

# **Klinická biochemie anemických stavů, metabolismu Fe; metody stanovení**

**Miroslava Beňovská**

# Příznaky anémie lze rozdělit:

- Příznaky vznikající v důsledku poklesu transportu kyslíku do tkání ( únava, dušnost, angina pectoris, orgánové poruchy)
- Příznaky vyplývající ze snížení plazmatického volumu (bledost, hypotenze)
- Příznaky vyplývající ze zvýšeného srdečního objemu (tachykardie, srdeční šelest)

Dle morfologických kritérií se anémie dělí na základě objemu erytrocytu, množství hemoglobinu v erytrocytu a počtu retikulocytů

# Anémie z nedostatku železa – sideropenické anémie:

- z nadměrné ztráty železa – časté
- nedostatečný příjem – vzácné
- spíše inhibice vstřebávání způsobena např. fosfáty, oxaláty
- malabsorpce při celiakii, Crohnově chorobě
- v těhotenství – zvýšené nároky na přívod Fe
- klinicky – únava, slabost, hučení v uších, dušnost

# Sideropenie - tři stádia – prelatentní, latentní a manifestní

- Již v období prelatentního nedostatku železa se uplatňují kompenzační mechanismy organismu
- Zvýšená resorpce železa z GIT, snížení jeho výdeje a útlum tvorby zásobního proteinu Fe – feritinu
- Zvýšena resorpce diagnostické dávky  $^{59}\text{Fe}$  z 25% na 75% a snížen výdej Fe močí po jednorázovém podání desferioxaminu

Terapie - léčba příčiny sideropenie  
- substituce Fe

**Tab. 14.7. Vyšetření používaná v diagnostice nedostatku železa**

<b>Vyšetření</b>	<b>Prelatentní sideropenie</b>	<b>Latentní sideropenie</b>	<b>Manifestní sideropenie</b>
Ferritin v séru	↓ u poloviny nemocných	↓ pod 12 µg/l	↓ pod 5 µg/l
Fe v séru	normální	↓ pod 6 µmol/l	↓ pod 4 µmol/l
Saturace transferinu	normální	↓ pod 16 %	↓ pod 10 %
Cirkulující transferinový receptor v séru	normální	↑ nad 5 mg/l	↑ nad 8 mg/l
Hb	normální	normální	↓ muži < 135 g/l, ženy < 120 g/l

# Anémie z nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové – megaloblastické

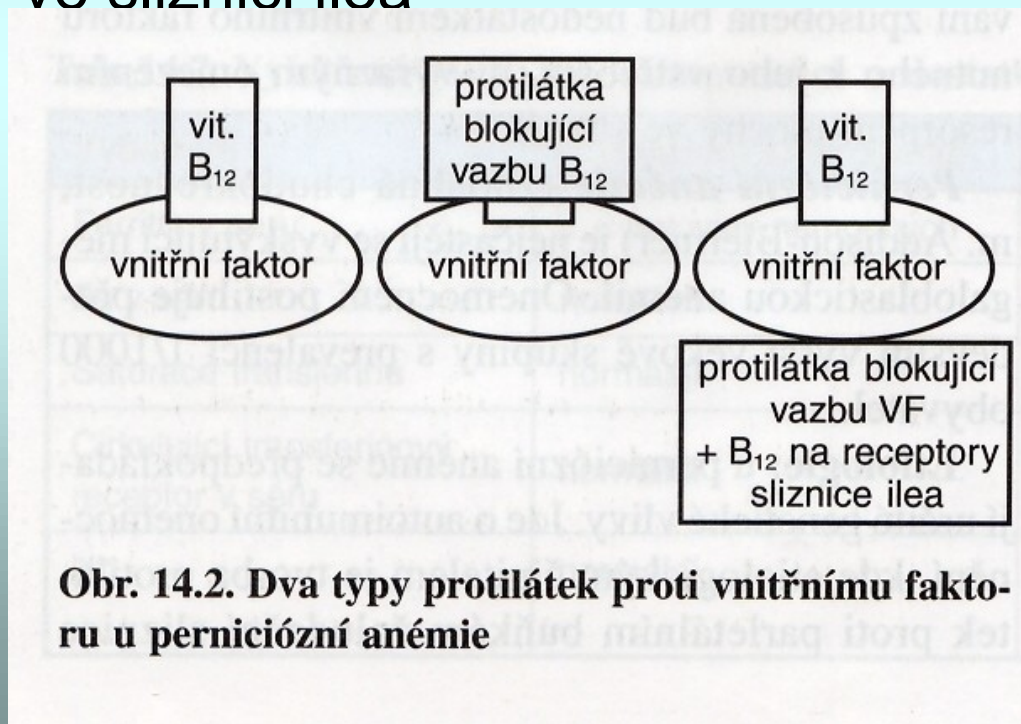
- Označují se takto dle morfologického vzhledu erytrocytů
- Nejčastější příčinou nedostatku vitamínu B12 je porucha vstřebávání
- Způsobená buď nedostatkem vnitřního faktoru nebo výrazným omezením resorpční plochy ve střevě
- Perniciózní anémie – nejčastější, postihuje vyšší věkové kategorie, genetické vlivy, autoimunitní onemocnění (protilátky proti buňkám žaludeční sliznice)
- Vnitřní faktor – glykopeptid nutný při vstřebávání B12 v ileu

