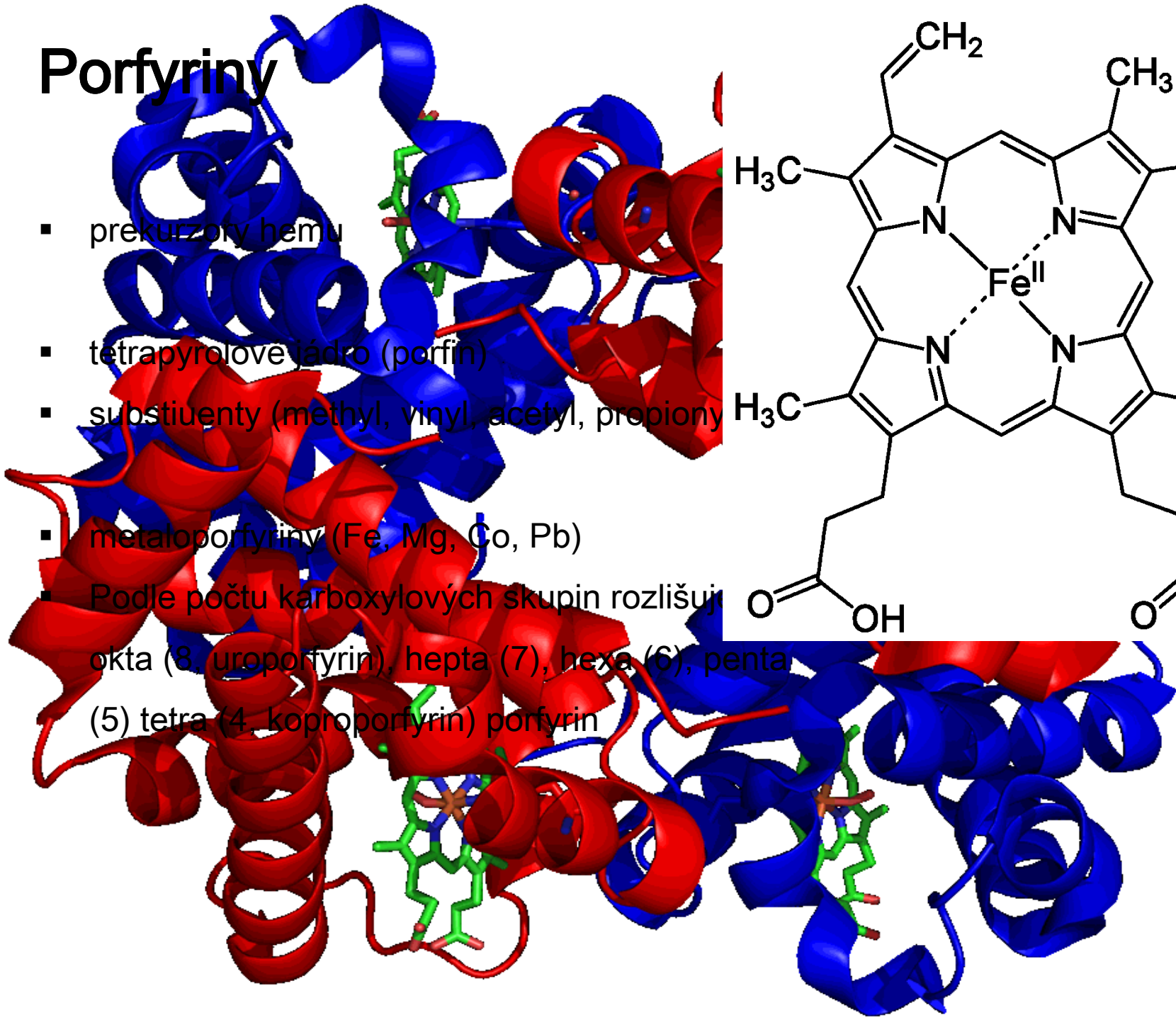
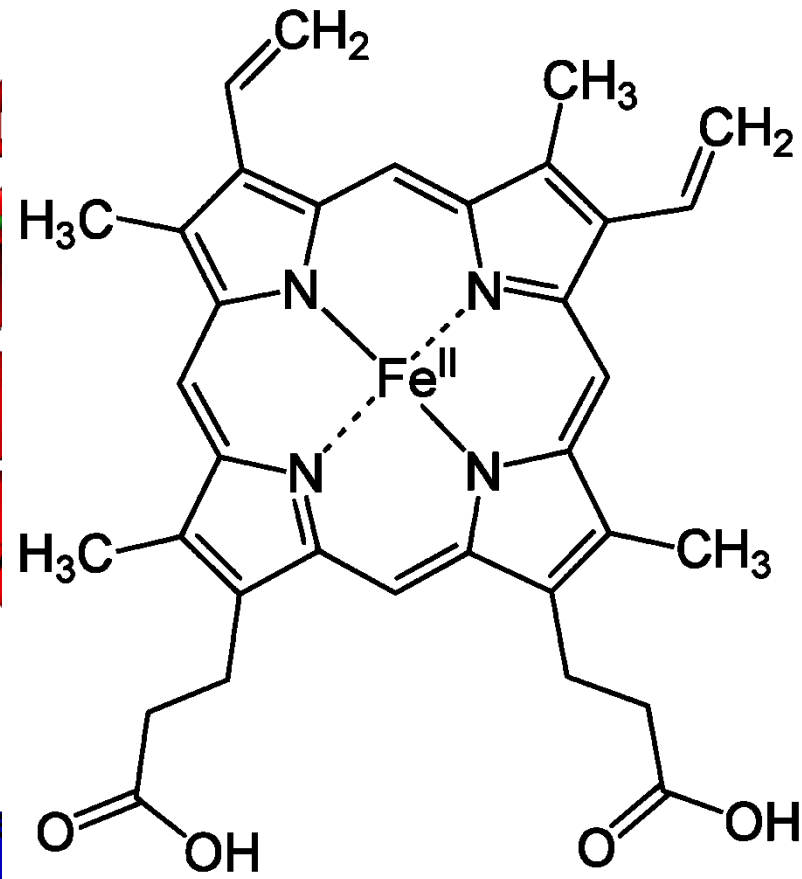


Krevní barviva

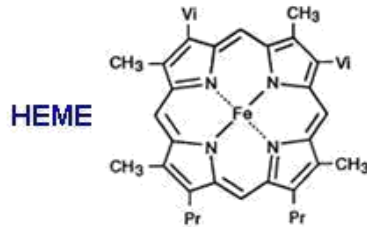
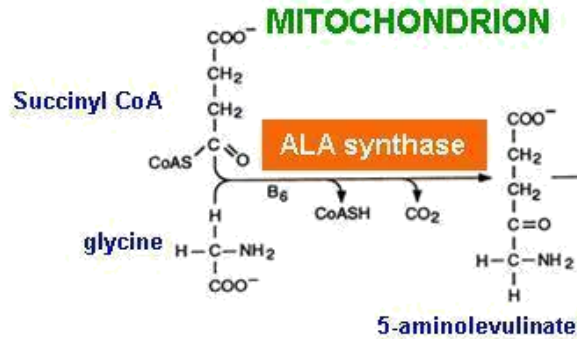
Jana Tomanová

Porfyriny

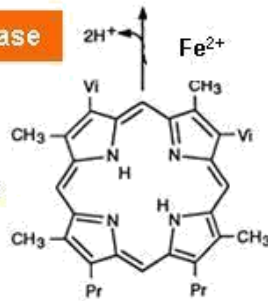
- prekurzory hemu
- tetrapyrrolové jádro (porfín)
- substituenty (methyl, vinyl, acetyl, propiony)
- metaloporfyriny (Fe, Mg, Co, Pb)
- Podle počtu karboxylových skupin rozlišují
okta (8, uroporfyrin), hepta (7), hexa (6), penta
(5) tetra (4, koproporfyrin) porfyrin



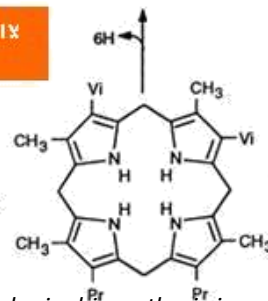
Porfyrin – biosyntéza



Ferrochelatase



Proto'gen IX oxidase



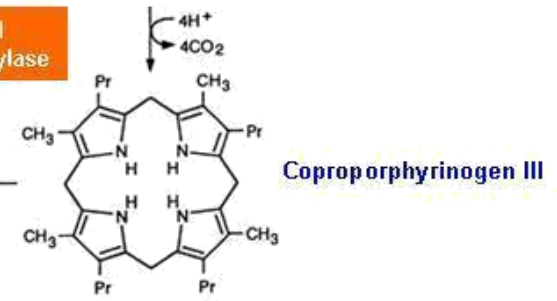
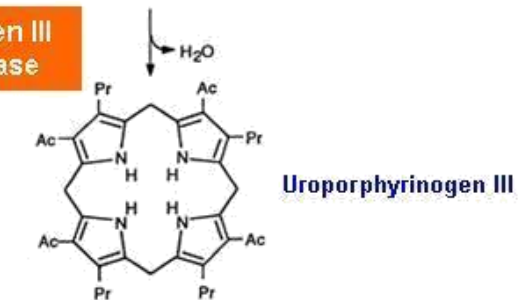
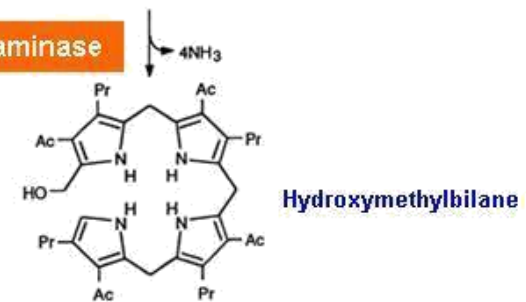
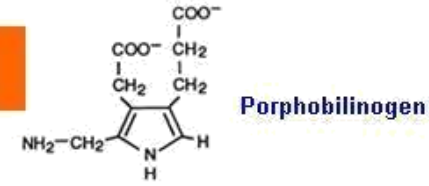
CYTOSOL

ALA dehydratase

PBG deaminase

Uro'gen III synthase

Uro'gen III decarboxylase



Poruchy metabolismu porfyrinů - Porfyrie

- Dědičná, metabolická porucha
- porucha funkce kteréhokoliv enzymu syntézy porfyrinů za stupněm ALA a následně hromadění daných metabolitů v některých tkáních
 - ⇒ ↑ hladina v plasmě a erytrocytech, ↑ vylučování stolicí a močí.
- **Klinické projevy porfyrií**
 - neurologické* - křeče a svalové slabosti, které mohou vést k částečné obrně (paréze) až ochrnutí (plegie), zejména rukou
 - kožní* - vysoká zranitelnost kůže, spontánní tvorba puchýřků, hyperpigmentace a ochlupení v obličeji
 - abdominální* - nevolnost, zvracení, zácpa, kolika
 - psychické* - zmatenost, deprese, úzkost, zapomínání, halucinace
 - ostatní* - anémie, červené zbarvení zubů (Günther), zvětšení sleziny, červené zbarvení moče, které stáhním tmavne

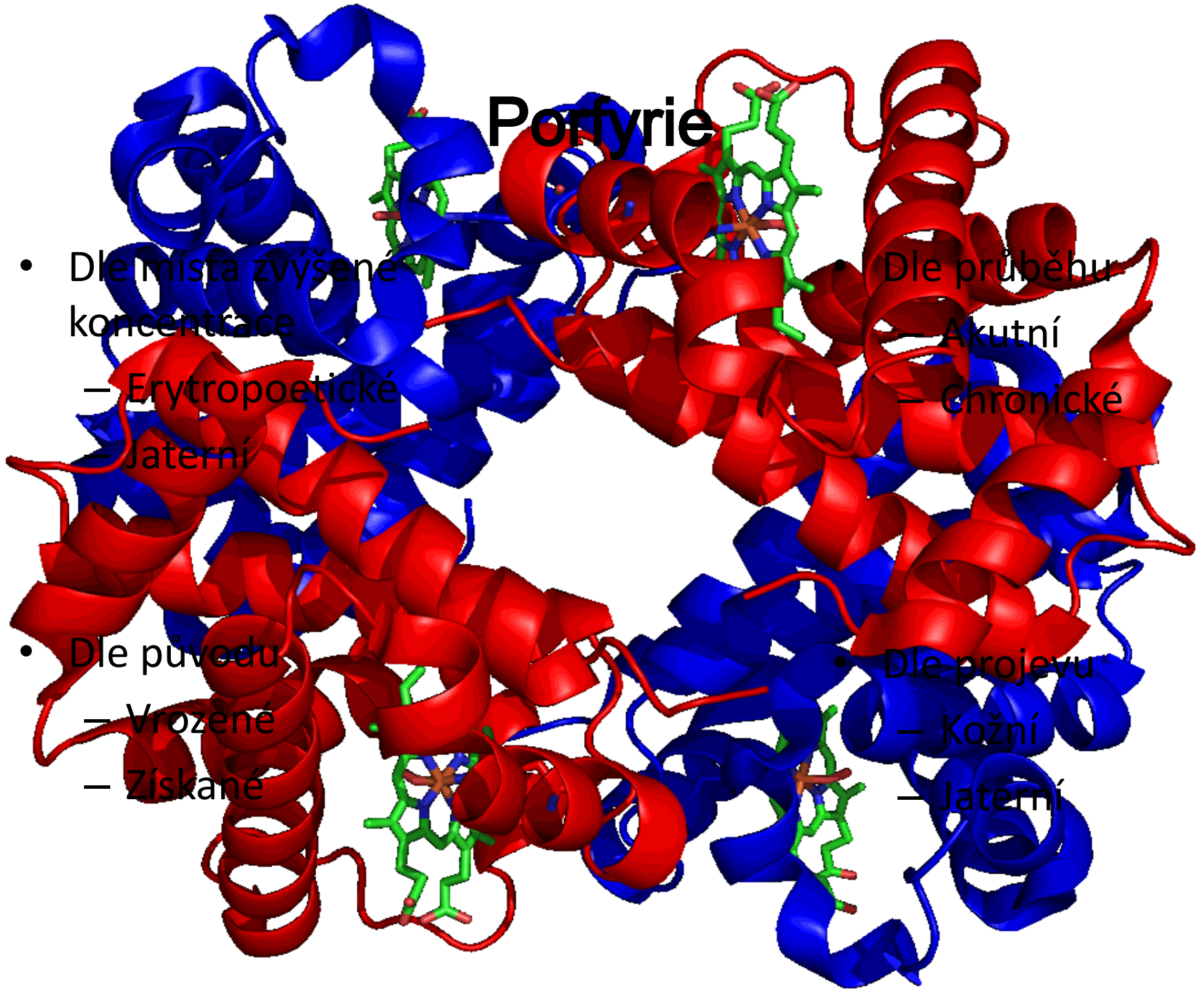
Porfyrie

- Dle místa zvýšené koncentrace
 - Erytropoetické
 - Jaterní

- Dle původu
 - Vrozené
 - Získané

- Dle průběhu
 - Akutní
 - Chronické

- Dle projevu
 - Kožní
 - Jaterní



Poruchy metabolismu porfyrinů - Porfyrie

▪ Klinické projevy porfyrií

Pozdní kožní porfyrie (PCT)

- vysoká zranitelnost kůže, spontánní tvorba puchýřům hyperpigmentace
- klinická manifestace často iniciována současným jaterním postižením (nadměrná konzumace alkoholu, hepatitída C, vzácně estrogeny)
- neléčená může vést ke vzniku karcinomu jater

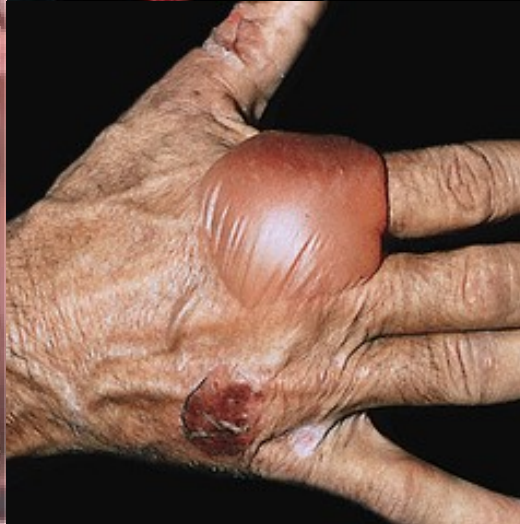
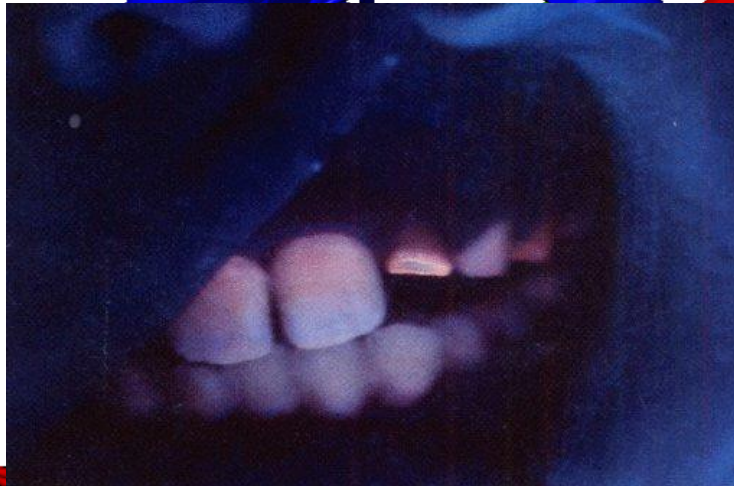
Akutní ataky (AIP) – křečovité až agonizující bolesti břicha

