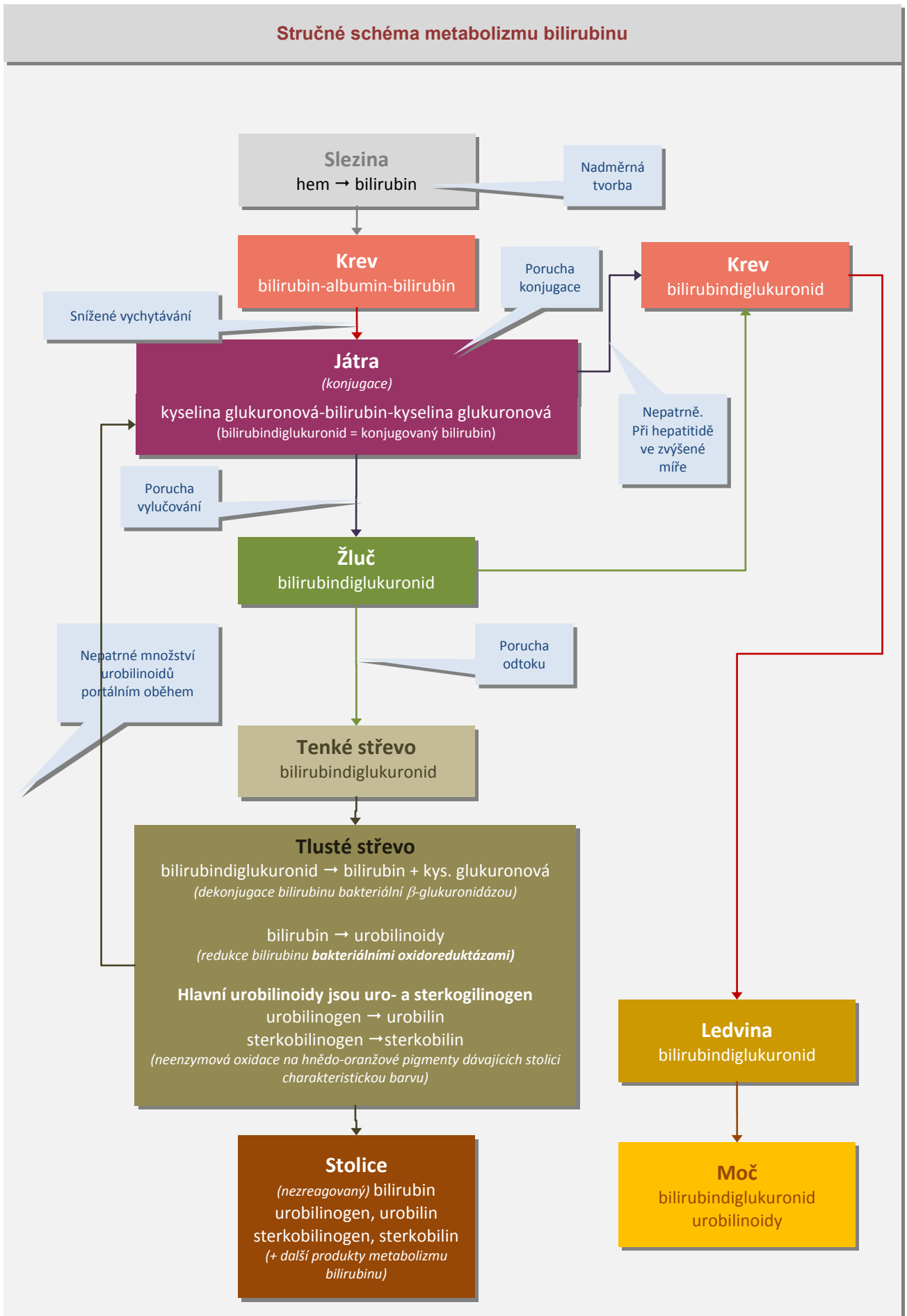
### 9.3.2.3. Dělení hyperbilirubinemií podle místa jejich vzniku

V literatuře lze nalézt i další dělení hyperbilirubinemií, např. podle místa vzniku hyperbilirubinemie na úrovni *buněčných organel*. Konjugace bilirubinu nastává na *jaterních mikrozomech*, pokud tedy dochází k poruše v metabolismu bilirubinu před jeho konjugací, dochází k typické nekonjugované hyperbilirubinemii (která ovšem může nastat i z jiných příčin, např. při snížení biotransformace bilirubinu střevní mikroflórou aj.). Pokud je porucha v metabolismu bilirubinu až za místem konjugace bilirubinu, za mikrozomy, dochází k hyperbilirubinemii konjugované. Kombinací obou typů vzniká smíšená hyperbilirubinemie. Jak vidno, je toto dělení prakticky totožné s předcházejícím typem dělení.