# Anémie z nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové – megaloblastické

Prokázány dva typy protilátek –

a) brání vazbě vit. B12 na vnitřní faktor

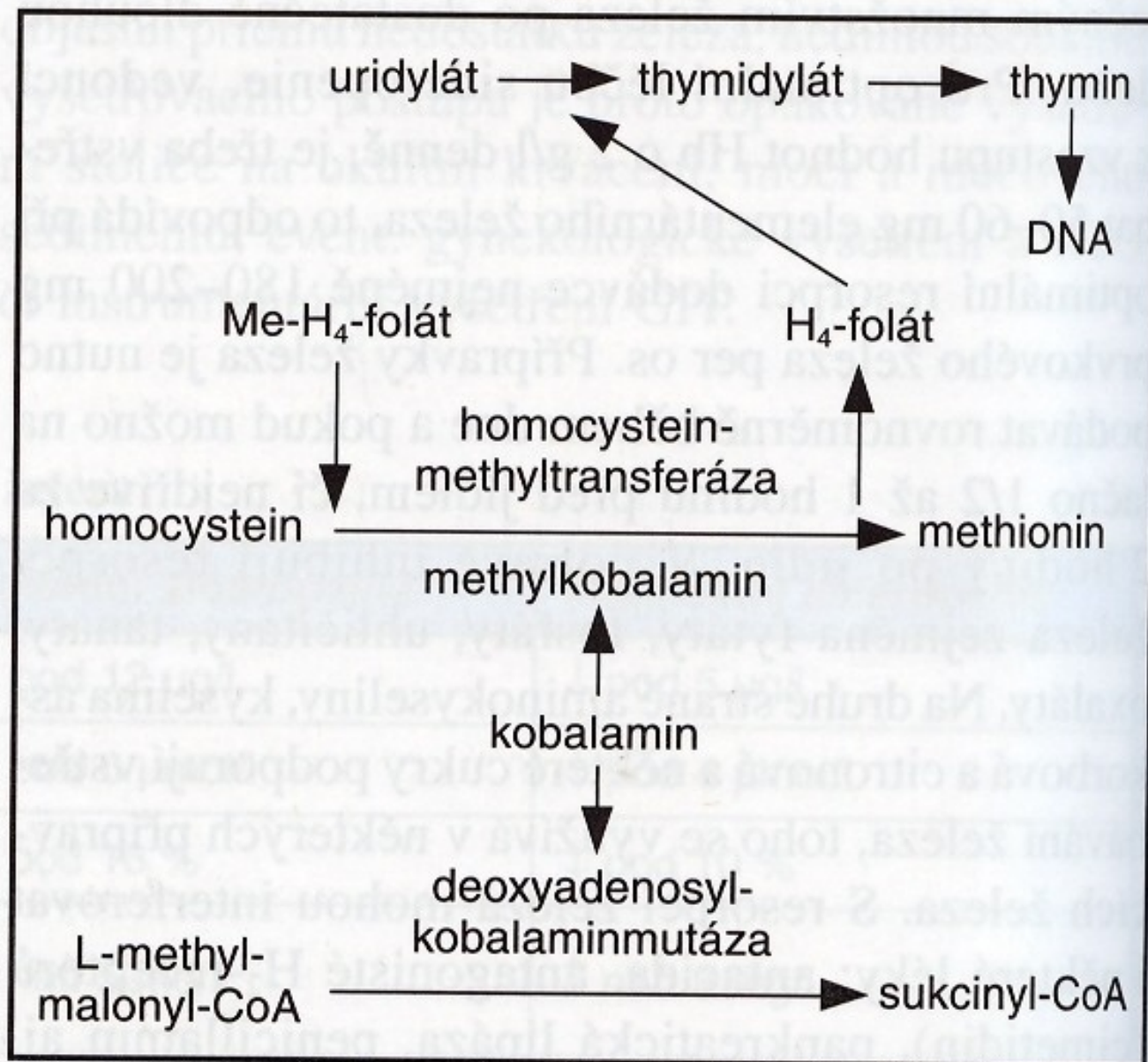
b) inhibují vazbu komplexu vit. B12 - vnitřní faktor na receptory ve sliznici ilea