- další příznaky: např. tachykardie, zvracehí, křeče

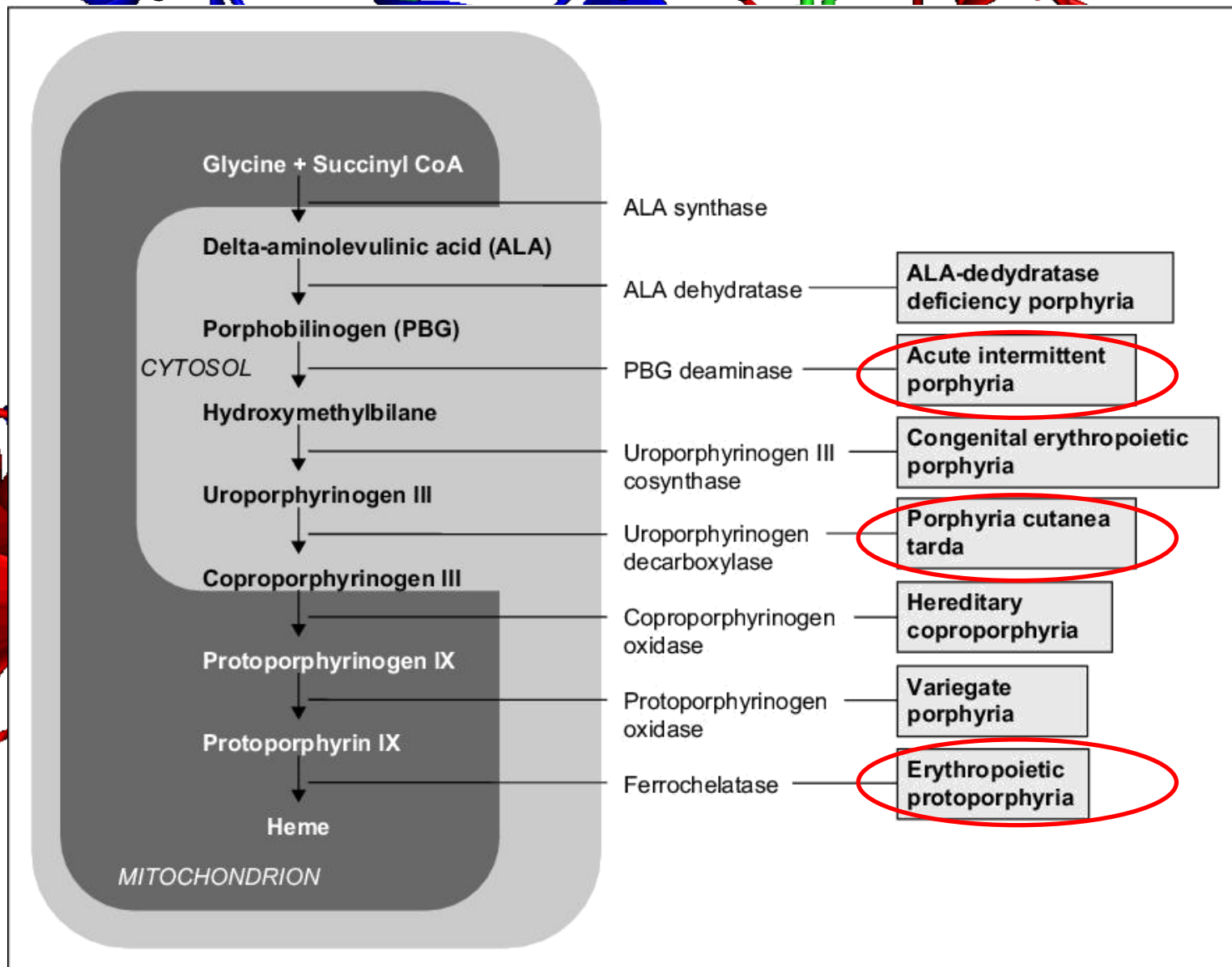
Pozn! Důležitá prevence – akutní ataka často vyvolaná použitím léků. kt. nemocní nesmějí dostat

- nutné, aby co neširší okruh členů rodiny věděl, zda porfyrii trpí či nikoli
- pokud je ale jedinec nositel genů, ale neprodělal klinický záchvat, je dg. na základě fluorescenčních a fotometrických metod obtížná
- > zjišťování genové mutace

Porfyrje



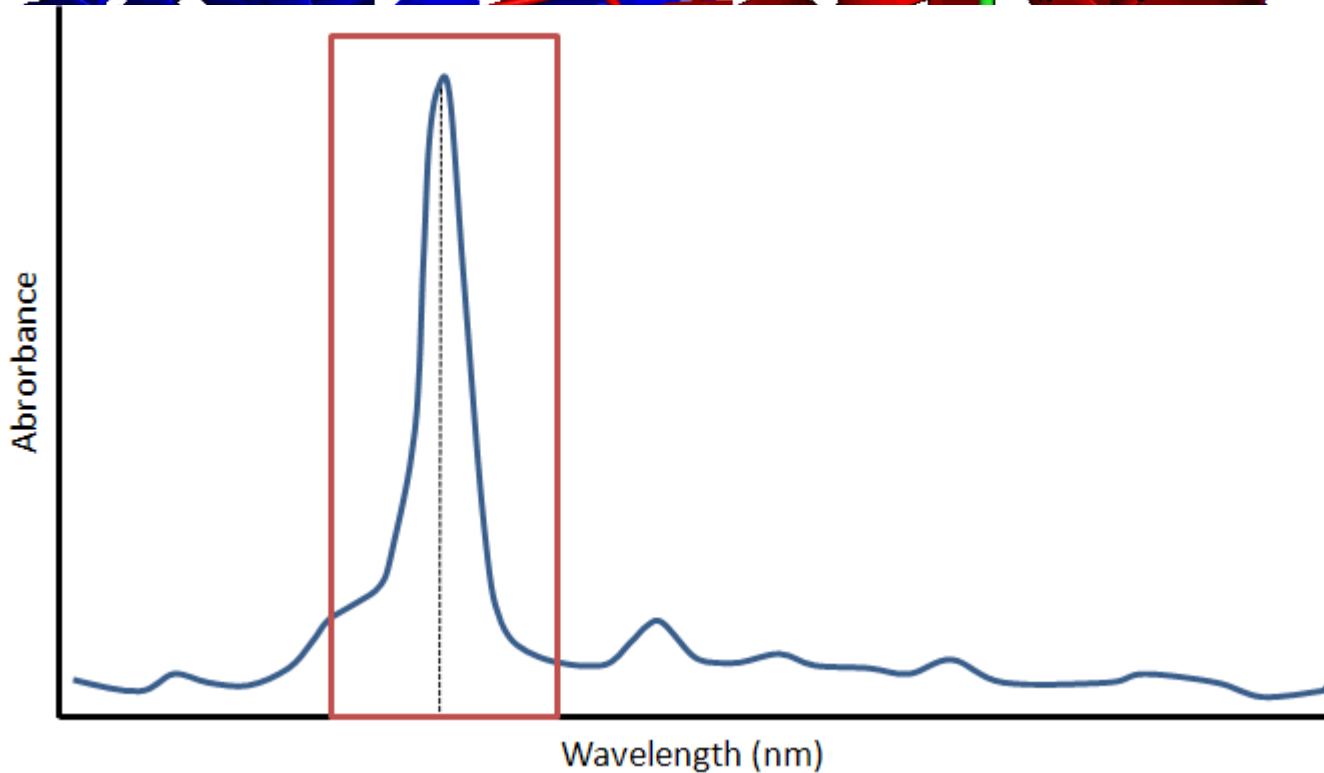
Poruchy metabolismu porfyrinů



Typ porfyrie	Enzym	Hlavní příznaky	moč	stolice	Laboratorní nálezy	krvinky
<i>Z deficitu ALA dehydratasy</i>	ALA dehydratasa	Abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA ↑KOPRO	-		↑PROTO
<i>Akutní intermitentní (hepatální)</i>	Porfobilinogen deaminasa	abdominální bolest, zácpa, zvracení, hypertenze a psychické problémy (hysterie), bolesti hlavy	↑ALA, ↑PGB, ↑URO	-		-
<i>Kongenitální erythropoetická</i>	Uroporphyrinogen III kosynthetasa	fotosenzitivita	↑URO, ↑KOPRO	↑KOPRO		↑URO, ↑KOPRO
<i>Porphyria cutanea tarda (hepatální)</i>	Uroporphyrinogen dekarboxylasa	fotosenzitivita	↑URO, ↑HEPTA	↑KOPRO		-
<i>Hereditární koproporfyrie (hepatální)</i>	Koproporphyrinogen oxidasa	fotosenzitivita, abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA, ↑PGB, ↑KOPRO	↑KOPRO		-
<i>Porphyria variegata (hepatální)</i>	Protoporphyrinogen oxidasa	fotosenzitivita, abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA, ↑PGB, ↑KOPRO	↑PROTO, ↑KOPRO		-
<i>Protoporphyria (erytrohepatální)</i>	ferrochelataasa	fotosenzitivita	-	↑PROTO		↑PROTO

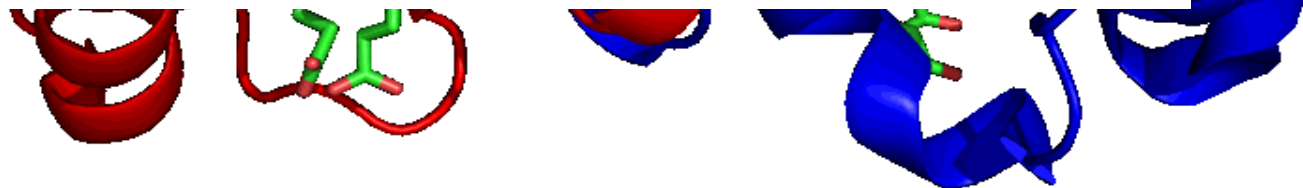
Stanovení celkových porfyrinů

- Charakteristické absorpční spektrum – Soretův pás, s maximem okolo 400 nm
- Spektrofotometrická křivka v oblasti 350 – 450 nm (při vyšším obsahu URO po



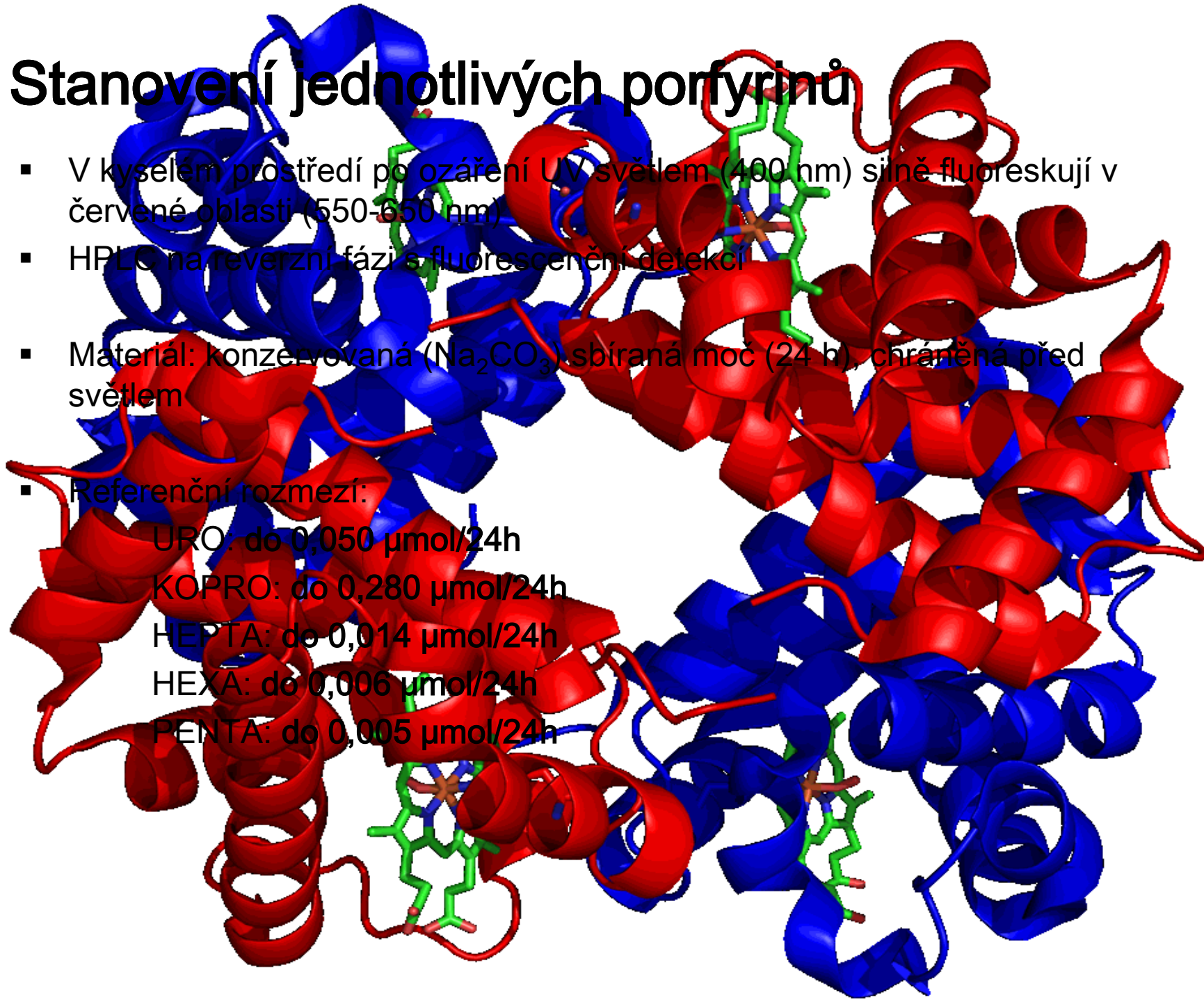
- M
- R
- V
- p
- v
- M

četlem
jednotlivých
e i enzymů
ci plazmě

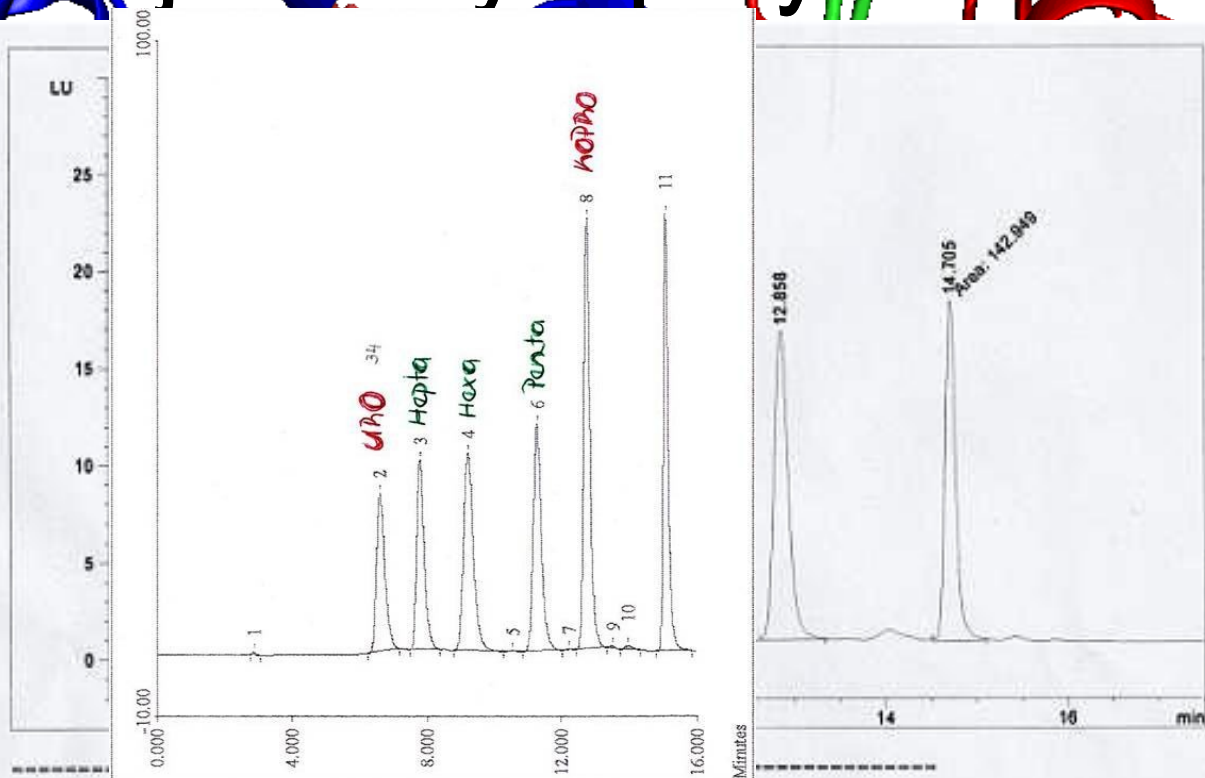


Stanovení jednotlivých porfyrinů

- 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 $\mu\text{mol}/24\text{h}$



Stanovení jednotlivých porfyrinů



External Standards Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 8.10.2015 10:34:37
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=390, Em=625

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area %	Amount [umol/l]	Grp	Name
7.810	BB	102.80725	1.94539e-3	2.00000e-1		URO
9.109	BB	113.63637	1.76000e-3	2.00000e-1		HEPTA
10.397	BB	145.63976	1.37325e-3	2.00000e-1		HEXA
11.652	BB	147.33250	1.35747e-3	2.00000e-1		PENTA
12.850	BB	172.64391	1.15845e-3	2.00000e-1		KOPRO

Totals : 1.00000

J.

