

**MUNI
MED**

Bilirubin, hemoglobin, porfyriny, VNM, HIOK, léky

MUDr. RNDr. Michal Řiháček, Ph.D.

Ústav laboratorní medicíny a Ústav biochemie

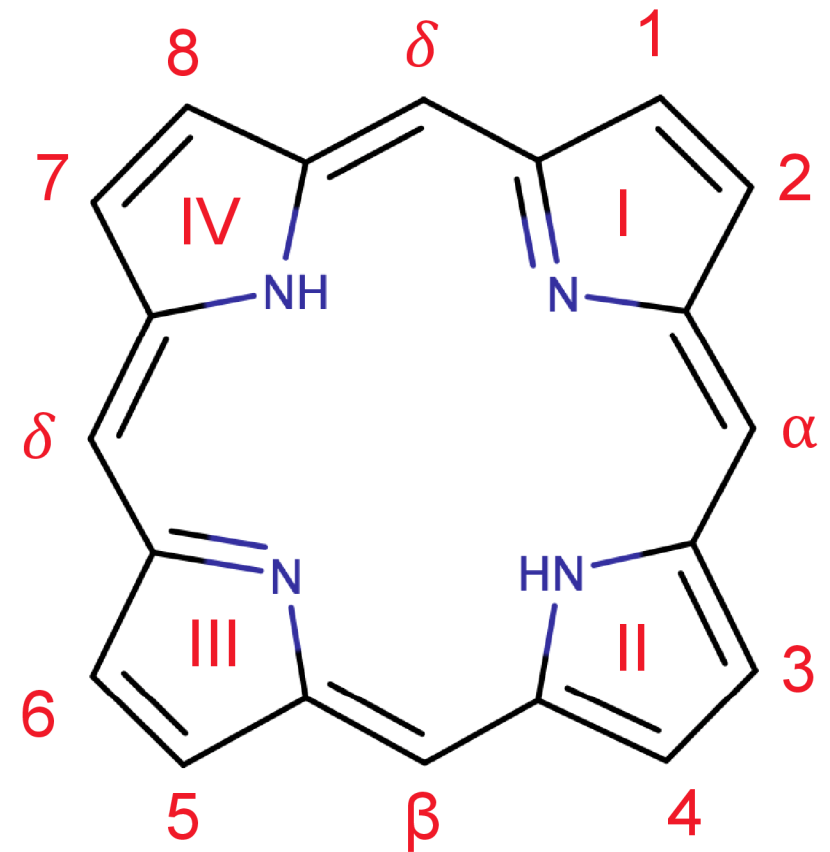
Fakultní nemocnice Brno a LF MU

Krevní barviva

porfyriny,
hemoglobin a jeho deriváty,
bilirubin

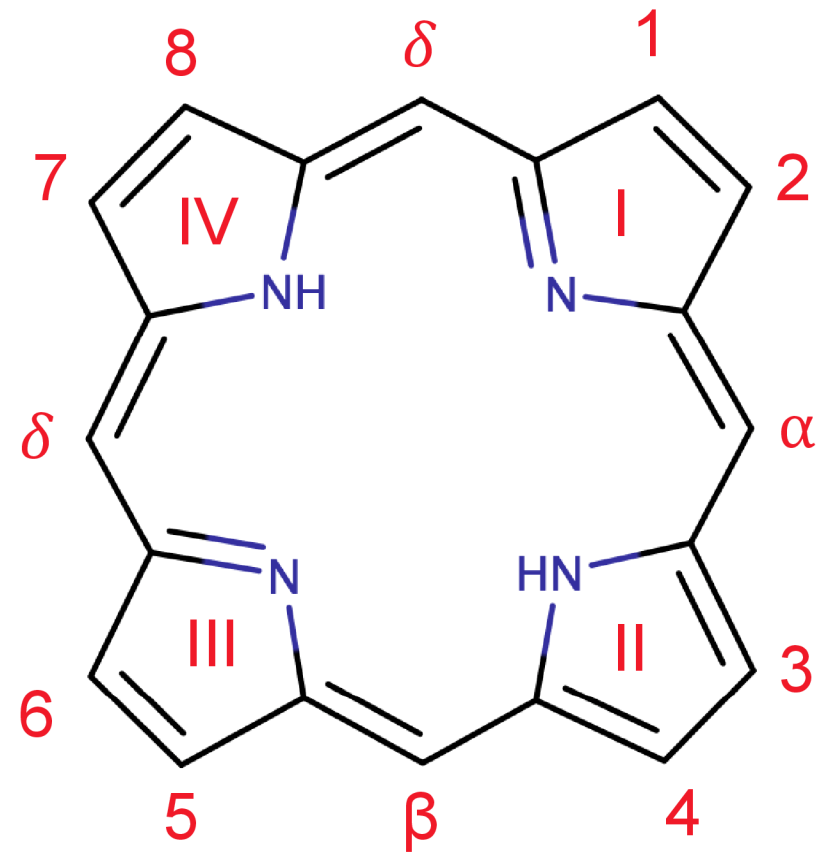
Porfyriny

- sloučeniny odvozené od porfinu
- **porfin**: tetrapyrrol se čtyřmi pyrrolovými kruhy spojenými methylenovými můstky
- významná vlastnost je schopnost **vazby kovových iontů** (**metalloporfyriny**)
- substituce perif. vodíků na uhlíku 1-8 (methyl, vinyl, karboxyethyl, karboxymethyl)