# Megaloblastická anémie

- **Vzniká i po resekci žaludku – většinou kombinace nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové ( ta se vstřebává v duodenu a horním jejunu)**
- **Vitamín B12 tvoří prostetickou skupinu enzymu homocysteinmethyltransferázy, která demethyluje tetrahydrofolát a přenáší methylovou skupinu z homocysteinu na methionin**
- **Tetrahydrofolát je následně opět methylován a je donorem methylové skupiny pro tvorbu thyminu**
- **Důsledkem nedostatku vit. B12 a kyseliny listové je tedy porucha syntézy thyminových bází a tvorby DNA**
- **Prodlužuje se S-fáze buněčného cyklu, při níž se zdvojnásobuje množství DNA, výsledkem je velký objem buňky s nezralým jádrem – megaloblast**





**Obr. 14.3. Metabolismus vitaminu B<sub>12</sub> a kyseliny listové**

# Anémie při chronickém onemocnění:

- Chronické infekce (tuberkulóza, AIDS), zánětlivá onemocnění, nádory
- Aktivace imunitního systému vedoucí k omezení nabídky železa invadujícím patogenům či nádorovým buňkám, pro něž Fe představuje zásadní růstový faktor
- Stimulace tvorby feritinu spolu s blokádou uvolňování železa ze zásobárny

# Anémie ze zvýšeného zániku erytrocytů – hemolytické :

- Charakteristická je zkrácená doba přežití erytrocytů v periferní krvi
- Často ani maximálně stupňovaná krvetvorba není schopna nahradit zvýšený rozpad krvinek

## Hemolytické anémie:

- Dědičná sférocytóza (porucha skeletu erytrocytární membrány – deficit spektrinu)
- Anémie z poruchy enzymatické výbavy erytrocytu – př. deficit pyruvát kinázy
- Anémie z poruchy tvorby hemoglobinu - beta-thalasemie
- Autoimunitní hemolytické anémie – porucha kooperace mezi pomocnými a supresorovými lymfocyty T a B

# Vitamín B12 (cyanocobalamin):

- Molekula B12 obsahuje jako centrální atom kobalt, který je umístěn uprostřed porfyrinového jádra
- Vitamín je nezbytný pro tvorbu nukleových kyselin, tedy pro dělení buněk
- Nedostatek se projeví perniciózní anémií
- Deficit je nejčastěji způsoben poruchou absorpce při chronické atrofické gastritidě, kdy žaludeční sliznice netvoří mukoprotein nezbytný pro vstřebávání vitamínu B12, tzv. vnitřní faktor
- Ověření se provádí Schillingovým testem, kdy se sleduje absorpce vitamínu B12 po podání vnitřního faktoru

# Stanovení vitamínu B 12 ( sérum, plasma):

- Komerční stanovení se zakládá na technikách stanovujících volný nebo vázaný vitamín B12
- Přítomnost endogenních sérových vazebných proteinů pro cyankobalamin ( transkobalaminy včetně R-proteinu) a imunoglobulinů namířených proti vnitřnímu faktoru vyžaduje pro uvolnění vitamínu B12 povaření materiálu nebo zpracování v alkalickém pH
- Historie – imunochemické metody - v 70-tých létech se k stanovení vitamínu B12 pomocí RIA využívalo sérových vazebných proteinů a částečně vyčištěného vnitřního faktoru – výsledky byly často falešně zvýšené

# Stanovení vitamínu B 12 ( sérum, plasma):

V současnosti:

Vitamín B12 se stanovuje kompetitivním testem využívajícím vysoce čistého vnitřního faktoru specifického pro vit. B 12 po uvolnění z endogenních vazebných proteinů

**Imunochemické metody** – např.

- Elektrochemiluminiscence - Roche – Elecsys, E170 –  
Vit. B 12 ze vzorku soutěží s vit. B 12 značeným biotinem o vazebná místa na vnitřním faktoru značeným rutheniovým komplexem
- Chemiluminiscence – Siemens (Bayer) – Centaur –  
Vitamín B12 ze vzorku soutěží s vitamínem B12 značeným akridinium esterem o limitovanou koncentraci vnitřního faktoru kovalentně vázaného na paramagnetické částice  
Po separaci chemiluminiscenční reakce s peroxidem vodíku a NaOH

Referenční rozmezí: 150 – 650 pmol/l

# Folát (kyselina listová)

- **Tetrahydroderivát kyseliny listové je koenzymem metabolismu jednouhlíkatých zbytků**
- **Uplatňuje se při řadě reakcí včetně tvorby nukleových kyselin**
- **Nedostatek se projevuje podobně jako deficit vitamínu B12, tj. megaloblastickou anémií**
- **Nedostatek velmi častý - je jednou z nejčastějších příčin mírné hyperhomocysteinémie (vliv na sklerotické a trombotické onemocnění periferních cév), u těhotných může zvyšovat frekvenci defektu neurální trubice plodu**
- **Nedostatek může způsobit dieta bez čerstvého ovoce a zeleniny, objevuje se u alkoholiků, drogově závislých, nebo starších osob**