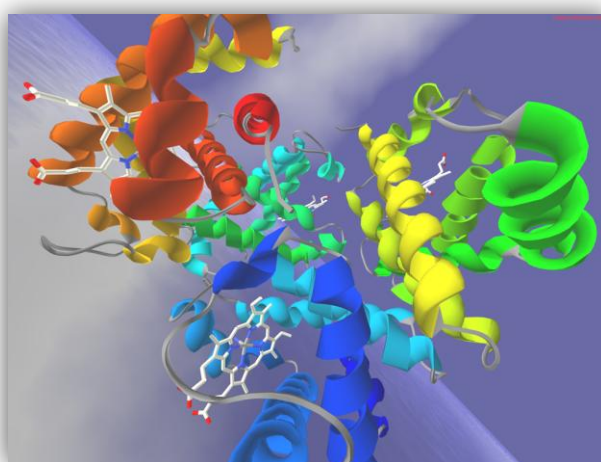
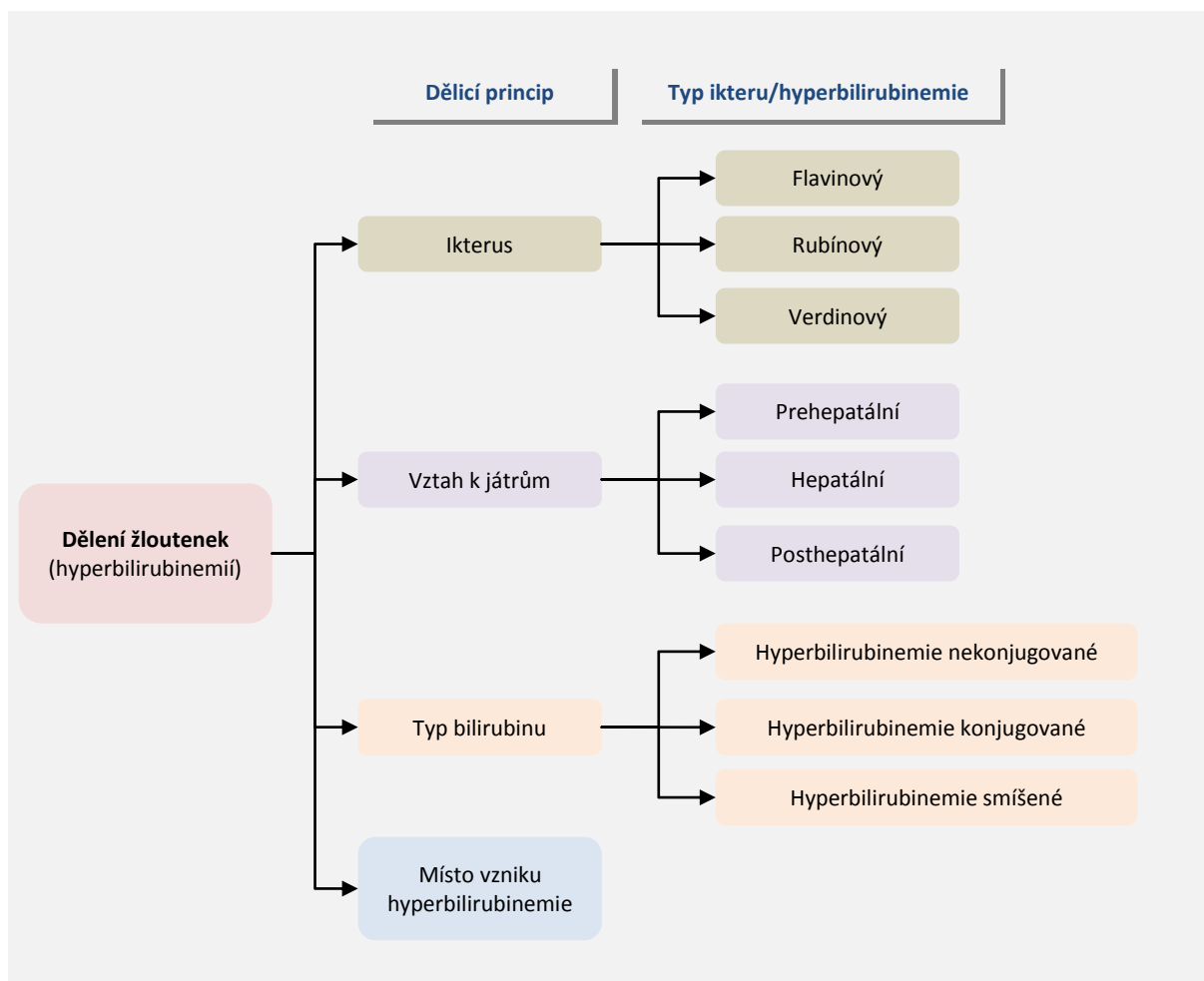
### Poruchy metabolismu bilirubinu a z toho vyplývající hyperbilirubinemie