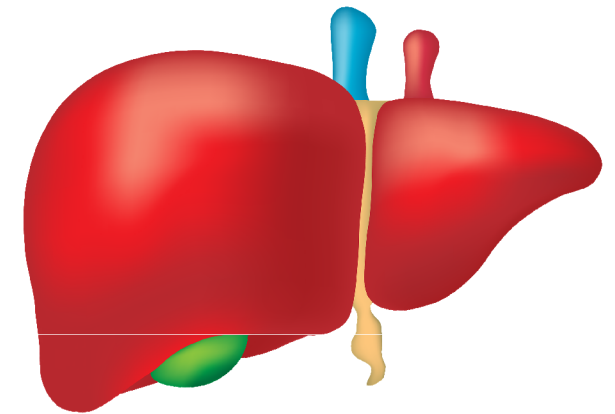
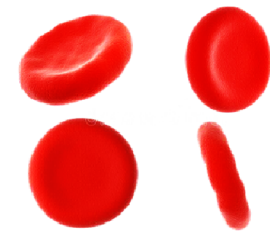
Porfyriny

- dle uspořádání substituentů C1-8
- **symetrické:** porfyriny typu I
- **asymetrické:** porfyriny typu III (nejvýznamnější – hem)



Biosyntéza hemu

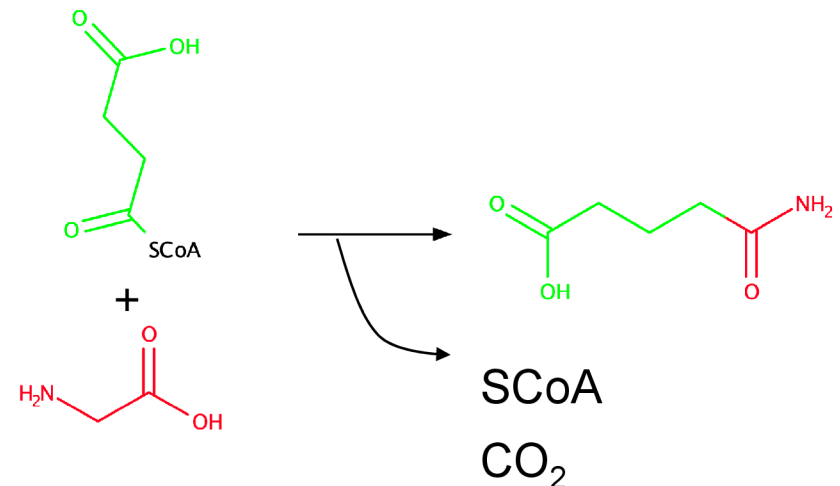
- vznik:
erytrocytární prekurzory (70-80%)
játra (15%)
- cíl:
erytrocyty (hemoglobin)
játra (cytochromy)
ostatní buňky (katalázy,
peroxidasy – dýchací řetězec)



1. Syntéza kyseliny 5-aminolevulové (5-ALA)

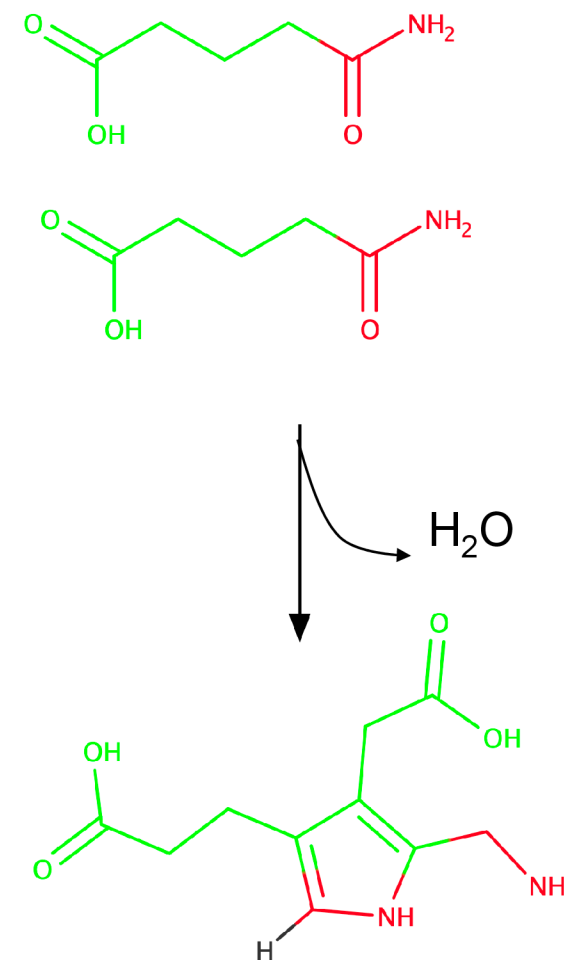
- vzniká kondenzací **glycinu** se **sukcinyl-CoA** a následnou **dekarboxylací intermediátu** této reakce
- katalýza: **5-ALA synthasa (ALAS)**, vitamin B6 (PLP)
- lokalizace: matrix mitochondrie