# Stanovení folátu v séru (plasma není vhodná):

## Imunochemické metody

Kompetitivní princip po uvolnění folátu z endogenních folát vázajících proteinů

- např. elektrochemiluminiscence Roche – Elecsys, E170
- chemiluminiscence – Siemens (Bayer) – Centaur  
Folát ze vzorku soutěží s folátem značeným akridinium esterem o limitovaný počet molekul folát vázajícího proteinu značeného biotinem  
Tento protein se váže k avidinu na paramagnetických částicích  
Po separaci probíhá chemiluminiscenční reakce s peroxidem vodíku a NaOH

Referenční rozmezí: 10 – 50 nmol/l

Interference: Hemolýza výrazně zvyšuje koncentraci folátu, z hemolytických vzorků se proto stanovení neprovádí.



# Feritin

- Zásobní vysokomolekulární bílkovina obsahující železo
- Nachází se v játrech, slezině, kostní dřeni a střevní sliznici
- Koncentrace feritinu v séru odráží tkáňové zásoby železa – její hladina klesá dříve než roste koncentrace transferinu
- Zvýšení syntézy feritinu indukováno nedostatkem železa v organismu
- Buňky některých nádorů, především akutní myeloblastická leukémie nebo mnohočetný myelom, produkují feritin - koncentrace feritinu jako tumormarker
- Může být zvýšen rovněž u chronických zánětů a onemocnění jater

# Stanovení feritinu (sérum, plasma):

## Imunochemické metody

Sendvičový princip

- např. **elektrochemiluminiscence** - Roche – Elecsys, E170

- **chemiluminiscence** - Siemens – Immulite

- Stanovení založeno na reakci jednoho epitopu feritinu s myší protilátkou navázanou na polystyrénové kuličky a druhého epitopu s polyklonální protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou
- Po promytí se přidá fosforečný ester adamantyl dioxetanu - ten s ALP hydrolyzuje na nestabilní meziprodukt
- Meziprodukt se rozpadá za produkce luminiscence

# Stanovení feritinu (sérum, plasma):

## - fluorescenční imunoanalýza

Kryptor – Brahms

Dvě různé protilátky tvoří komplex s feritinem

Jedna značena donorem energie - kryptát europa, druhá akceptorem XL 665

Po ozáření komplexu dusíkovým laserem donor emituje dlouhotrvající signál v ms, zatímco akceptor generuje signál v ns

Obě komponenty svázané v jeden komplex - je možné signál měřit v ms

Dochází rovněž k spektrálnímu posunu

Velikost signálu je úměrná koncentraci stanovovaného analytu

Referenční rozmezí: M 30 – 400 ug/l

Ž 5 – 150 ug/l

# Transferin –Trf

- Transportní protein pro železo v séru
- Při anémii zvýšené hodnoty
- Při nedostatku železa velmi citlivý indikátor saturace transferinu
- Využívá se i při monitorování léčby anémie

## **Stanovení transferinu (sérum, plasma) –**

imunoturbidimetry

imunonefelometry

– př. Roche Diagnostic – Protilátky proti transferinu reagují se stanovovaným transferinem za vzniku komplexu antigen-protilátka

Reakce se provádí v přítomnosti NaCl a PEG

Aglutinát se stanoví turbidimetry

Referenční interval: 2 – 3,6 g/l

# Solubilní transferinové receptory – sTFR

- Transferinový receptor je integrální membránový protein
- Každá ze dvou podjednotek může vázat molekulu transferinu nesoucí železo
- Účinkem proteolýzy vzniká rozpustná forma transferinového receptoru
- sTFR je v plasmě přítomen v komplexu s transferinem
- Koncentrace sTFR je úměrná koncentraci receptoru na membránách
- Při deficitu Fe se koncentrace sTFR v séru zvyšuje
- Na rozdíl od koncentrace ferritinu není koncentrace sTFR ovlivněna reakcí akutní fáze, nebo maligními nádory
- Uplatňuje se v diferenciální diagnostice – rozlišení mezi chronickým onemocněním a anémií z nedostatku Fe

# Stanovení sTFR (sérum, plasma) – imunoturbidimetricky:

Princip – př. Roche Diagnostic

Částicemi usnadněné imunoturbidimetrické stanovení:

- Lidský rozpustný transferinový receptor aglutinuje s latexovými částicemi, potaženými s protilátkou proti rozpustnému transferinovému receptoru
- Precipitát se stanoví turbidimetricky

Referenční interval: 2 – 5 mg/l