nadprodukce bilirubinu	familiární konjugované hyperbilirubinemie	difuzní poškození jaterní tkáň
porucha vylučování bilirubinu játry	získané konjugované hyperbilirubinemie sdružené s intrahepatální cholestázou	kombinace příčin pre- a postmikrozomální hyperbilirubinemie
porucha konjugace bilirubinu	získané konjugované hyperbilirubinemie sdružené s extrahepatální cholestázou	
	porucha střevního metabolismu bilirubinu	

Vysoké koncentrace bilirubinu (hyperbilirubinemie) mohou být za určitých podmínek toxické, na druhou stranu se uvádí, že střední nekonjugovaná hyperbilirubinemie může chránit proti kardiovaskulárním chorobám a před nádorovým bujením, a to tím, že nekonjugovaný bilirubin může reagovat s volnými radikály a tak chránit organismus před jejich působením. Existují důkazy, že novorozenci s vyšší nekomplikovanou hyperbilirubinemií (<340 mmol/l) mají ve srovnání s novorozenci s nižší bilirubinemií snížený výskyt některých onemocnění a stavů komplikujících časné neonatální období. Většinou se jedná o patologické stavy sdružené s vysokým oxidačním stresem. Zdá se, že i odpadní látky z metabolismu, mohou být pro organismus užitečné.



### Přehled dělení hyperbilirubinemií (žloutenek) podle různých principů



Umělecké ztvárnění molekuly hemoglobinu, molekuly hemu jsou tentokrát vyvedeny bíle.  
<http://www.komsta.net/chemwalls/hemoglobin-1280.jpg>

## 9.4. Stručné shrnutí kapitoly

### 9.4.1. Porfyriny

- Porfyriny jsou organické, cyklické sloučeniny, odvozené od tetrapyrolu porfinu.
- Na bázi tetrapyrolů existuje celá řada sloučenin s rozmanitými biologickými účinky, mezi něž patří zachycování světelné energie, uvolnění energie a tvorba ATP, transport kyslíku, buněčná signalizace, antioxidační účinky.
- Protoporfyrin III je základem hemu, součástí hemoglobinu, krevního přenašeče kyslíku.
- Syntéza hemu je složitá, je zahájena syntézou glycinu a sukcylnylCoA na kyselinu  $\delta$ -aminolevulovou.
- Chyby v syntéze gemu dávají vznik porfyriím, což je název pro skupinu vrozených metabolických poruch. Bylo popsáno šest typů porfyrie, jež jsou klasifikovány podle
  - nejvíce postižených orgánů a buněk (erytropoetické, hepatální, erytrohepatální)
  - projevů (kožní a jaterní)
  - průběhu (akutní a chronické).
- Při porfyriích se obecně hromadí některý z metabolitů v různých orgánech a tkáních, zejména v kůži, kostech a zubech a způsobují různé zdravotní potíže, včetně fotosenzitivity. Průvodním jevem je porfyrinurie.
- Porfyrie s postiženými enzymy, které jsou na *počátku* metabolické vedou k hromadění ALA a PBG. Jedna z těchto látek, možná obě, působí toxicky na abdominální (v oblasti břicha) nervy a CNS, což vede k abdominální bolesti a neuropsychickým symptomům.  
Enzymové bloky v *pozdějších* stupních metabolismu mají za následek akumulaci různých typů porfyrinogenů, jejichž oxidační deriváty způsobují *fotosenzitivitu*, tj. reakci na viditelné světlo v oblasti 400 nm, což má za následek kožní defekty.
- Porfyriny se zjišťují, případně i stanovují v moči, stolici a v erythrocytech.