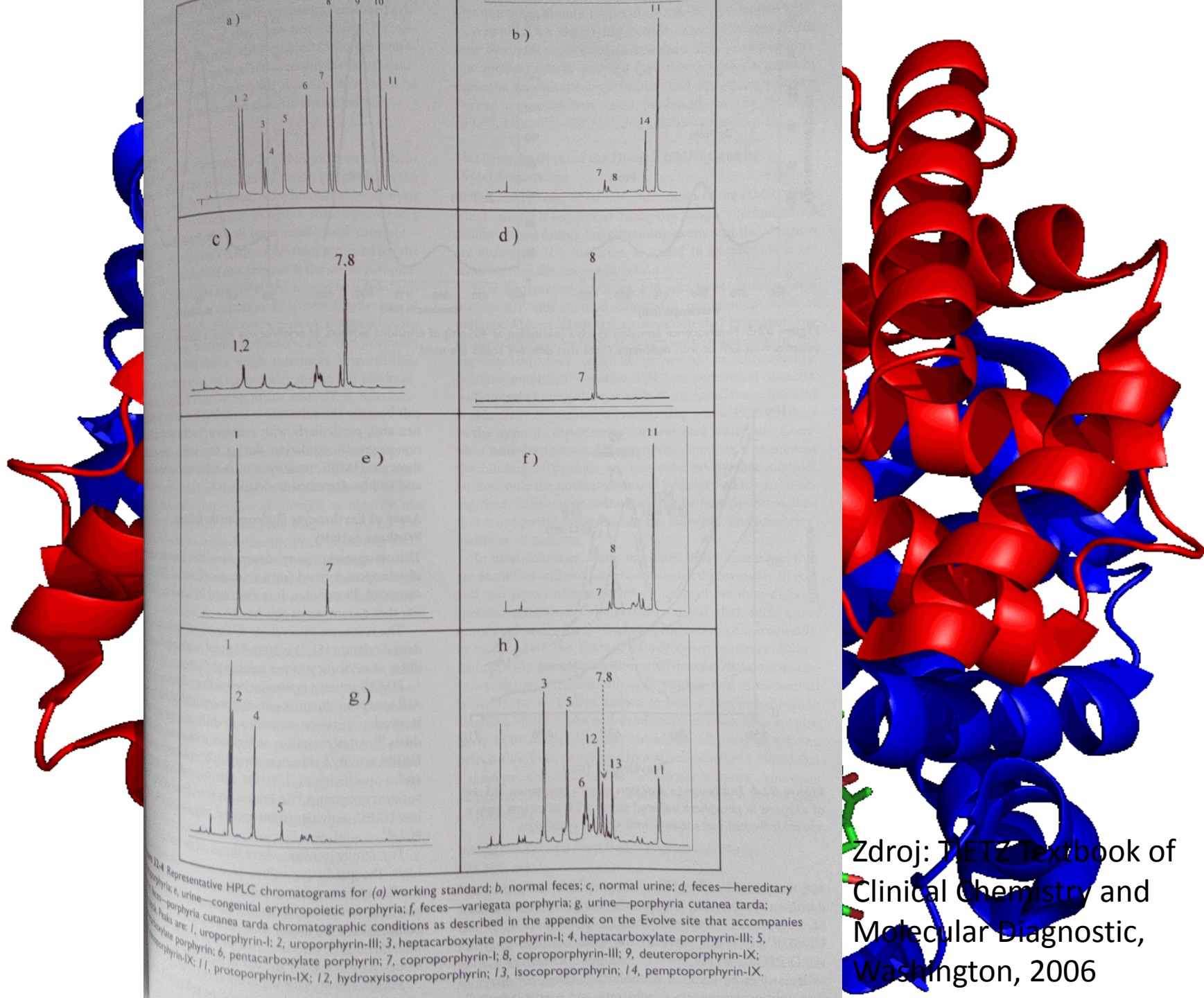


Fig. 21.4 Representative HPLC chromatograms for (a) working standard; b, normal feces; c, normal urine; d, feces—hereditary erythropoietic porphyria; e, urine—congenital erythropoietic porphyria; f, feces—variegata porphyria; g, urine—porphyria cutanea tarda; h, urine—porphyria cutanea tarda chromatographic conditions as described in the appendix on the Evolve site that accompanies this text. Peaks are: 1, uroporphyrin-I; 2, uroporphyrin-III; 3, heptacarboxylate porphyrin-I; 4, heptacarboxylate porphyrin-III; 5, coproporphyrin-I; 6, pentacarboxylate porphyrin; 7, coproporphyrin-I; 8, coproporphyrin-III; 9, deuteroporphyrin-IX; 10, protoporphyrin-IX; 11, protoporphyrin-IX; 12, hydroxylisocoporphyrin; 13, isocoporphyrin; 14, pemptoporphyrin-IX.

Zdroj: TETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic, Washington, 2006

Stanovení prekursorů porfyrinů

A 3D ribbon diagram of a protein structure, likely a heme biosynthetic enzyme. The protein is composed of several alpha-helices, some colored in blue and others in red. Two heme precursors are shown as green stick models, one bound to the protein and another nearby. The background is white.

Stanovení porfobilinogenu (PBG) v moči - spektrofotometricky:

- Reakce porfobilinogenu v kyselém prostředí s p-dimethylaminobenzaldehydem
- Vznik červeného kondenzačního produktu
- Referenční rozmezí: do 36 $\mu\text{mol/l}$

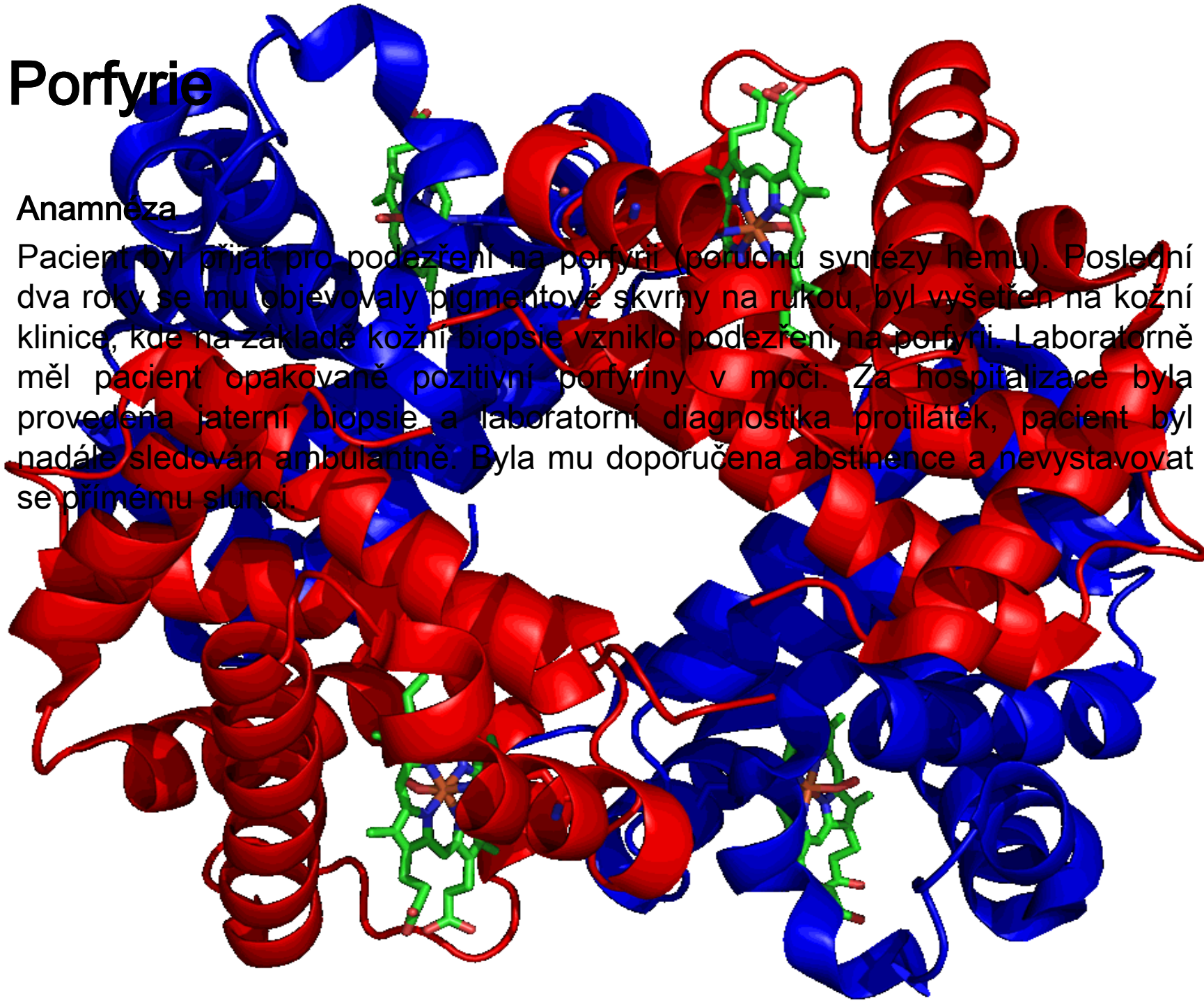
Stanovení 5-aminolevulátu v moči - HPLC:

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

Porfyrie

Anamnéza

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 porfyryny 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.

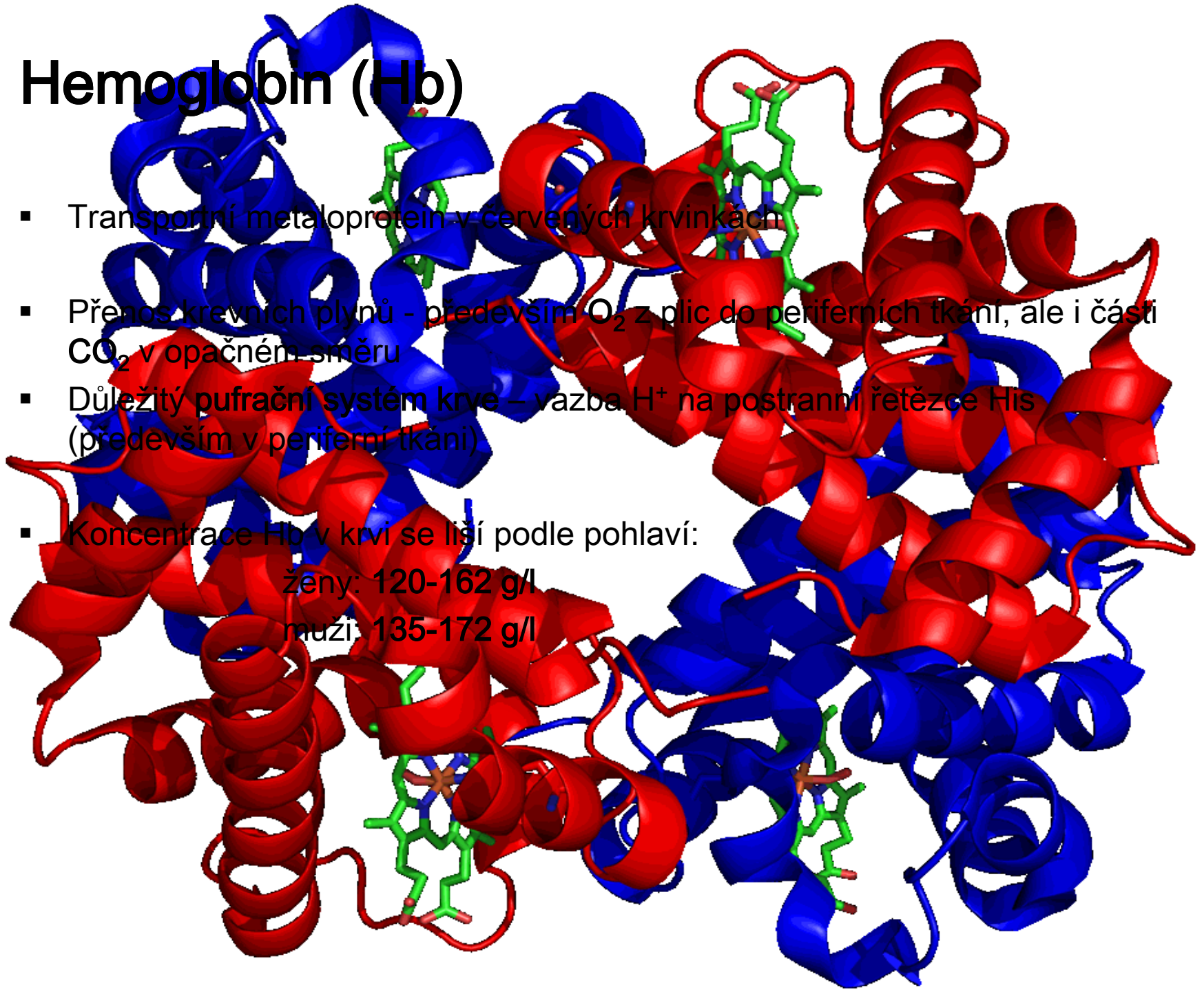


Porfyrie

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
BiIT	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-Koproporfyryn	0,230	0,290	0,105	0,108	0,200	(0-0,280 µmol/24h)	SI
dU-Uroporfyryn	4,230	6,860	1,770	0,016	0,030	(0-0,050 µmol/24h)	SI
dU-Pentaporfyryn	0,120	0,150	0,057			(0-0,005 µmol/24h)	SI
dU-Hexaporfyryn	0,070	0,090	0,058			(0-0,006 µmol/24h)	SI
dU-Heptaporfyryn	0,700	1,060	0,562			(0-0,014 µmol/24h)	SI
U-Porfobilinogen			26,670			(0,04-36,00 µmol/l)	SI

Hemoglobin (Hb)

- Transportní metaloprotein v červených krvinkách
- Přenos krevních plynů - především O_2 z plic do periferních tkání, ale i části CO_2 v opačném směru
- Důležitý pufrací 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 (Hb)

- Tetramer – podjednotky spojeny H-m
- Každá podjednotka složena z proteinu – hemu s centrálním kationtem Fe^{2+} (vazbami)
- několik typů molekul Hb – rozlišujeme a ζ :

Adultní Hb:

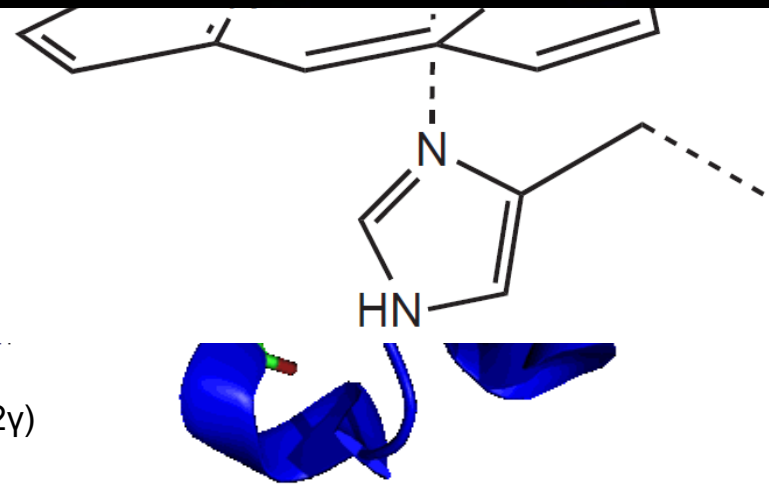
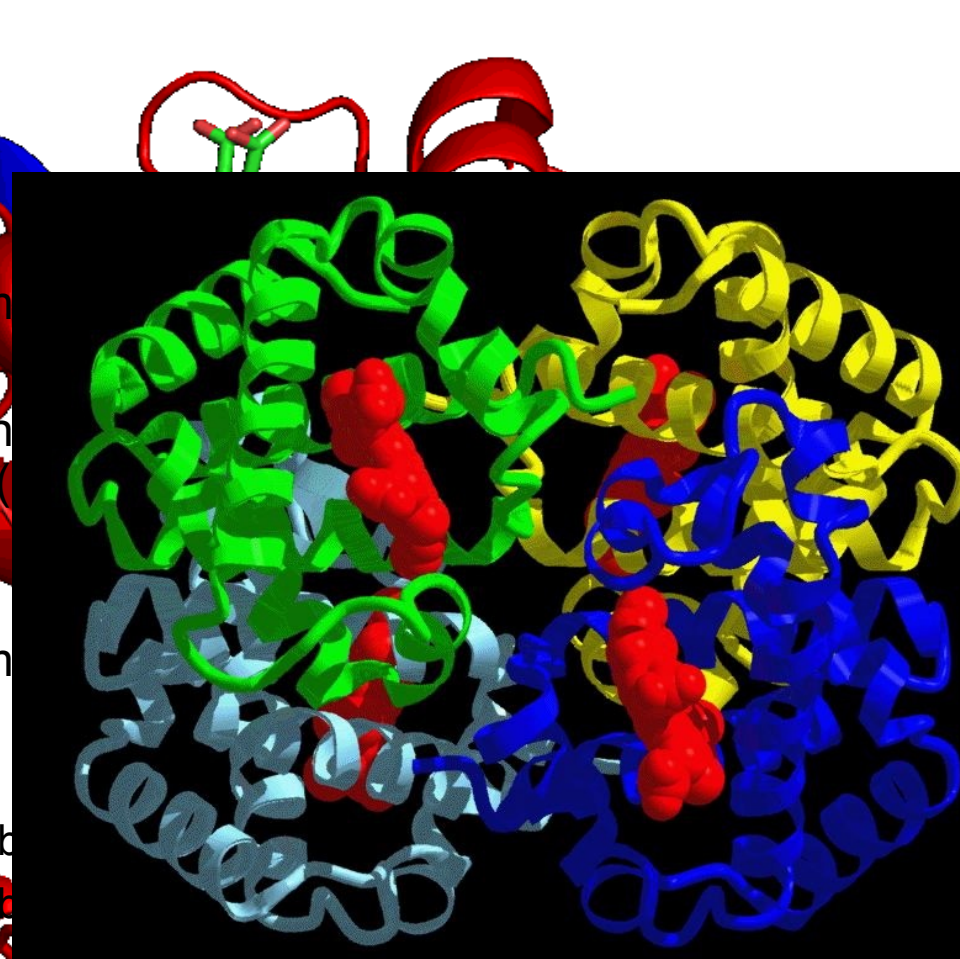
- *Hb A1 (2 α 2 β)*: majoritní forma Hb
 - *Hb A2 (2 α 2 δ)*: minoritní forma Hb
- celkového HbA