- nejvýznamnější **regulační bod** syntézy



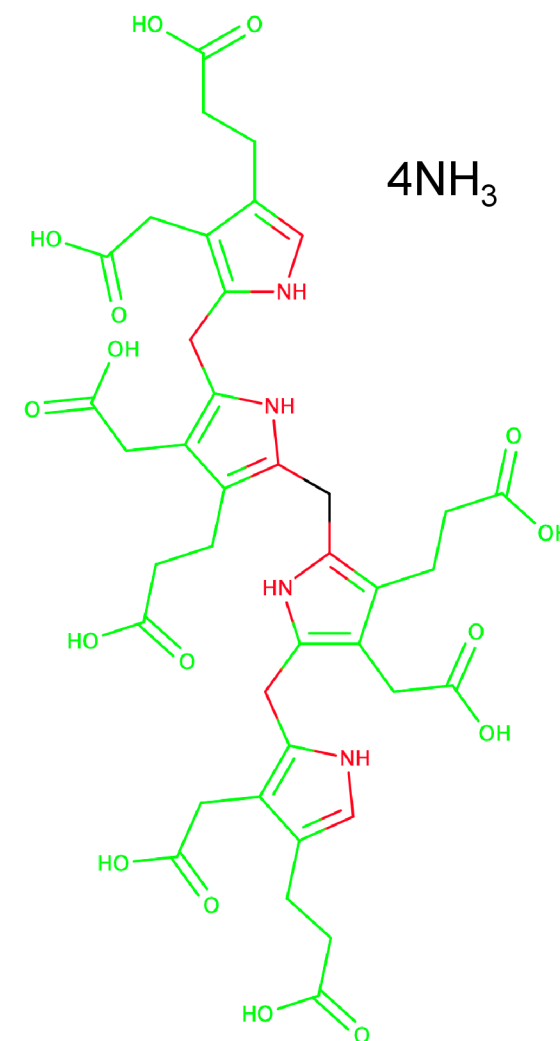
2. Vznik porfobilinogenu (PBG)

- 5-ALA přechází do cytosolu, kondenzace za enzymatické katalýzy je dalším krokem
- katalýza: **5-ALA dehydratasa (ALAD)**, Zn^{2+}
- lokalizace: cytosol
- **ireversibilní inhibice reakce vazbou Pb^{2+} iontů ve vazebných místech pro Zn^{2+}**
- **choroby:** porfyrie z ALAD deficiencie, **otrava olovem !**



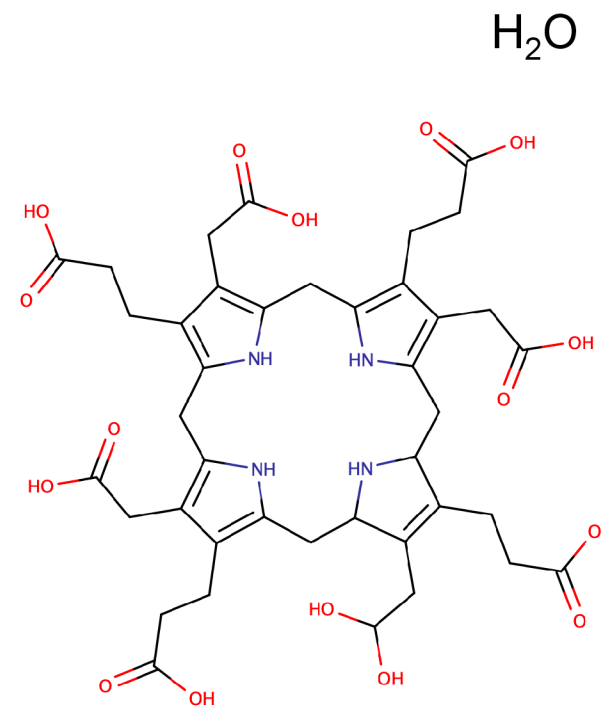
3. Vznik hydroxymethylbilanu

- kondenzace čtyř PBG
- katalýza: **HMB-synthasa / PBG-deaminasa**
- lokalizace: cytosol
- uvolnění 4 molekul amoniaku
- choroby: **akutní intermitentní porfyrie**