### 9.4.2. Hemoglobin

- Hemoglobin je porfyrin s obsahem železa vázaný na protein globin. Váže reverzibilně kyslík a slouží jako transportní systém kyslíku v krvi. Kromě kyslíku, který přenáší z plic do periferních tkání, přenáší i protony a oxid uhličitý (jako karbaminohemoglobin, asi 5% celkového  $\text{CO}_2$ ) z periferních tkání do plic.
- Normální lidský hemoglobin HbA sestává se čtyř globinových řetězců ( $\alpha_2\beta_2$ ) a čtyř hemů. V menším množství se u dospělých nacházejí také hemoglobiny HbF (fetální) a HbA<sub>2</sub> s řetězci  $\delta$  místo  $\beta$ .
- Existuje celá řada patologických hemoglobinů, ve kterých se liší zejména sekvence aminokyselin v jednotlivých proteinových řetězcích.
- Methemoglobin obsahuje trojmocné železo a nemůže přenášet kyslík. Příčinou může chybění či nedostatečná činnost enzymu hemoglobinreduktázy, což může být (vzácně) vrozené nebo způsobeno vnějšími vlivy, zejména některými léky a oxidačními činidly.
- Karbonylhemoglobin vzniká vazbou oxidu uhelnatého (nedokonalé spalování paliva) na hemoglobin. Oxid uhelnatý se váže sice reverzibilně, ale pevněji než kyslík, a může způsobit smrt jedince udušením.
- Kyanhemoglobin vzniká vazbou kyanidů na hem, důsledkem je bezprostřední smrt zadušením (vazba na cytochromoxidázu).



- Glykovaný hemoglobin vzniká vazbou glukózy na proteinovou část barviva. Je důležitým markerem stavu diabetu z dlouhodobého hlediska.
- V plné krvi se stanovuje hemoglobin fotometricky Drabkinovým roztokem.
- Volný hemoglobin v plazmě se stanovuje spektrofotometricky při třech vlnových délkách.

### 9.4.3. Bilirubin

- Bilirubin je odpadní látka vznikající rozpadem hemu. Tvoří se přes zelený biliverdin již ve slezině. Je nerozpustný ve vodě a je transportován portální krví ve vazbě na albumin do jater, kde je konjugován zejména s kyselinou glukuronovou, stává se rozpustným a přechází do žluči. Hlavním zdrojem bilirubinu je hemoglobin.
- Při nadbytku konjugovaného bilirubinu v krevním oběhu, dochází k jeho pevné vazbě na albumin za vzniku  $\delta$ -bilirubinu, který přetrvává v oběhu a jehož biologický poločas je asi 21 dní.
- Koncentrace bilirubin nad 35  $\mu\text{mol/l}$  způsobí zažloutnutí skler, později i kůže a sliznic, žloutenku (ikterus).
- Původní dělení žloutenek bylo podle zbarvení kůže a sliznic na flavinový, rubínový a verdinový.
- Správnější je mluvit o hyperbilirubinemiích, ne každá hyperbilirubinemie vyvolá ikterus.
- Hyperbilirubinemie se dělí podle
  - vztahu k játrům na prehepatální, hepatální a posthepatální
  - typu bilirubinu nacházejícího se v krvi na nekonjugované, konjugované a smíšené
  - podle místa jejich vzniku, např. premikrozomální, postmikrozomální apod.
- Bilirubin se stanovuje
  - azokopulační metodou (Jendrassik-Gróf); metoda má několik modifikací, principem je reakce bilirubinu s diazočínidlem na barevnou látku (azobilirubin), stanovitelnou fotometricky
  - oxidačně pomocí
    - bilirubinoxidázy
    - kovu (vanadátová metoda)

Principem je oxidace bilirubinu na biliverdin (změna zbarvení z oranžového na zelené) a měření úbytku absorbance.