Fetální Hb:

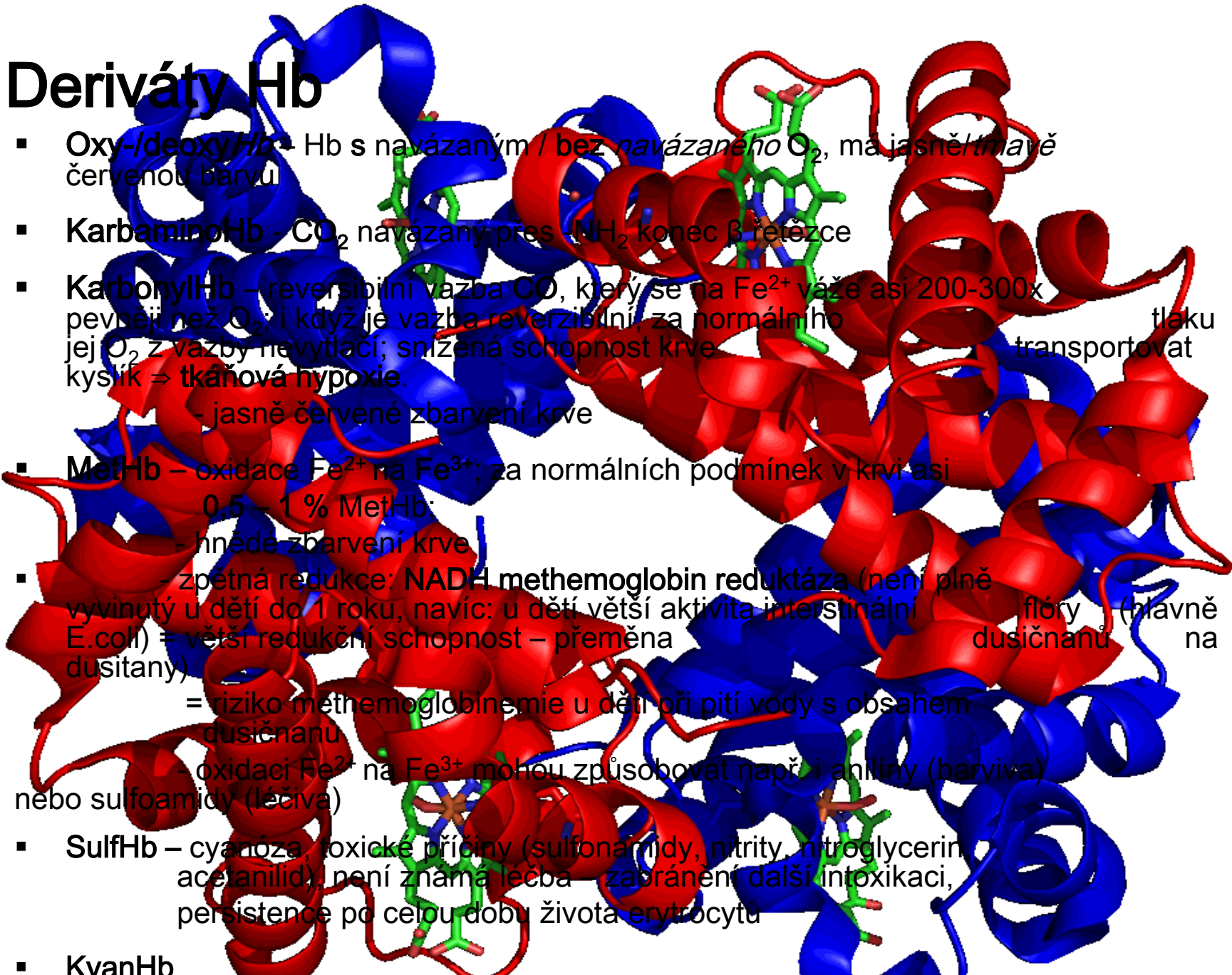
- *Hb F (2 α 2 γ)*: tvořen u plodu, po narození nahrazován Hb A; u novorozenců až 70% celkové Hb

Embryonální Hb

- tvořen u embryí buňkami krevních ostrůvků v vývoje, později je nahrazen Hb F
- Gower I (2 ζ 2 ϵ), Gower II (2 α 2 ϵ), Portland (2 ζ 2 γ)

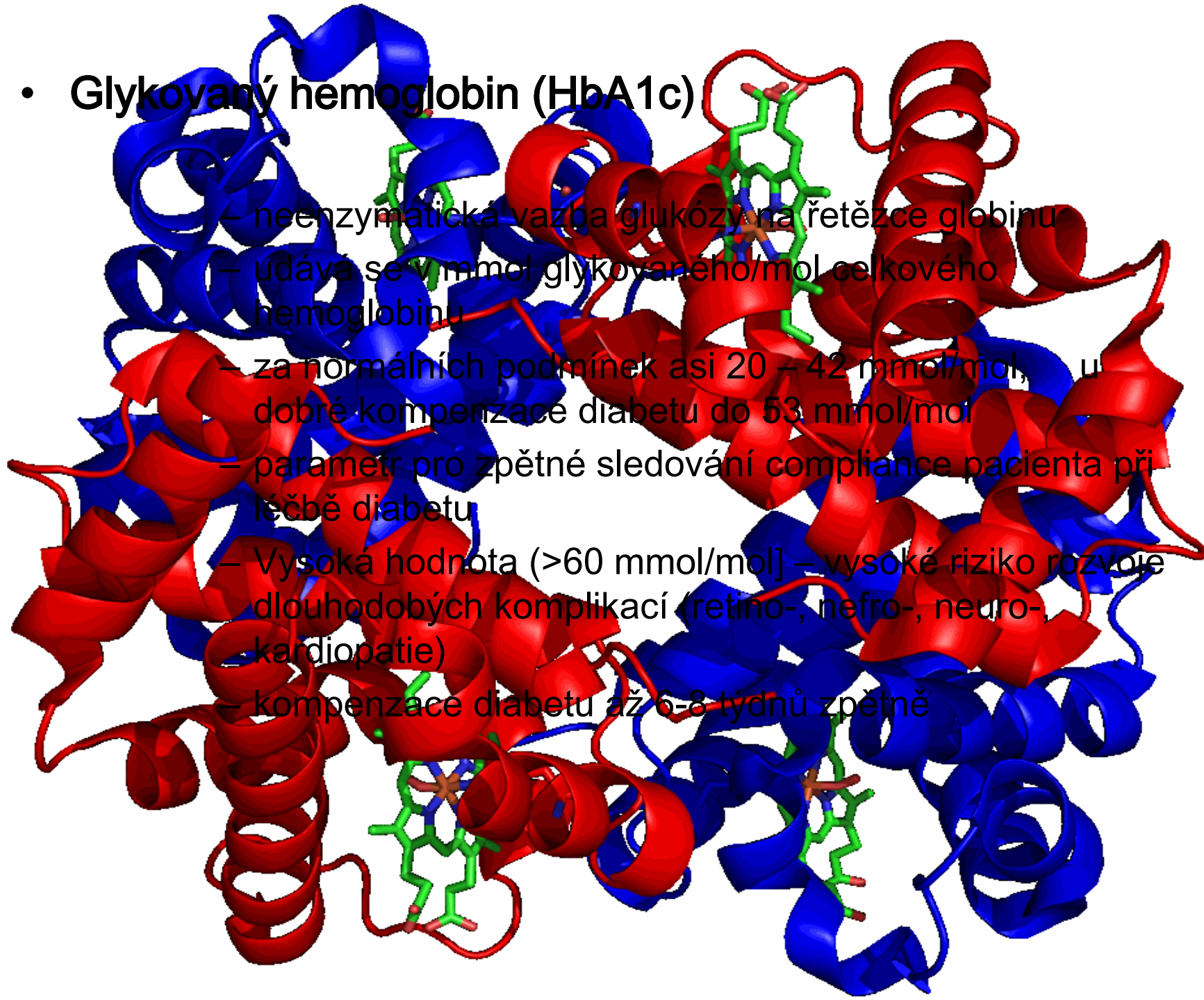


Deriváty Hb

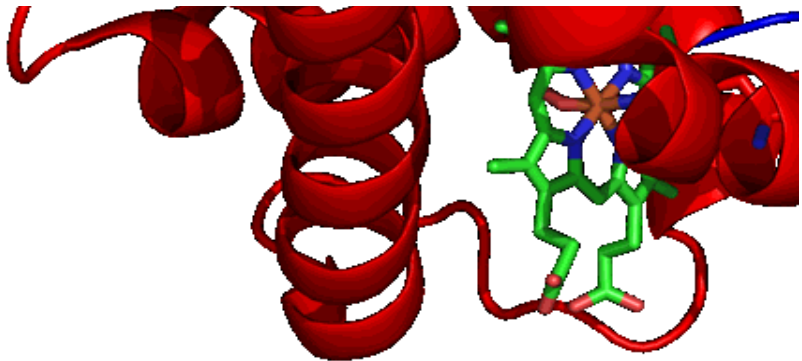
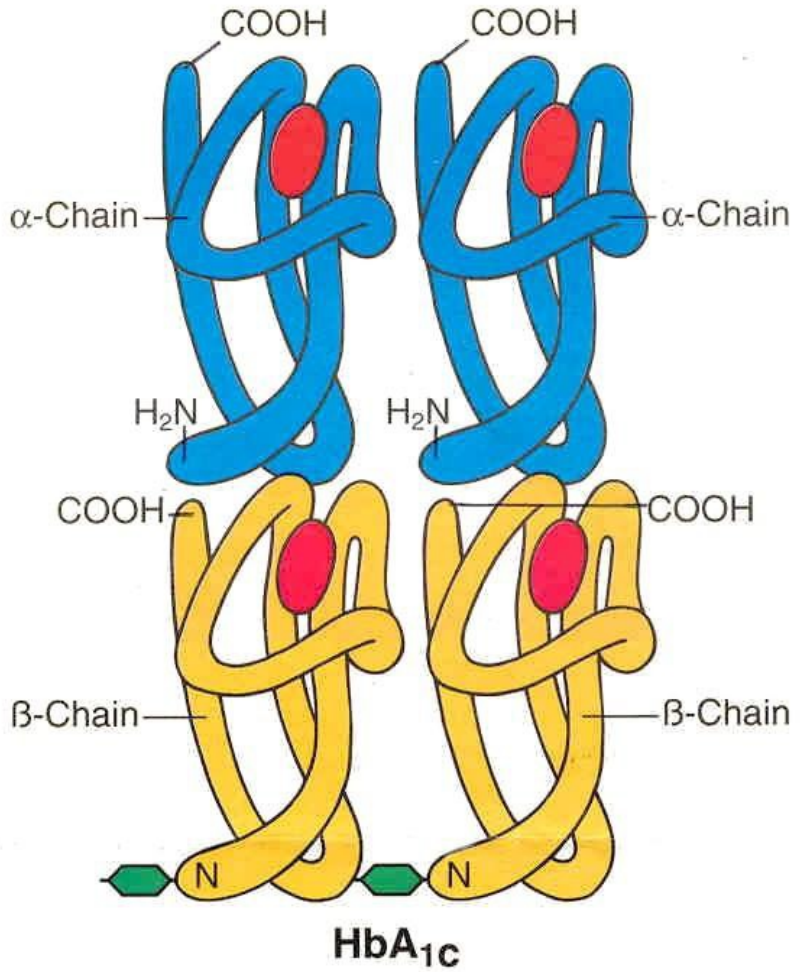
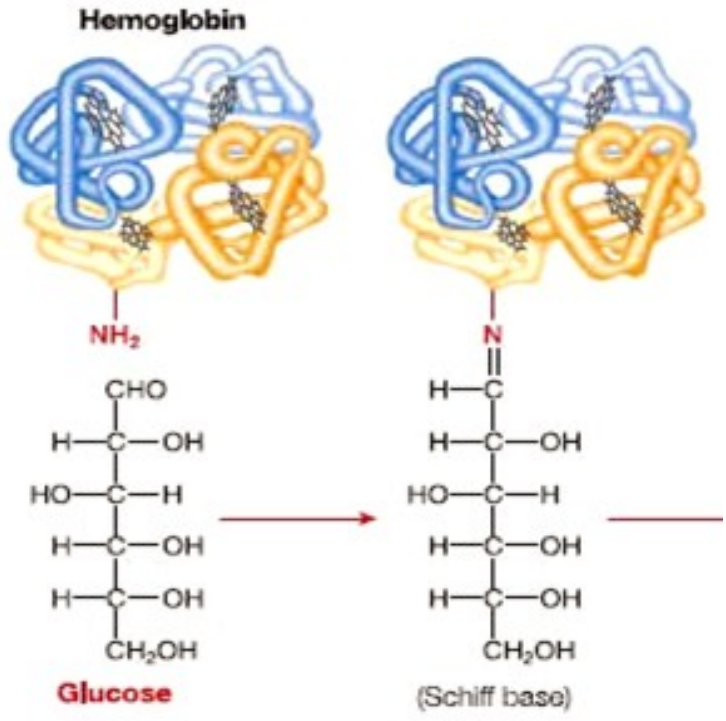
- **Oxy-/deoxyHb** – Hb s navázaným / bez navázaného O_2 , má jasně/tmavě červenou barvu
 - **KarbaminoHb** – CO_2 navázaný přes $-NH_2$ konec β řetězce
 - **KarbonylHb** – reversibilní vazba CO, který se na Fe^{2+} váže asi 200-300x pevněji než O_2 ; i když je vazba reverzibilní, za normálního tlaku jej O_2 z vazby nevytláčí; snížená schopnost krve transportovat kyslík \Rightarrow tkáňová hypoxie.
 - jasně červené zbarvení krve
 - **MetHb** – oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} ; za normálních podmínek v krvi asi 0,5 – 1 % MetHb;
 - hnědé zbarvení krve
 - – zpětná redukce: NADH methemoglobin reduktáza (není plně vyvinutý u dětí do 1 roku, navíc: u dětí větší aktivita interstiniální flóry (hlavně E.coli) \Rightarrow větší redukční schopnost – přeměna dusičnanů na dusitany)
 - = riziko methemoglobinemie u dětí při pití vody s obsahem dusičnanů
 - oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} mohou způsobovat např. i anilíny (barviva) nebo sulfoamidy (léčiva)
 - **SulfHb** – cianoza, toxické příčiny (sulfonamidy, nitrity, nitroglycerin, acetanilid); není známa léčba – zabránění další intoxikaci, persistence po celou dobu života erytrocytu
 - **KyanHb**
- 

- **Glykovaný hemoglobin (HbA1c)**

- neenzymatická vazba glukózy na řetězce globinu
- udává se v mmol glykovaného/mol celkového hemoglobinu
- za normálních podmínek asi 20 – 42 mmol/mol, u dobré kompenzace diabetu do 53 mmol/mol
- parametr pro zpětné sledování compliance pacienta při léčbě diabetu
- Vysoká hodnota (>60 mmol/mol] – vysoké riziko rozvoje dlouhodobých komplikací (retino-, nefro-, neuro-, kardiopatie)
- kompenzace diabetu až 6-8 týdnů zpětně