4. Vznik uroporphyrinogenu III

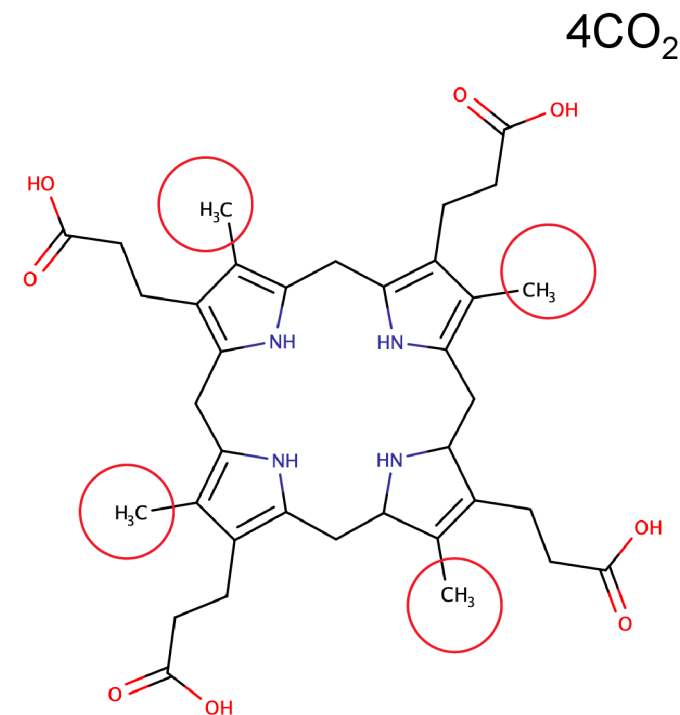
- cyklizace HMB
- katalýza: **uroporphyrinogen III synthasa (UROS)**
- lokalizace: cytosol
- uvolnění H_2O
- **choroby:** kongenitální erythropetická porfyrie



5. Vznik koproporfyriu III

- dekarboxylace acetátových skupin na methylové zbytky
- katalýza:
uroporfyriu dekarboxylasa (UROD)
- lokalizace: cytosol
- **uvolnění 4 molekul CO₂**

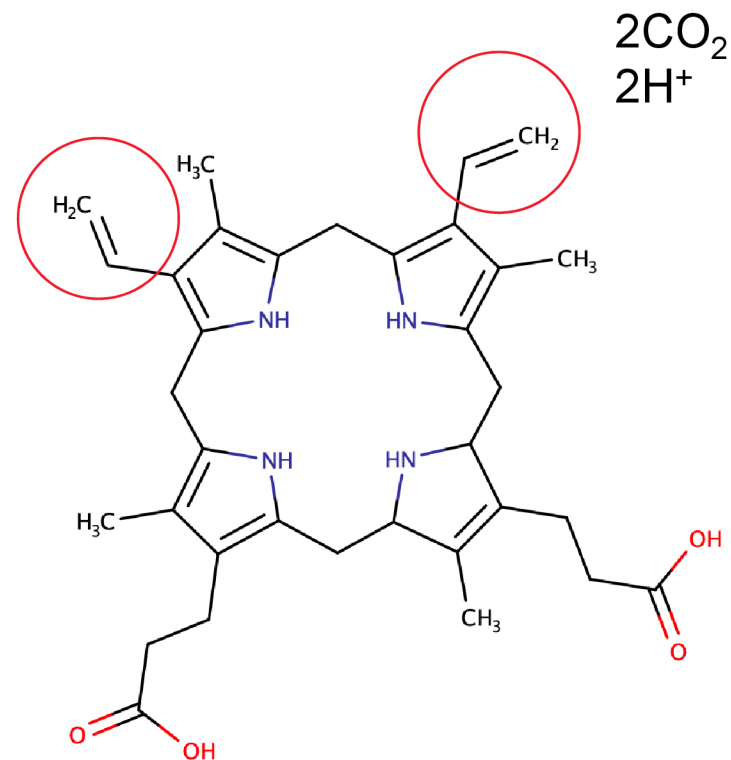
- choroby: **porphyria cutanea tarda**



6. Vznik protoporphyrinogenu IX

- oxidativní dekarboxylace propionátů na vinylové zbytky
- katalýza: **koproporphyrinogenoxidas (CPO)**
- lokalizace: mitochondrie
- **uvolnění 2 molekul CO_2 a 2H^+**

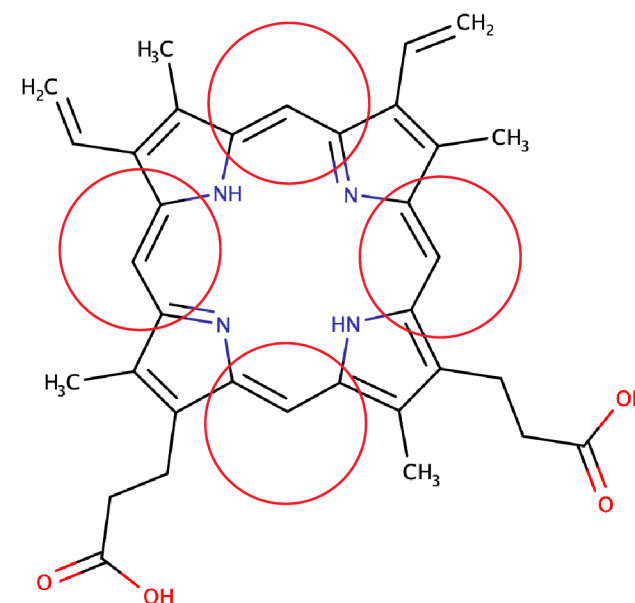
- **choroby:** hereditární koproporfyrie, **otrava olovem !**