- V moči se bilirubin zjišťuje diagnostickým proužkem s indikací na bázi azokopulační metody, nebo Rosinovým čínidlem tj. oxidací bilirubinu jódem na biliverdin.

## 9.5. Kontrolní otázky

- 1 Formulujte průběh dvou základních reakcí pro stanovení glukosy.
- 2 Uvědomte si, jaké jsou dva principy amperometrického stanovení glukosy a jaký je mezi nimi rozdíl.
- 3 Znáte nějaké zástupce (přístroj) pro POCT v rámci měření glukosy?
- 4 Jaký význam má glukosa pro organismus? Co se dá z naměřených (sérových) hodnot koncentrace glukosy vyvodit?
- 5 Kde, jak a proč se tvoří v těle močovina? Je tomu tak u všech živočichů?
- 6 Enzymová metoda na stanovení močoviny obsahuje dva enzymy. Které to jsou a co katalyzují?
- 7 Co říká výsledek stanovení (sérové) močoviny?
- 8 Jaký je princip stanovení kreatininu metodou podle M. Jaffé?
- 9 Co je (obecně) velkou nevýhodou Jaffého metody?
- 10 Co to je a k čemu slouží kreatininová clearance? Jaké všechny údaje potřebujete pro výpočet korigované kreatininové clearance? Za jakých podmínek výpočty neplatí?
- 11 Dá se odhadnout glomerulární filtrace jinak?
- 12 Je kyselina močová pouze odpadním produktem nebo má i nějaký fyziologický význam?
- 13 Jaký je princip enzymového stanovení kyseliny močové?
- 14 Existují stavy z nadbytku či nedostatku kyseliny močové?
- 15 Jak se stanovují aminokyseliny?
- 16 Jaký má vztah stanovení aminokyselin k dědičným poruchám metabolismu?
- 17 Co jsou to dědičné metabolické poruchy?
- 18 Co jsou to porfyriny? Jaké mají vlastnosti?
- 19 Kde se porfyriny uplatňují?
- 20 Co jsou to porfyrie?
- 21 Jaká je metabolická cesta hemu?
- 22 Co je to bilirubin, v jakých formách existuje a jak a kde vzniká? Je vám jasný rozdíl mezi přímým, konjugovaným, nepřímým a celkovým bilirubinem? A co vztah k mikrozomům?
- 23 Uvědomte si rozdílnost principů různých metod pro stanovení bilirubinu. Zkuste je formulovat.
- 24 Uvědomte si principy dělení (typů) hyperbilirubinemií. Zkuste hyperbilirubinemie rozdělit podle různých hledisek. Své závěry konzultujte se schématem metabolismu bilirubinu.
- 25 Je každá hyperbilirubinemie provázána žloutenkou?

**OBSAH:**

Kapitola 9 Porfyriny, hemoglobin a bilirubin .....	9-1
9.1. Porfyriny .....	9-1
9.1.1. Klinické poznámky .....	9-1
9.1.1.1. Porfýrie .....	9-1
9.1.1.1.1. Klasifikace porfyrií podle nejvíce postižených orgánů a buněk.....	9-2
9.2. Hemoglobin .....	9-4
9.2.1. Některé hemoglobiny a jejich struktura.....	9-5
9.3. Bilirubin.....	9-6
9.3.1. Metabolismus bilirubinu .....	9-6
9.3.1.1. Metody stanovení bilirubinu .....	9-7
9.3.2. Žloutenky a hyperbilirubinemie .....	9-8
9.3.2.1. Dělení žloutenek podle vztahu k játrům:.....	9-9
9.3.2.1.1. Klinické poznámky.....	9-9
9.3.2.2. Dělení žloutenek podle typu bilirubinu nacházejícího se v krvi .....	9-10
9.3.2.3. Dělení hyperbilirubinemií podle místa jejich vzniku .....	9-10
9.4. Stručné shrnutí kapitoly.....	9-13
9.4.1. Porfyriny .....	9-13
9.4.2. Hemoglobin .....	9-13
9.4.3. Bilirubin .....	9-14
9.5. Kontrolní otázky.....	9-15