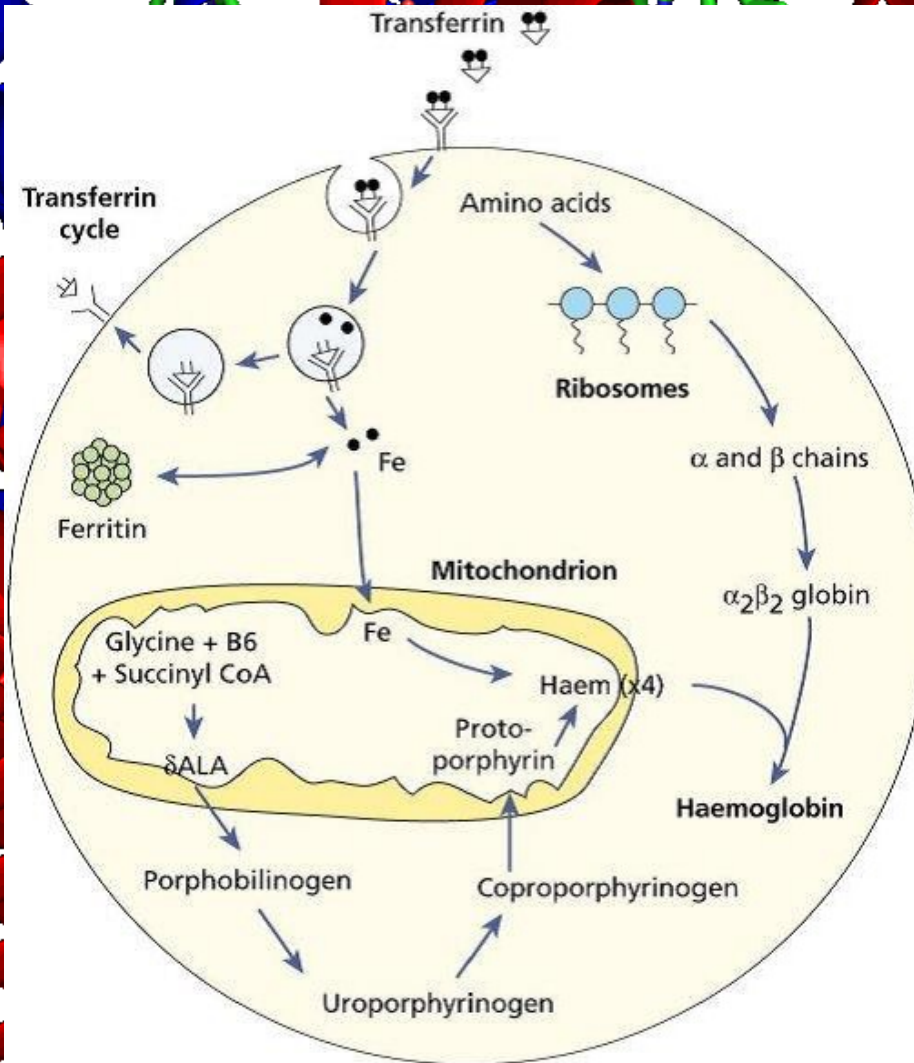


- Glykovaný hemoglobin (HbA1c)



Syntéza Hb

- v kostní dřeni a erytroblastech (nikoliv v erythrocytech!)



Poruchy tvorby Hb

- Poruchy syntézy hemu

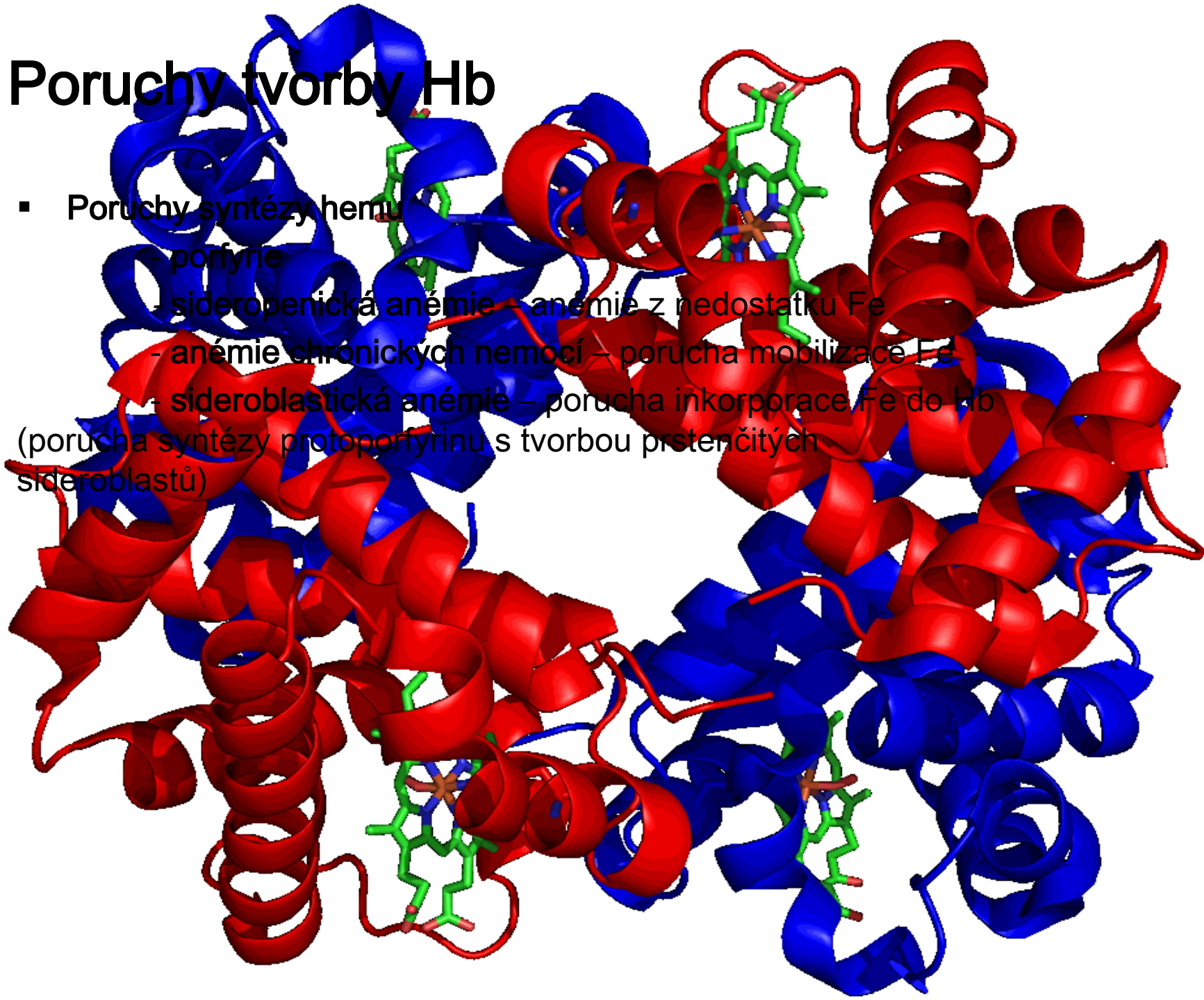
- porfýrie

- sideropenická anémie – anémie z nedostatku Fe

- anémie chronických nemocí – porucha mobilizace Fe

- sideroblastická anémie – porucha inkorporace Fe do Hb

(porucha syntézy protoporfyrinu s tvorbou prstenčitých sideroblastů)



Poruchy tvorby Hb

- Poruchy syntézy globinu

- **talasémie** – geneticky podmíněná snížená nebo chybějící syntéza některého z globinových řetězců

- **Beta-talasémie** – omezená produkce β-řetězců, kompenzace syntézou HbA₂, HbF, (fragilnější Ery, porucha zabudovávání Fe)

- **hemoglobinopatie** – vrozené defekty genu tvořícího řetězce globinu

- záměna aminokyselin a následná syntéza patologicky změněné molekuly Hb (varianty hemoglobinu); nejznámější:

- **Hemoglobinopatie S** (Srpkovitá anémie, Glutamin β6 → Val)

- hemolytické projevy, zkrácené přežívání drepanocytů, ztráta negativního náboje Hb

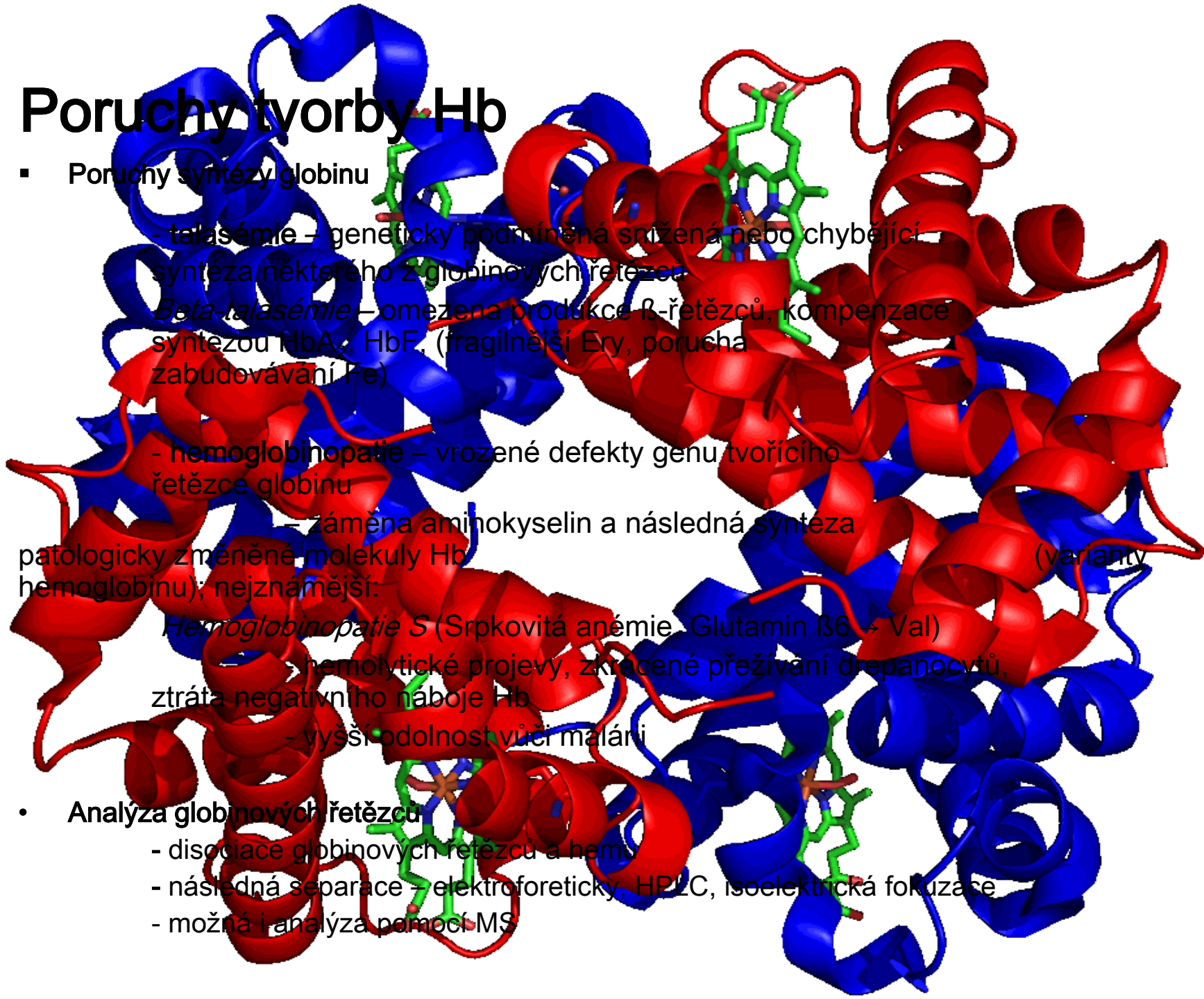
- vyšší odolnost vůči malárii

- **Analýza globinových řetězců**

- disociace globinových řetězců a hemu

- následná separace - elektroforeticky, HPLC, isoelektrická fokuzace

- možná i analýza pomocí MS



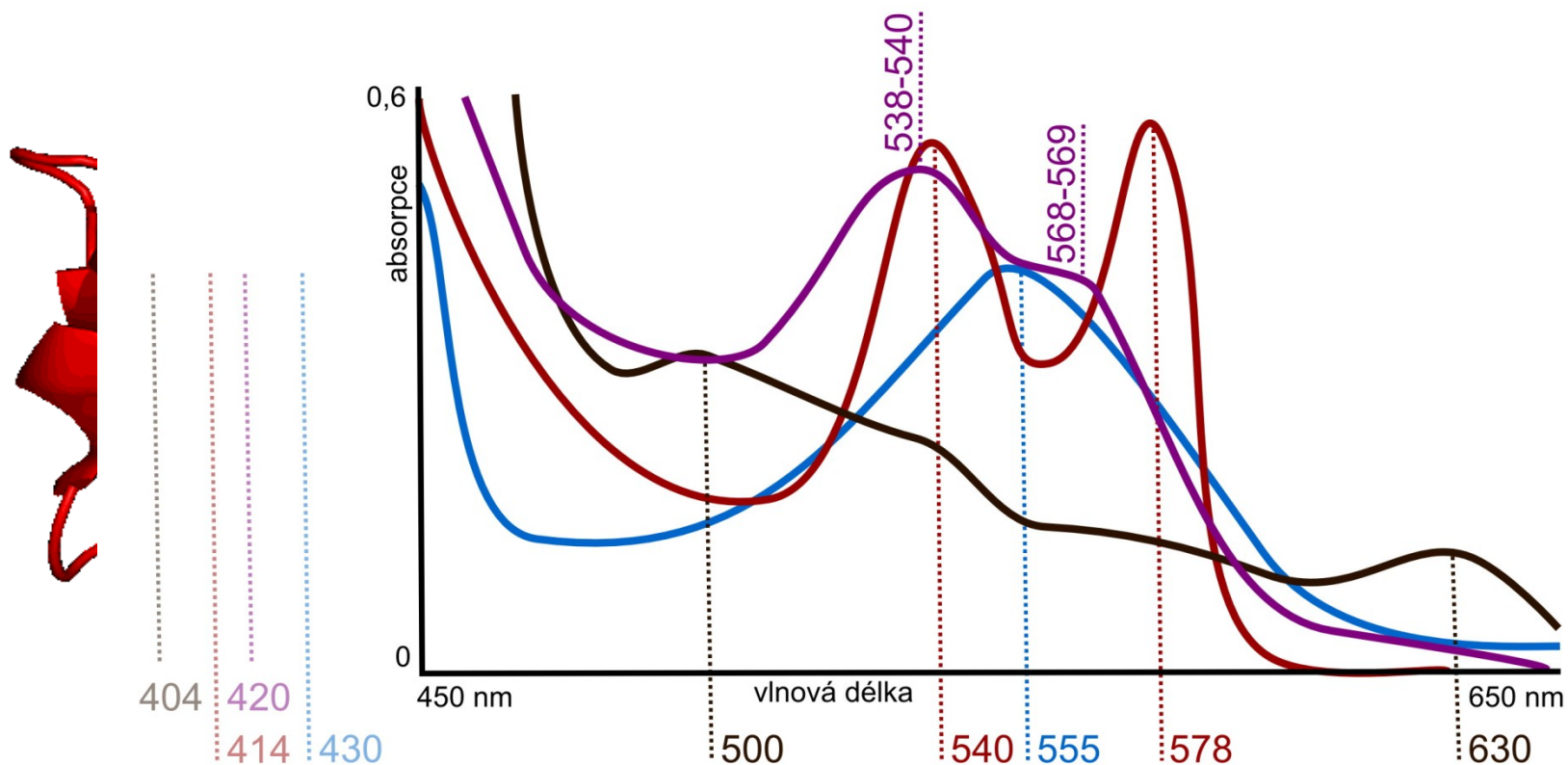
Stanovení Hb a jeho derivátů

- Spektrofotometrické měření – tHb i jeho deriváty mají charakteristická absorpční spektra ve viditelné oblasti záření