7. Vznik protoporphyrinu IX

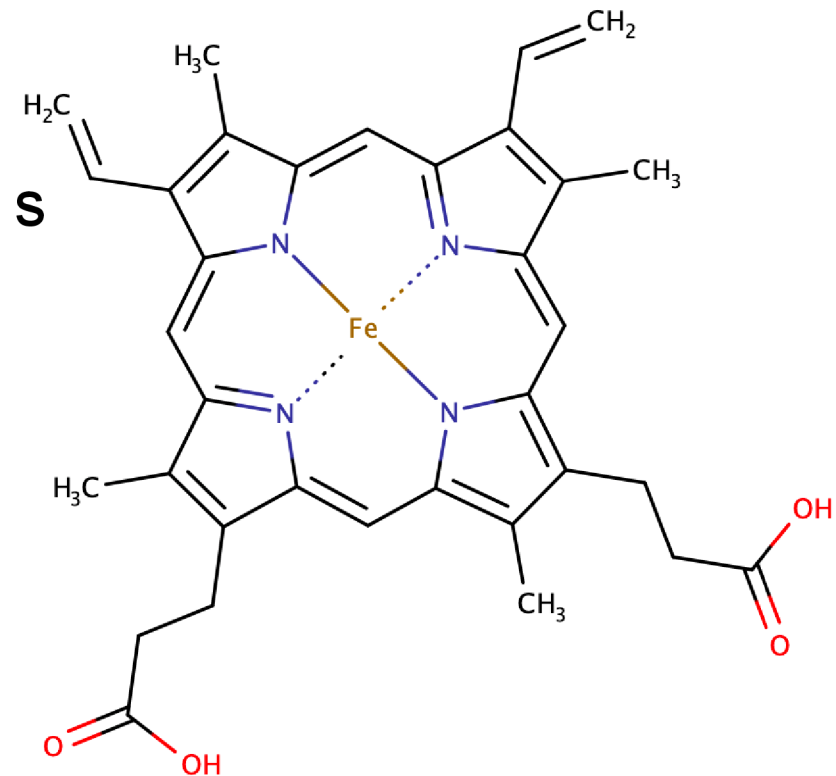
6H⁺

- přeměna methylenů na methin a vznik konjugovaných π -vazeb (zabarvení)
- katalýza: **protoporphyrinogenoxidas** (**PPO**) + O₂ za vzniku vody
- lokalizace: vnitřní mitochondriální membrána
- uvolnění 6H⁺
- **choroby:** variegátní porfyrie



8. Vznik hemu

- vestavba Fe^{2+}
- katalýza: **ferrochelataza (hemsynthasa)** a proteinové molekuly s $[\text{2Fe} - \text{2S}]$ klastrem
- lokalizace: vnitřní mitochondriální membrána
- uvolnění 2H^+
- **choroby: erythropoetická porfyrie, otrava olovem !**



Dělení porfyrií

nejvíce postižených orgánů produkujících porfyriny:

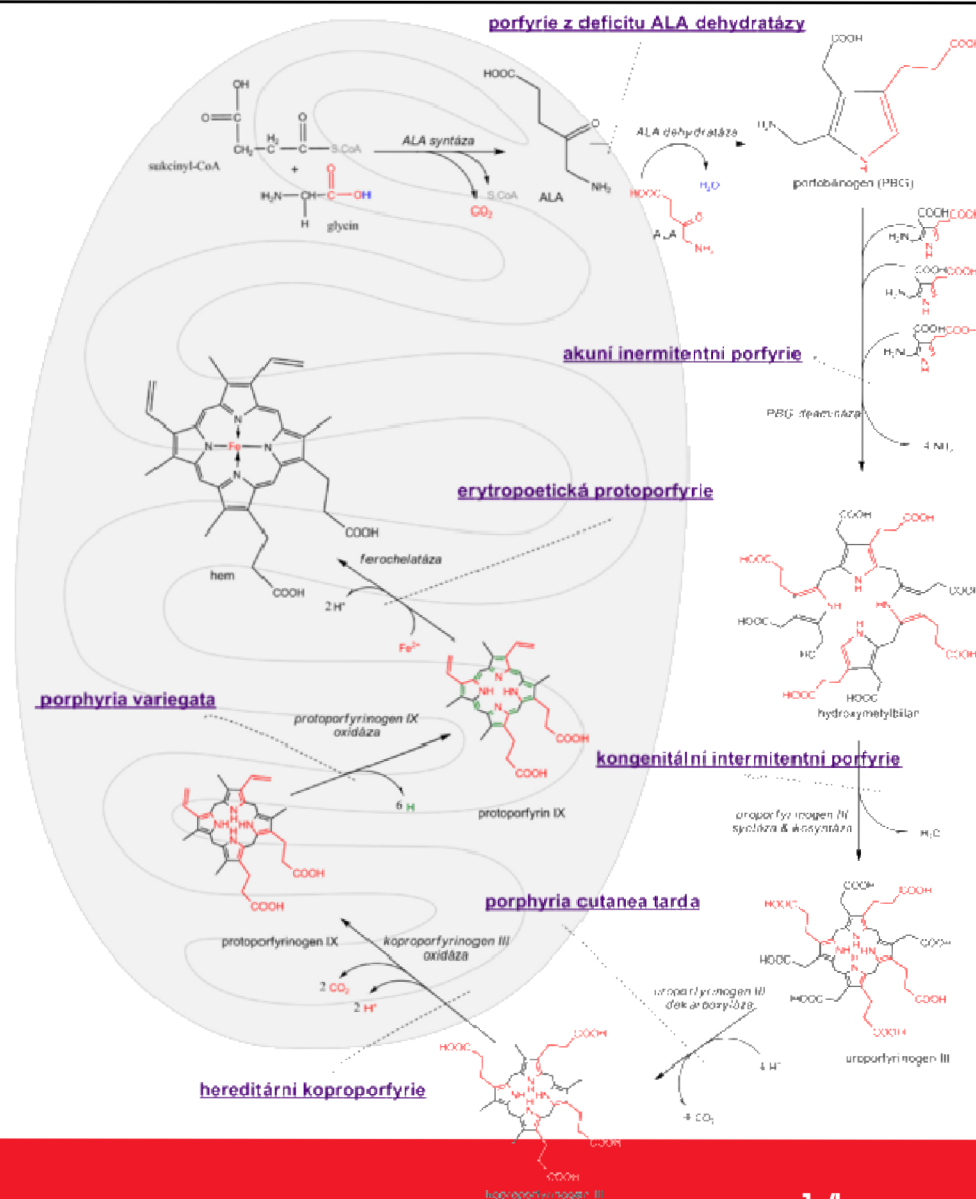
1. hepatální – AIP, PCT, HCP, VP, ADP;
2. erythropoetické – CEP;
3. erytrohepatální – EPP;

projevů:

1. kožní – PCT, EPP, CEP;
 2. jaterní – AIP, ADP, VP, HCP;
- (VP a HCP také způsobují kožní projevy)

průběhu:

1. akutní – AIP, VP, HCP, ADP;
2. chronické – PCT, EPP, CEP;



Akutní intermitentní porfyrie

- defekt 3. kroku = vznik hydroxymethylbilanu
- **AD onemocnění**
- akutní ataka po zátěži chem. Látkami (léky, alkohol, steroidy)
- **bolest břicha, zácpa, zvracení, neurologické příznaky**
- **léčba: glukóza i.v. – inhibice ALAS**



dg. ↑↑ALA a PBG v moči

Porfyrria cutanea tarda (PCT)

- defekt 5. kroku = dekarboxylace acetátů na methylové zbytky
- **AD onemocnění**
- hromadí se **uroporfyrinogen III**, který se ukládá do kůže a zvyšuje **fotosenzitivitu**
- hlavně muži středního věku
- **léčba: venepunkce, chininové preparáty, ochrana před sluncem, jaterní dieta**



↑ **uropofyrinogen v moči**

↑ **koproporfyryn ve stolici**

Erythropoetická porfyrie (EPP)

- defekt 8. kroku = ferrochelatasy
- **AD onemocnění**
- hromadí se **protoporfyriu IX** v játrech, kůži a kostní dřeni
- **zarudnutí, svědění a otok kůže, výjimečně jaterní postižení**
- **léčba: beta-karoten, antihistaminika**



protoporfyriu v krvinkách a ve stolici (vzácně)

Diagnostika – iniciální screening z moči

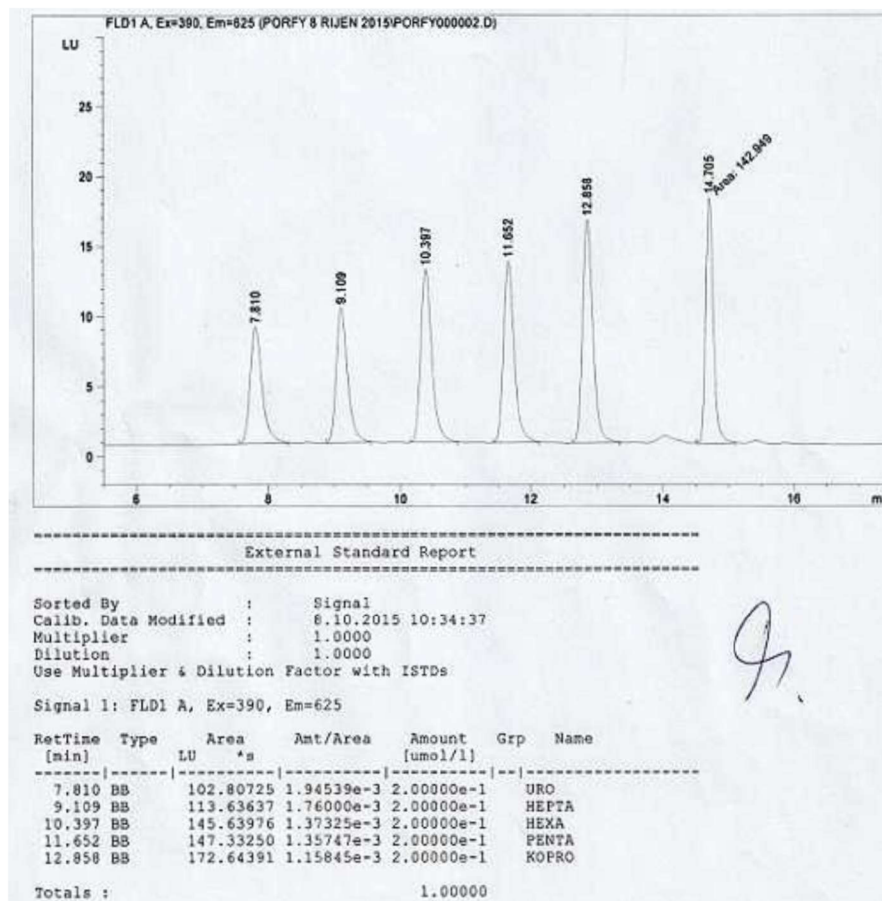
Charakteristické absorpční spektrum – **Soretův pás**, s maximem okolo 400 nm