⇒ typická výrazná absorpční maxima v oblasti 400–430 nm

(Soretův pás), další absorpční vrcholy jsou podstatně nižší

oxyhemoglobin deoxyhemoglobin (redukováný Hb) methemoglobin karbonylhemoglobin



Stanovení Hb a jeho derivátů

▪ Stanovení Hb v plné krvi

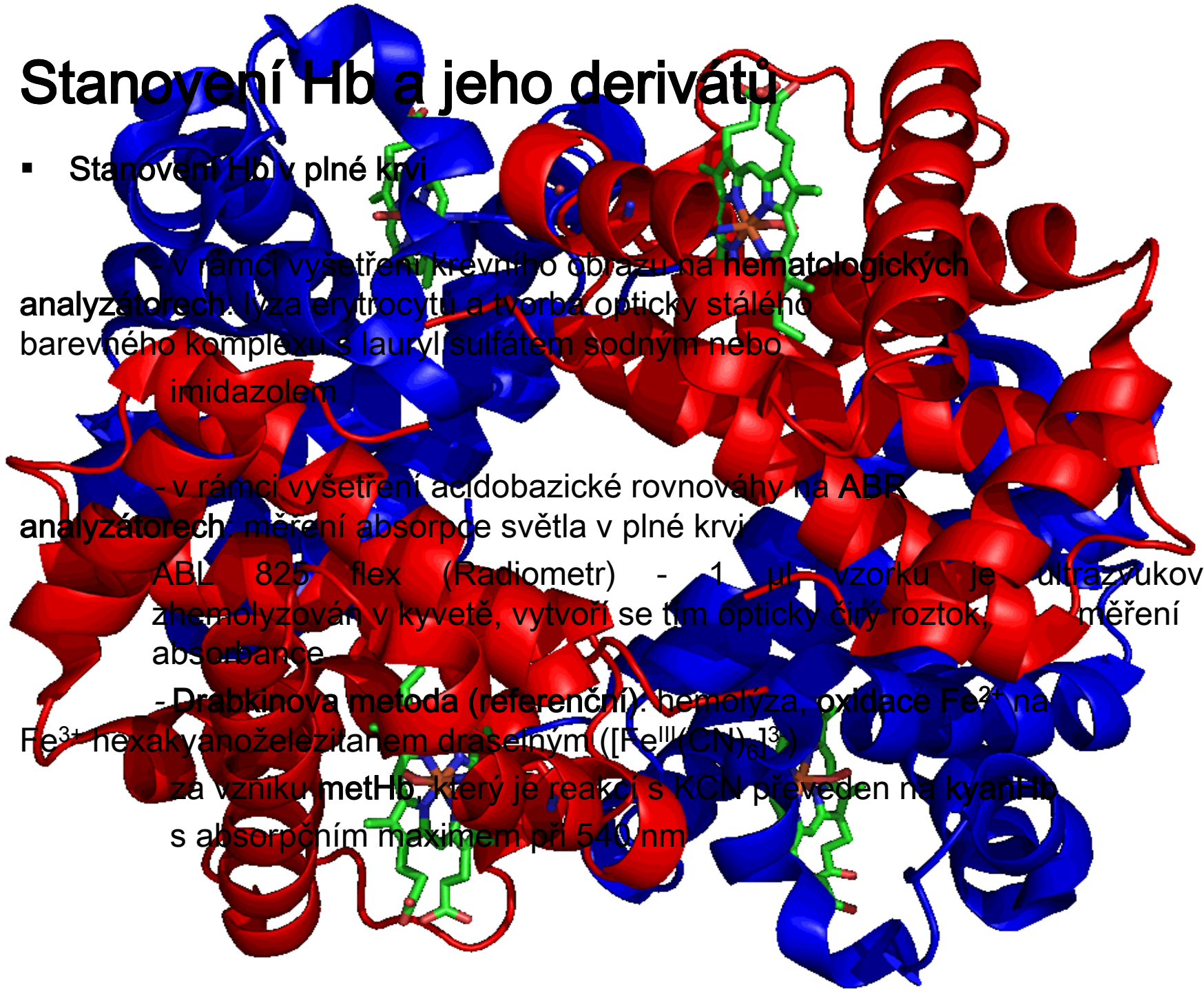
- v rámci vyšetření krevního obrazu na hematologických analyzátoch: lyza erytrocytů a tvorba opticky stálého barevného komplexu s lauryl sulfátem sodným nebo imidazolem

- 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, měření absorbance

- Drabkinova metoda (referenční): hemolyza, oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} hexakynoželezitanem draselným ($[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$)

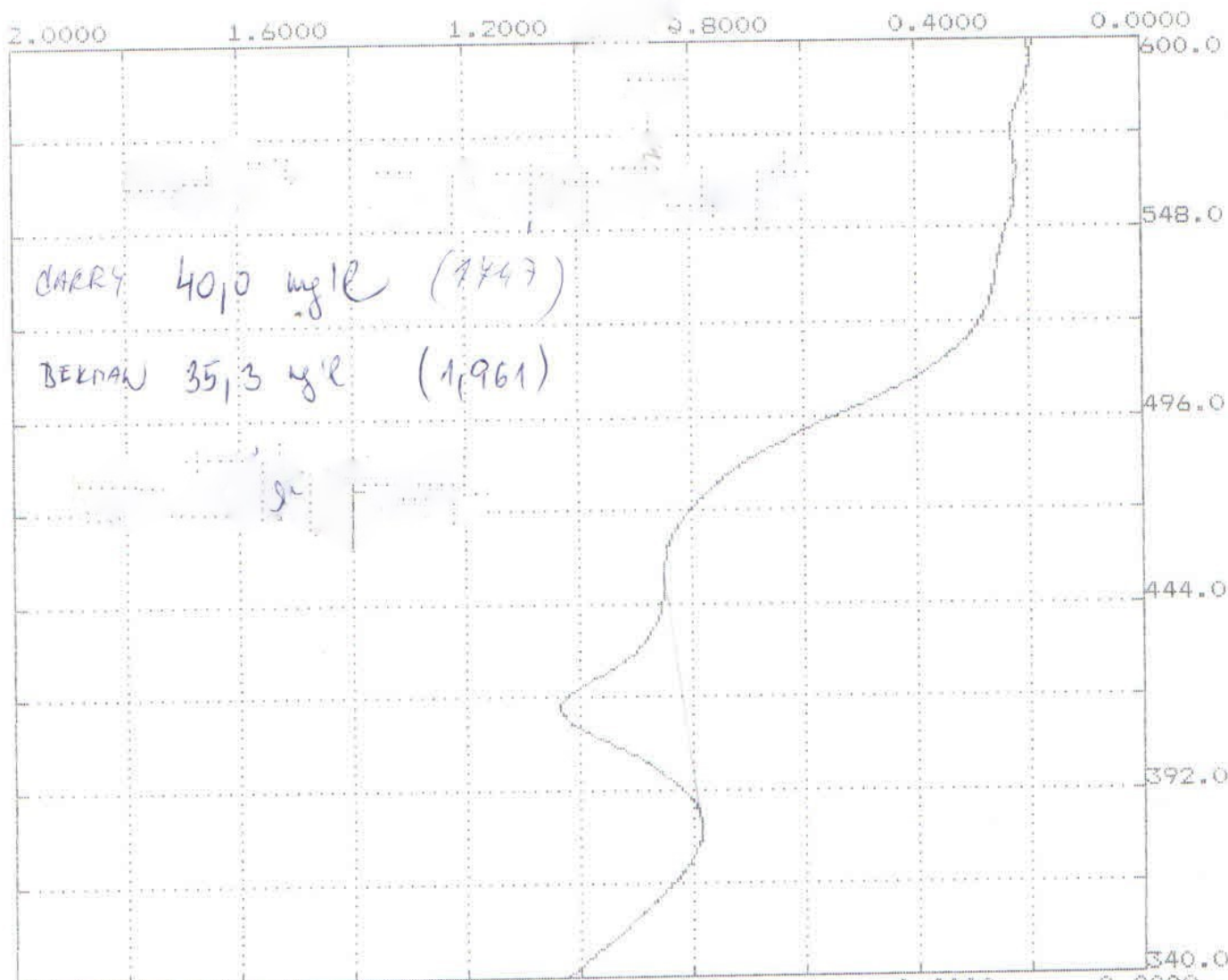
za vzniku methHb, který je reakcí s KCN převeden na kyanHb s absorpčním maximem při 540 nm





BECKMAN
DU-65 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



CARRY 40,0 mg/l (1,847)

BERMAN 35,3 mg/l (1,961)

W
A
V
E
L
E
N
G
T
H

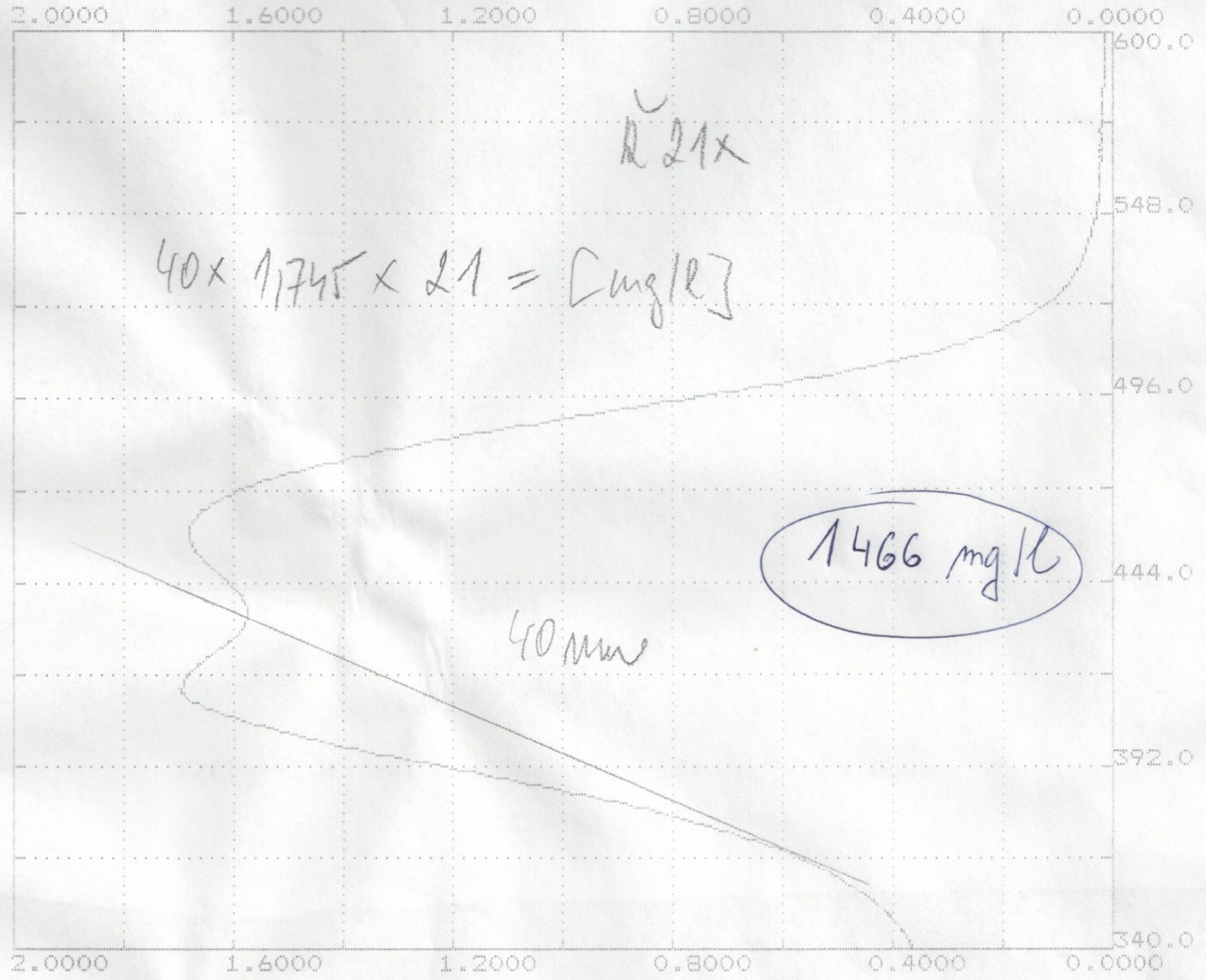
I
N

M
μ

0,

Vo

S
B
B
S
S
S
fH



Scan Speed: 500 nm/min

Stanovení Hb a jeho derivátů

- Stanovení Hb

- Hf

- Stanovení

- im

kolorektálního

- detekce po

degradován t

- cu

kolonoskopická
nález

- Stanovení

$\mu\text{g Hb/g}$

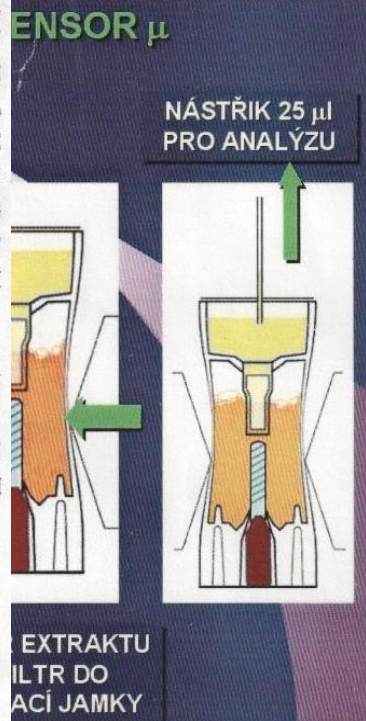
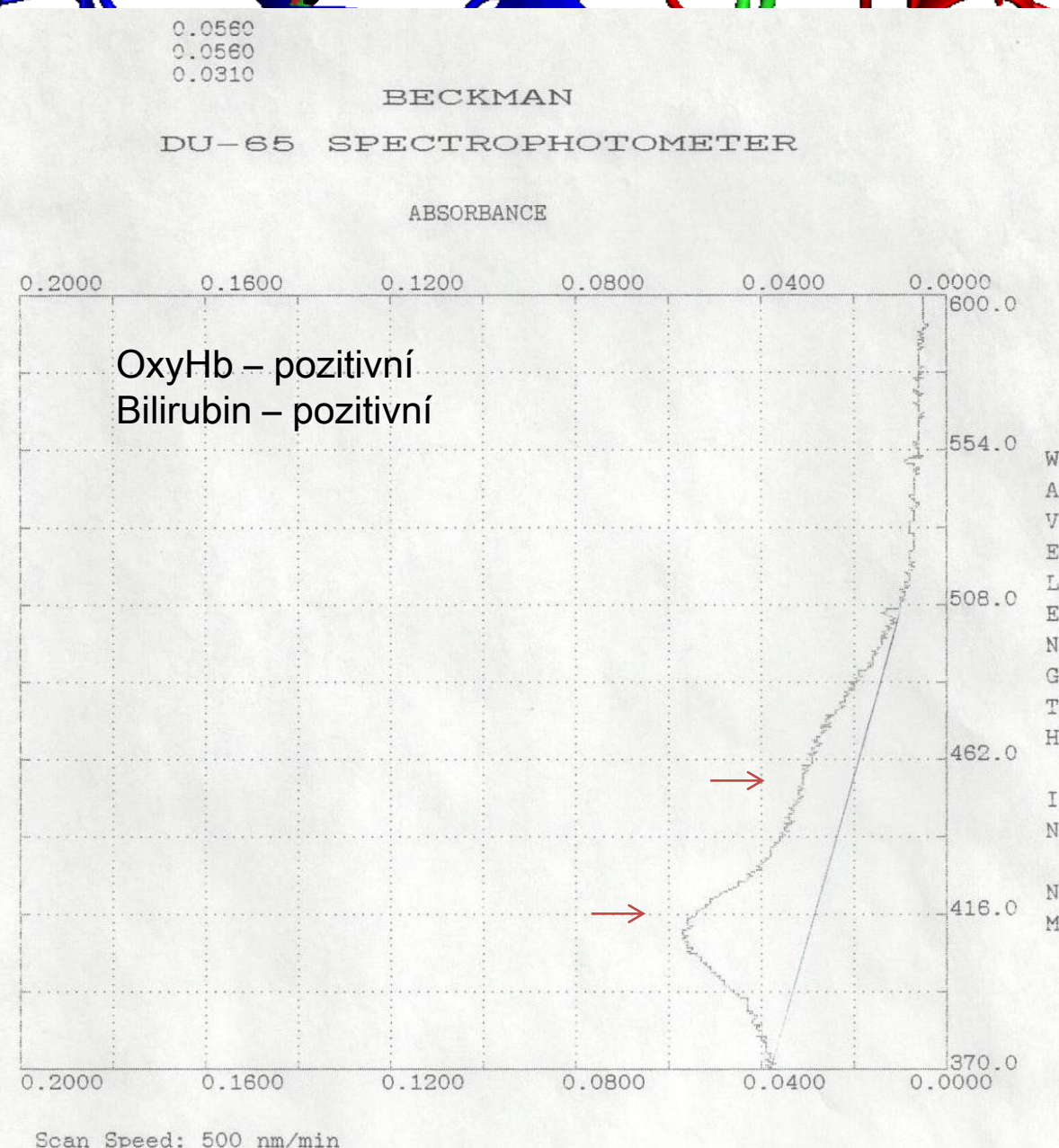
- po

analýzy moče

- Stanovení

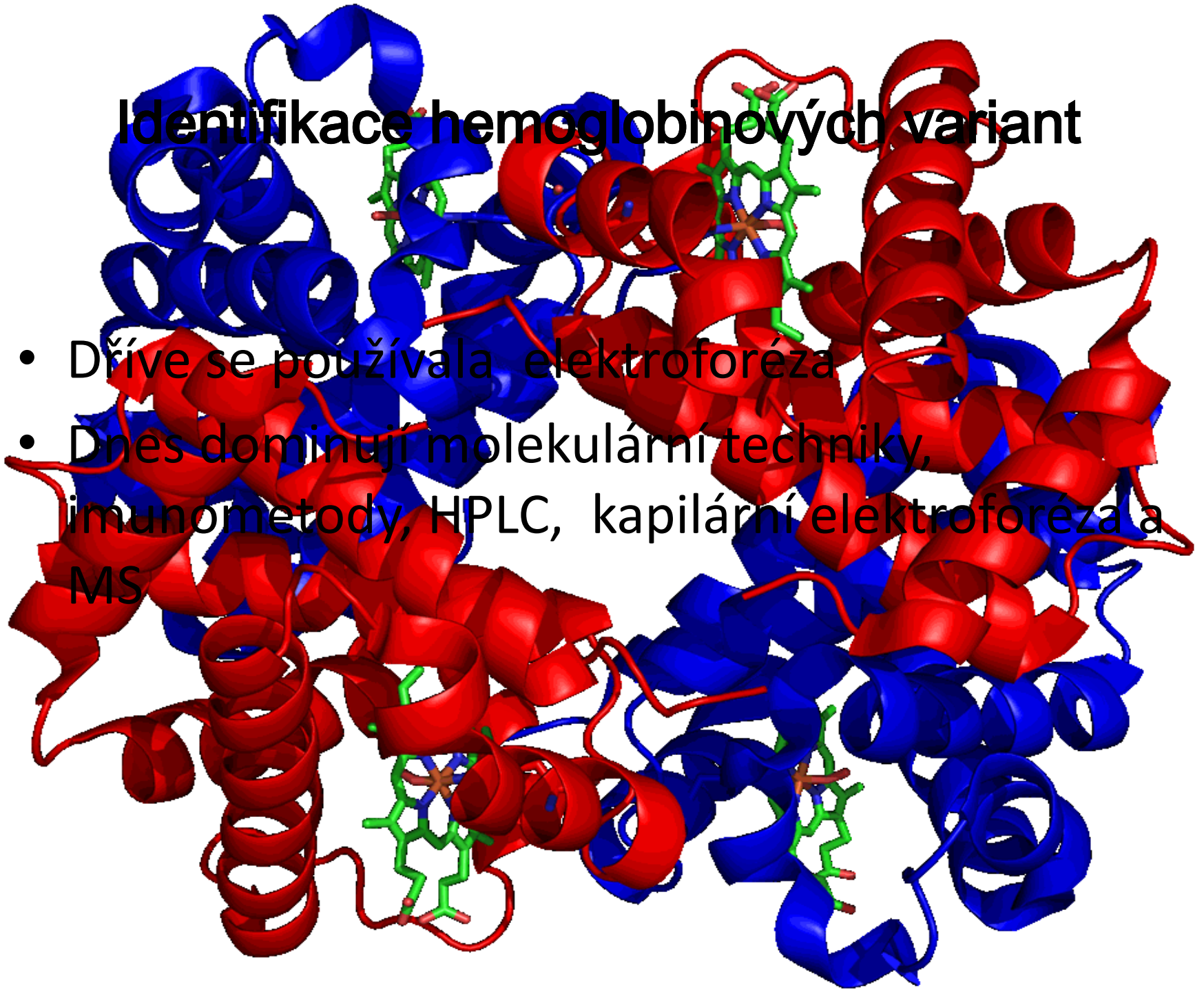
- dia

- sp



Identifikace hemoglobinových variant

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

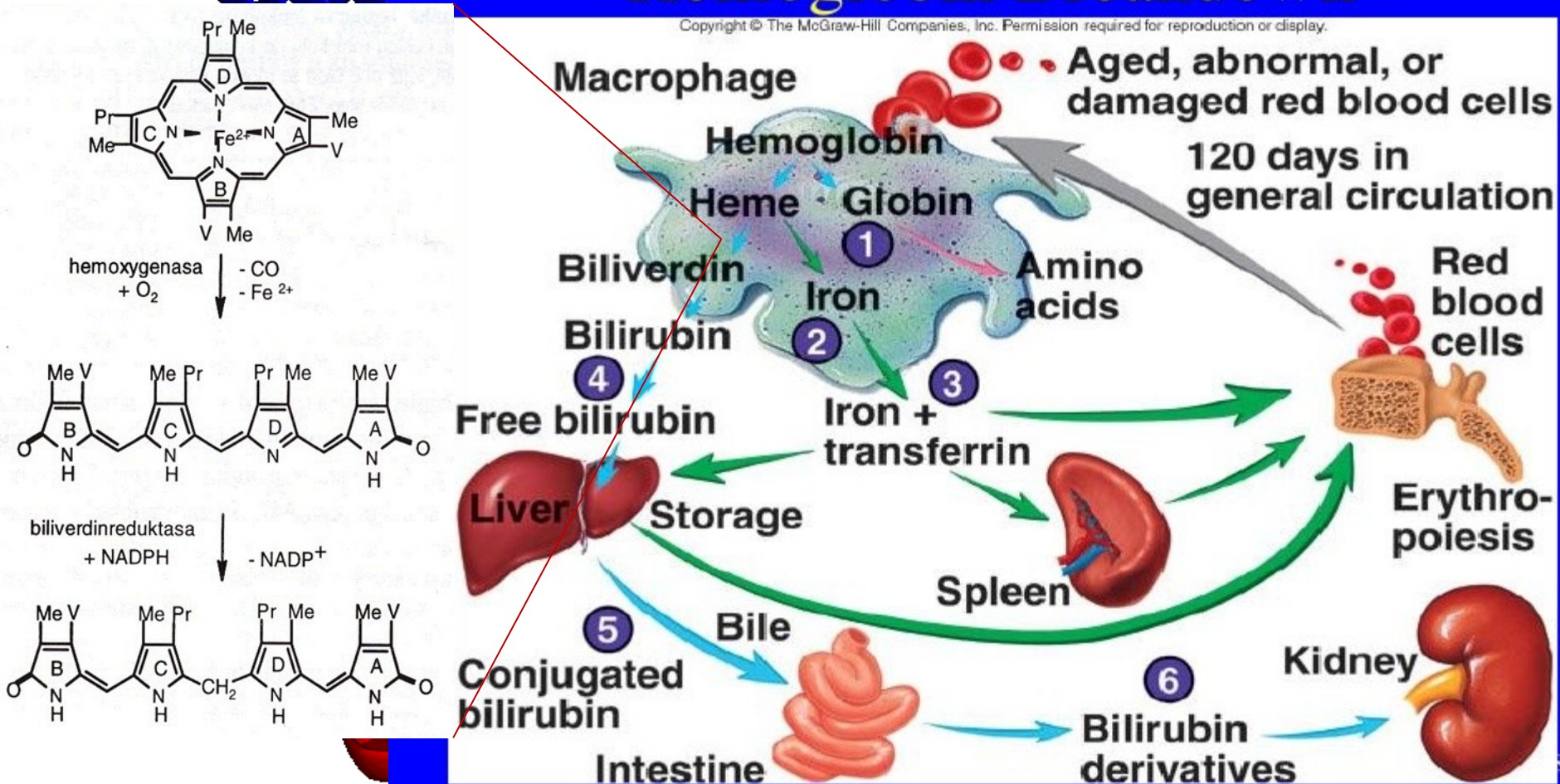


Odbourávání Hb

- V retikulo-endoteliálním systému (RES)
 ⇒ slezina, kostní dřeň, játra, podkoží

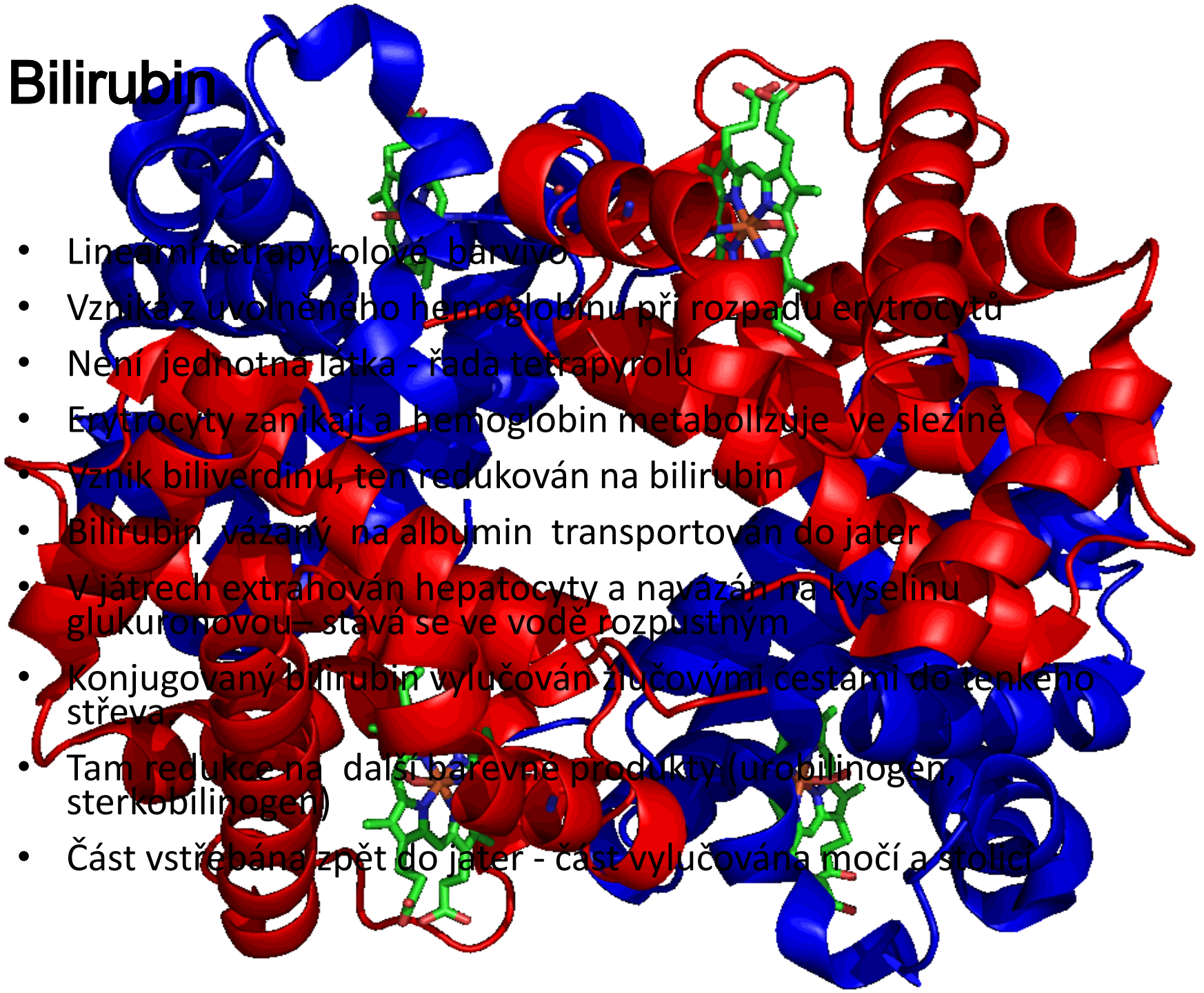
Hemoglobin Breakdown

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Bilirubin

- Lineární tetrapyrrolové barvivo
- Vzniká z uvolněného hemoglobinu při rozpadu erytrocytů
- Není jednotná látka - řada tetrapyrrolů
- 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



Bilirubin

▪ Přímý

= konjugovaný bilirubin, který po přidání směsi diazočinidel k séru dává typické zbarvení

- navázaný na glukuronát (mono- nebo di-glukuronidy)

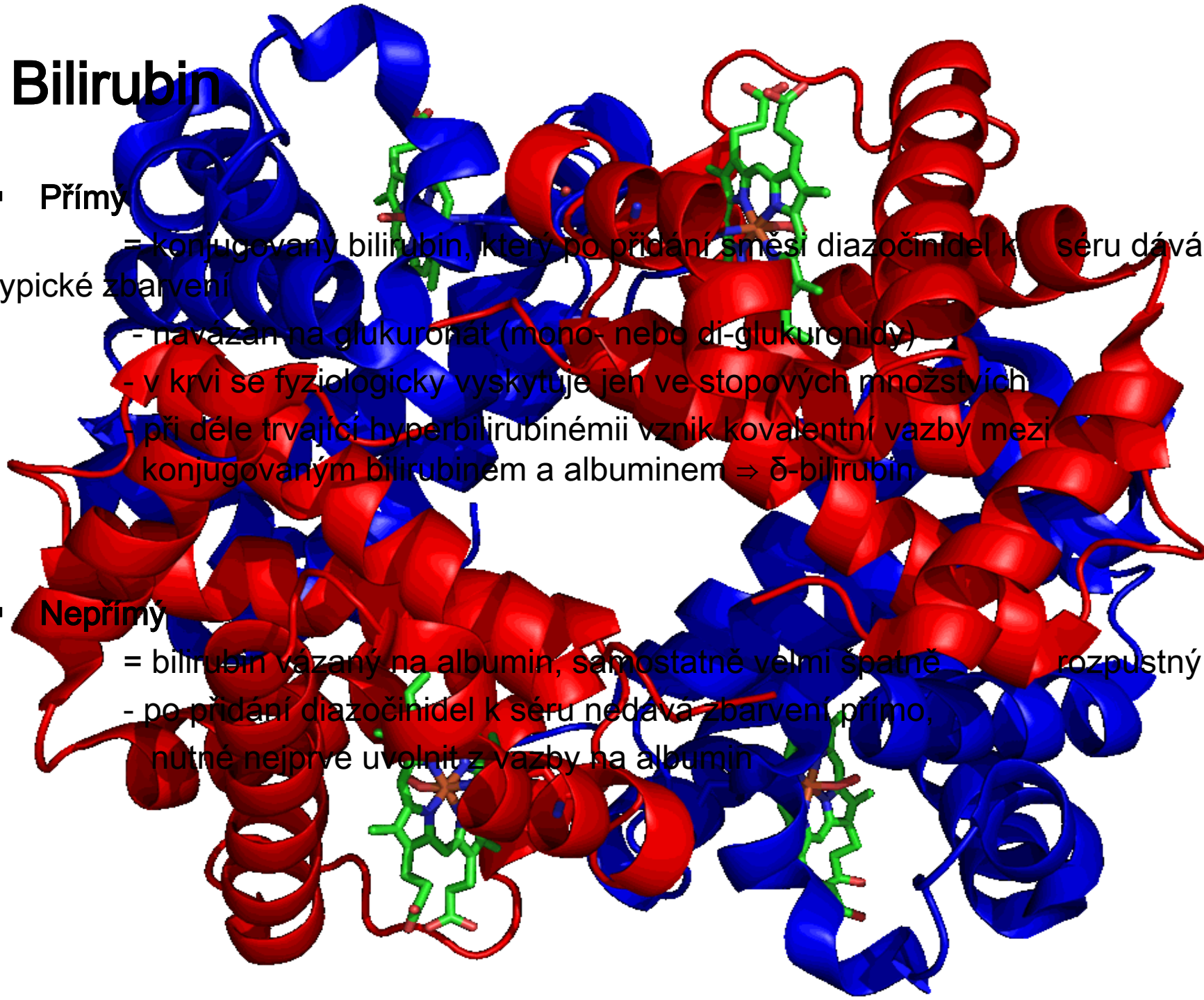
- v krvi se fyziologicky vyskytuje jen ve stopových množstvích

- při déle trvající hyperbilirubinémii vznik kovalentní vazby mezi konjugovaným bilirubinem a albuminem \Rightarrow δ -bilirubin

▪ Nepřímý

= bilirubin vázaný na albumin, samostatně velmi špatně rozpustný

- po přidání diazočinidel k séru nedává zbarvení přímo, nutně nejprve uvolnit z vazby na albumin



Bilirubin

- Při zvýšené koncentraci v krvi, **hyperbilirubinémii**, dochází ke žlutému zabarvení kůže a sliznic – ikterus) žloutenka

- Rozdělení hyperbilirubinémii:

- podle typu bilirubinu:

- nekonjugované** - při nadměrné tvorbě bilirubinu, ale i při nezvýšené produkci bilirubinu, pokud játra nemají dostatečnou vychytávací nebo konjugační schopnost

- konjugované** – obstrukce žlučových cest (lithiáza, nádor...)