- Materiál: **okyselená (H₂SO₄) jednorázová moč, chráněná před světlem**
- Referenční rozmezí: do 144 µg/l (0,22 µmol/l)
- V případě positivity **následuje další vyšetření moče** – stanovení jednotlivých porfyrinů, stanovení prekurzorů porfyrinů (ALA, PBG), a případně i enzymů v krvi podílejících se na tvorbě a přeměně porfyrinů (výjimečně).
- Méně často možnost stanovení porfyrinů ve stolici, erytrocytech či plazmě

Diagnostika – stanovení jednotlivých porfyrinů

- V kyselém prostředí po ozáření UV světlem (400 nm) silně fluoreskují v červené oblasti (550-650 nm)
- HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí
- Materiál: konzervovaná (Na_2CO_3) sbíraná moč (24 h), chráněná před světlem
- Referenční rozmezí:
 - URO: do 0,050 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
 - KOPRO: do 0,280 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
 - HEPTA: do 0,014 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
 - HEXA: do 0,006 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
 - PENTA: do 0,005 $\mu\text{mol}/24\text{h}$

Diagnostika – HPLC-FLD porfyriny



Diagnostika – HPLC-FLD porfyriny

Pacient byl přijat pro podezření na porfyrii (poruchu syntézy hemu). Poslední dva roky se mu objevovaly pigmentové skvrny na rukou, byl vyšetřen na kožní klinice, kde na základě kožní biopsie vzniklo podezření na porfyrii. Laboratorně měl pacient opakovaně pozitivní porfyriny v moči. Za hospitalizace byla provedena jaterní biopsie a laboratorní diagnostika protilátek, pacient byl nadále sledován ambulantně. Byla mu doporučena abstinence a nevystavovat se přímému slunci.

Diagnostika – HPLC-FLD porfyriny

Test	Rok/Měsíc					Referenční interval	<input type="radio"/> SI <input type="radio"/> KJ
	1/1	1/2	1/3	3/1	5/1		
Sérum							
Urea	5,0	5,0	5,9	5,8	5,5	(1,7–8,3 mmol/l)	SI
Krea	98	83	101	80	82	(59–104 µmol/l)	SI
BiT	14,6	9,4	6,8	10,4	9,7	(2,0–21,0 µmol/l)	SI
ALT	1,58	1,26	1,64	0,55	0,81	(0,17–0,85 µkat/l)	SI
AST	0,78	0,66	0,87	0,50	0,53	(0,17–0,85 µkat/l)	SI
GGT	1,14	0,68	0,90	0,27	0,51	(0,13–1,02 µkat/l)	SI
ALP	0,80	0,83	1,11	0,65	0,81	(0,67–2,15 µkat/l)	SI
Moč							
dU-Koproporfyryl	0,230	0,290	0,105	0,108	0,200	(0–0,280 µmol/24h)	SI
dU-Uroporfyryl	4,230	6,860	1,770	0,016	0,030	(0–0,050 µmol/24h)	SI
dU-Pentaporfyryl	0,120	0,150	0,057			(0–0,005 µmol/24h)	SI
dU-Hexaporfyryl	0,070	0,090	0,058			(0–0,006 µmol/24h)	SI
dU-Heptaporfyryl	0,700	1,060	0,562			(0–0,014 µmol/24h)	SI
U-Porfobilinogen			26,670			(0,04–36,00 µmol/l)	SI

Hemoglobin

- Transportní metaloprotein v červených krvinkách
- Přenos krevních plynů - především O₂ z plic do periferních tkání, ale i části CO₂ v opačném směru
- Důležitý pufrční systém krve – vazba H⁺ na postranní řetězce His (především v periferní tkáni)

- Koncentrace Hb v krvi se liší podle pohlaví: ženy: 120-162 g/l
muži: 135-172 g/l