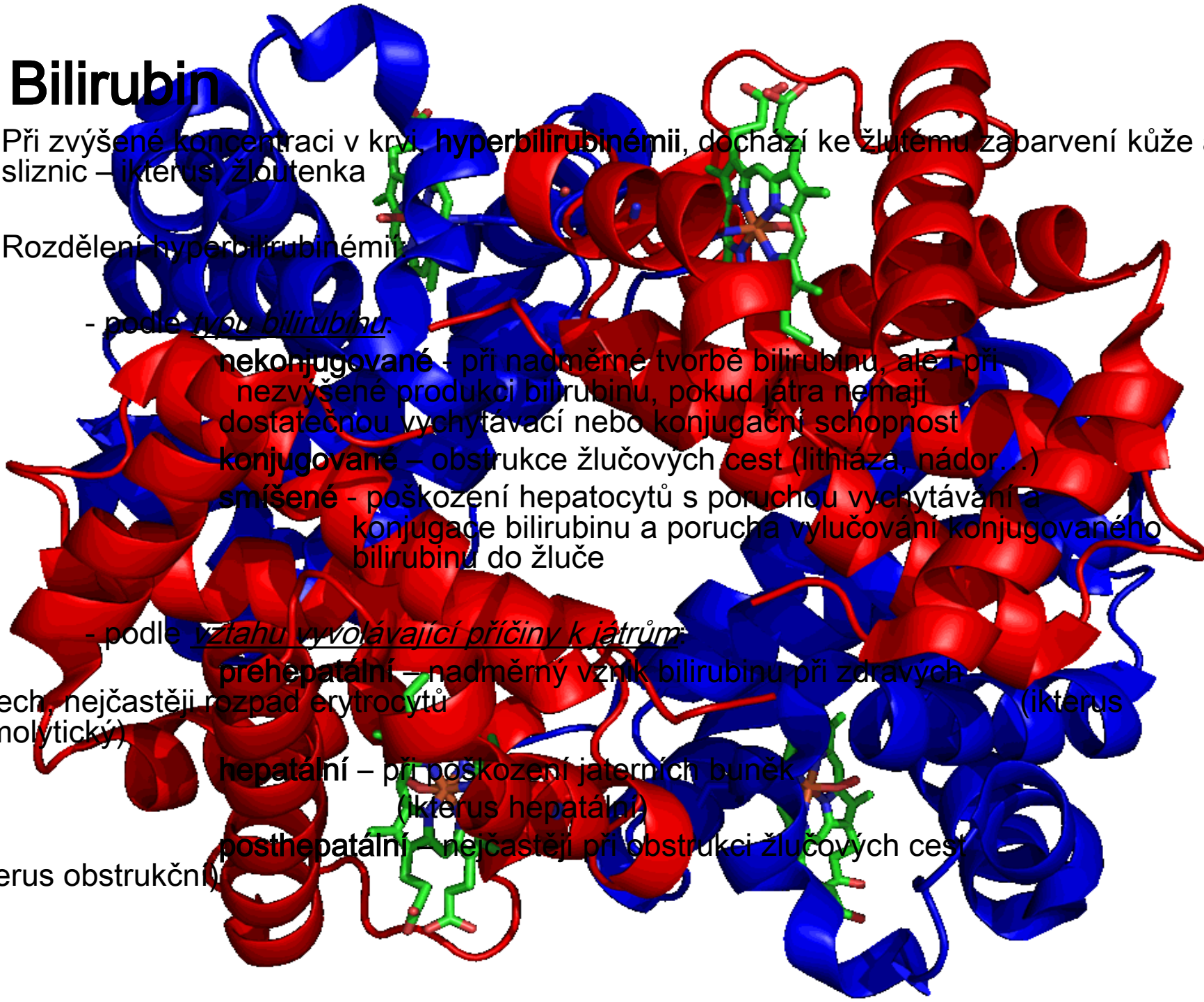
- smíšené** - poškození hepatocytů s poruchou vychytávání a konjugace bilirubinu a porucha vylučování konjugovaného bilirubinu do žluče

- podle vztahu vyvolávající příčiny k játrům:

- prehepatální** – nadměrný vznik bilirubinu při zdravých játrech; nejčastěji rozpad erytrocytů (ikterus hemolytický)

- hepatální** – při poškození jaterních buněk (ikterus hepatální)

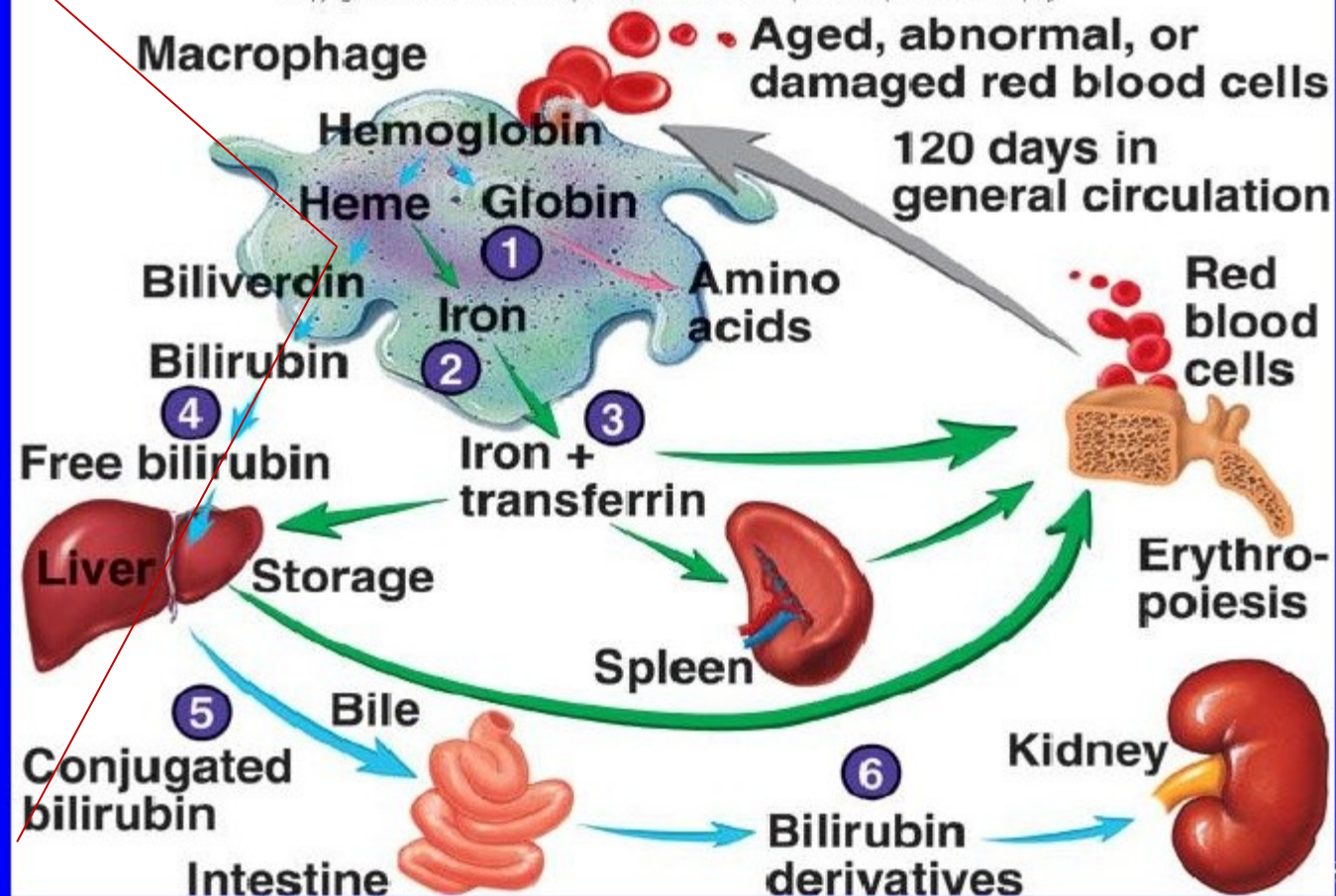
- posthepatální** – nejčastěji při obstrukci žlučových cest (ikterus obstrukční)



Odbourávání Hb

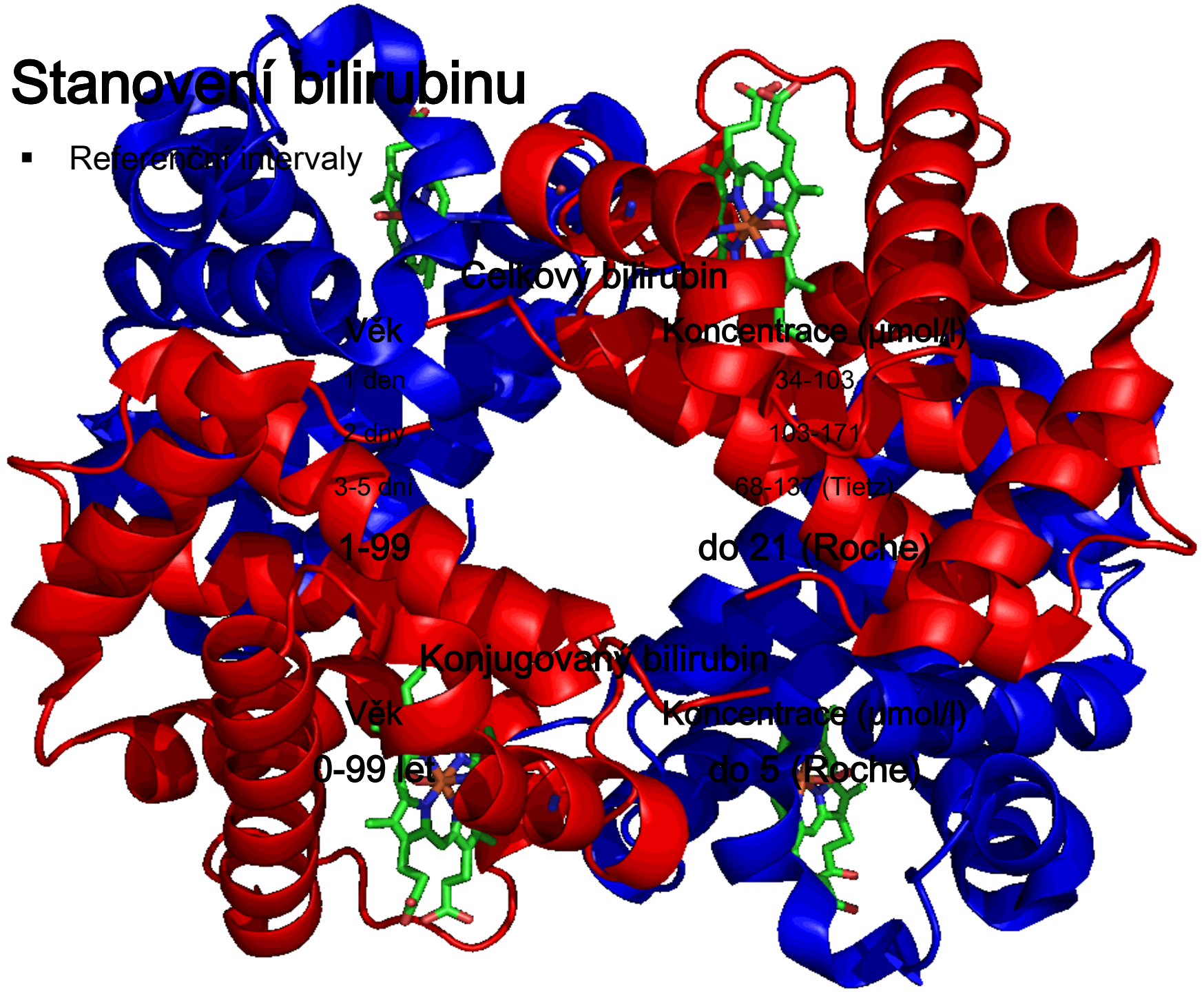
Hemoglobin Breakdown

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Stanovení bilirubinu

- Referenční intervaly



Stanovení bilirubinu

▪ Spektrofotometrické stanovení

většina metod fotometrického stanovení bilirubinu vychází z diazotačních reakcí.

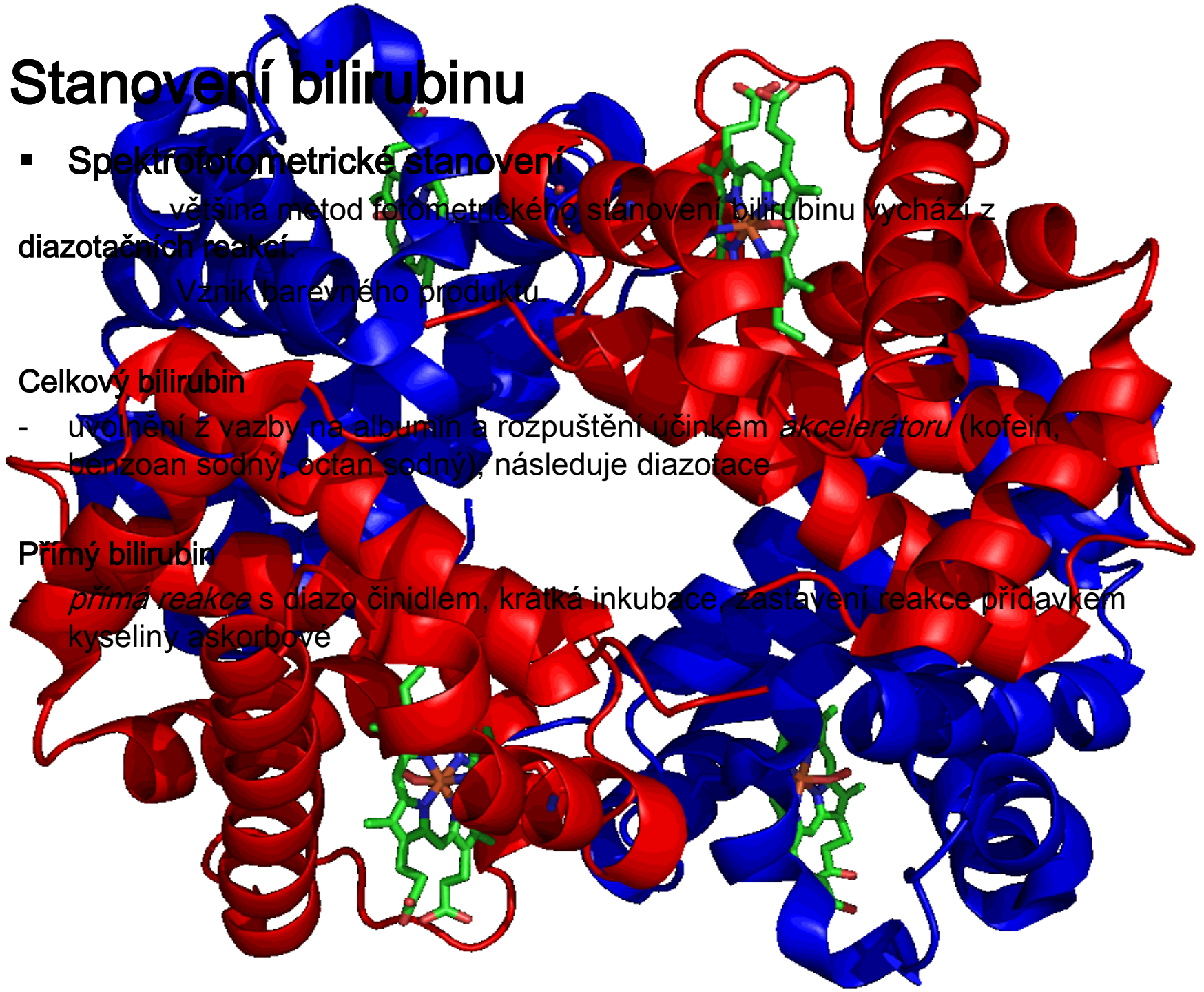
Vznik barevného produktu

Celkový bilirubin

- uvolnění z vazby na albumin a rozpuštění účinkem *akcelerátoru* (kofein, benzoan sodný, octan sodný), následuje diazotace

Přímý bilirubin

- *přímá reakce* s diazo činidlem, krátká inkubace, zastavení reakce přidáním kyseliny askorbové



Stanovení bilirubinu

- Rutinní metody: Jendrassik – Gróf, fotometrické metody s DCA a DPD

- Jendrassik-Gróf: reakce s diazotovanou kys. sulfanilovou (čínidlo z kys. sulfanilové a dusitanu sodného)

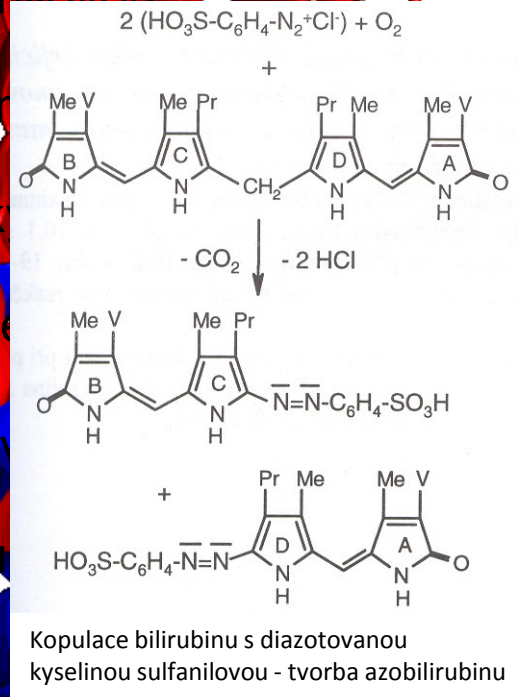
- při stanovení celkového bilirubinu předchází přidání kofeinu + benzoátu

- vznik azobilirubinu - při slabě kyselém pH červený (absorbční maximum 440 nm, vadí hemolýza), v silně kyselém prostředí zelenomodrý

- po 10 minutách přidat NaOH a měřit abs. při 600 nm, hemolýza nevadí

- při stanovení přímého bilirubinu zastavit kys. askorbovou

- Referenční metoda: Doumas – Perry (optimalizovaná a specifikovaná metoda Jendrassik-Gróf)



Stanovení bilirubinu

- **DPD:** - Postupně v praxi nahrazovalo met. Jendrassik-Gróf
 - dichlorfenyldiazonium tetrafluoroborát
 - Celkový bilirubin v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla kopuluje s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí

- Rychlá reakce dichlorfenyldiazonium tetrafluoroborátu (DPD) s bilirubinem – tvorba azobilirubinu

Bilirubin + diazoniový iont -----> azobilirubin

- intenzita červeného zbarvení přímo úměrná celkovému bilirubinu, fotometrické stanovení
- hemolýza ruší až od vysokých hodnot hemoglobinu
- **v současnosti prakticky jediná používaná metoda**

Stanovení bilirubinu

• Přímá spektrofotometrie u novorozenců

- přímé bichromatické stanovení při 454 a 540 nm (bilirubinometry)
- nelze použít u starších dětí a dospělých (interference karotenu a jiných pigmentů)

• Enzymatické stanovení

- využití enzymu bilirubinoxidázy, která katalyzuje oxidaci bilirubinu na zelený biliverdin
- sleduje se pokles absorbance při 405 – 460 nm po dobu 5 min
- běžně se nepoužívá