Hemoglobin

Poruchy syntézy globinu

- talasémie – geneticky podmíněná snížená nebo chybějící syntéza některého z globinových řetězců
- **Beta-talasémie** – omezena produkce β -řetězců, kompenzace syntézou HbA₂, HbF, (fragilnější Ery, porucha zabudování Fe)
- hemoglobinopatie – vrozené defekty genu tvořícího řetězce globinu: **záměna aminokyselin a následná syntéza patologicky změněné molekuly Hb hemoglobinu**);
- nejznámější: Hemoglobinopatie S (Srpkovitá anémie, Glutamin $\beta_6 \rightarrow$ Val)
 - hemolytické projevy, zkrácené přežívání drepanocytů, ztráta negativního náboje Hb
 - vyšší odolnost vůči malárii
- **Analýza globinových řetězců**
disociace globinových řetězců a hemu a následná separace – elektroforeticky, HPLC, isoelektrická fokuzace - možná i analýza pomocí MS

Hemoglobin

Stanovení Hb v plné krvi

- v rámci vyšetření krevního obrazu na hematologických analyzátoch: lýza erytrocytů a tvorba opticky stálého barevného komplexu s lauryl sulfátem sodným nebo imidazolem
- v rámci vyšetření acidobazické rovnováhy na ABR
- analyzátoch: měření absorpce světla v plné krvi
ABL 825 flex (Radiometr) - 1 μ l vzorku je ultrazvukově zhemolyzován v kyvetě, vytvoří se tím opticky čirý roztok, absorbance
- Drabkinova metoda (referenční): hemolýza, oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} hexakynoželézitanem draselným ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$)
za vzniku metHb, který je reakcí s KCN převeden na kyanHb s absorpčním maximem při 540 nm

Hemoglobin

Stanovení volného Hb v séru

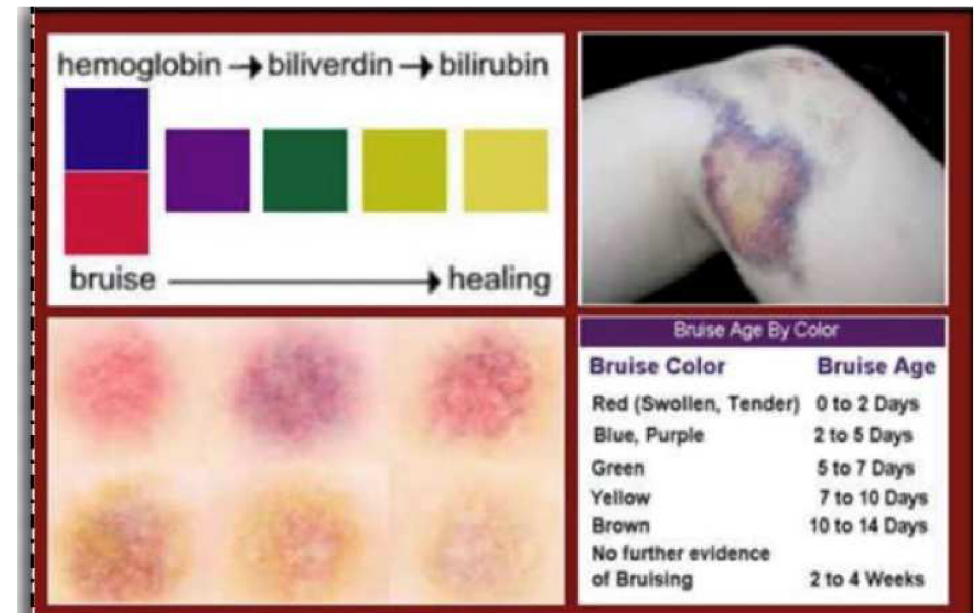
- tzv. “sérové indexy“
- spektrofotometrie
- detekce hemolýzy ve vrozku
- při porovnání s haptoglobinem a krevním obrazem pac. slouží k odlišení intra a extra vaskulární hemolýzy

Stanovení hemoglobinu ve stolici – okultní krvácení

- gFOBT (guajakový test, Haemoccult) – interference maso, vit C
- iFOBT (imunochemický test) – imunoafinitní chromatografie (vyloučení krvácení do GIT)

Bilirubin

- produkt rozpadu hemoglobinu
- hem se nejprve konvertuje na **biliverdin** (hemoxidasa), ten se redukuje na **bilirubin**, který se váže na albumin a pokračuje do **jater**, kde je konjugován (blíže viz přednáška játra...)



Bilirubin - stanovení

- Spektrofotometrické stanovení
- většina metod fotometrického stanovení bilirubinu vychází z diazotačních reakcí.
- Vznik barevného produktu

- Celkový bilirubin
- uvolnění z vazby na albumin a rozpuštění účinkem akcelérátoru (kofein, benzoan sodný, octan sodný), následuje diazotace

- Přímý bilirubin
- přímá reakce s diazo činidlem, krátká inkubace, zastavení reakce přidavkem kyseliny askorbové

