

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

Miroslava Beňovská

KLM LF MU



# Porfyriny

Poruchy metabolismu porfyrinů:

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

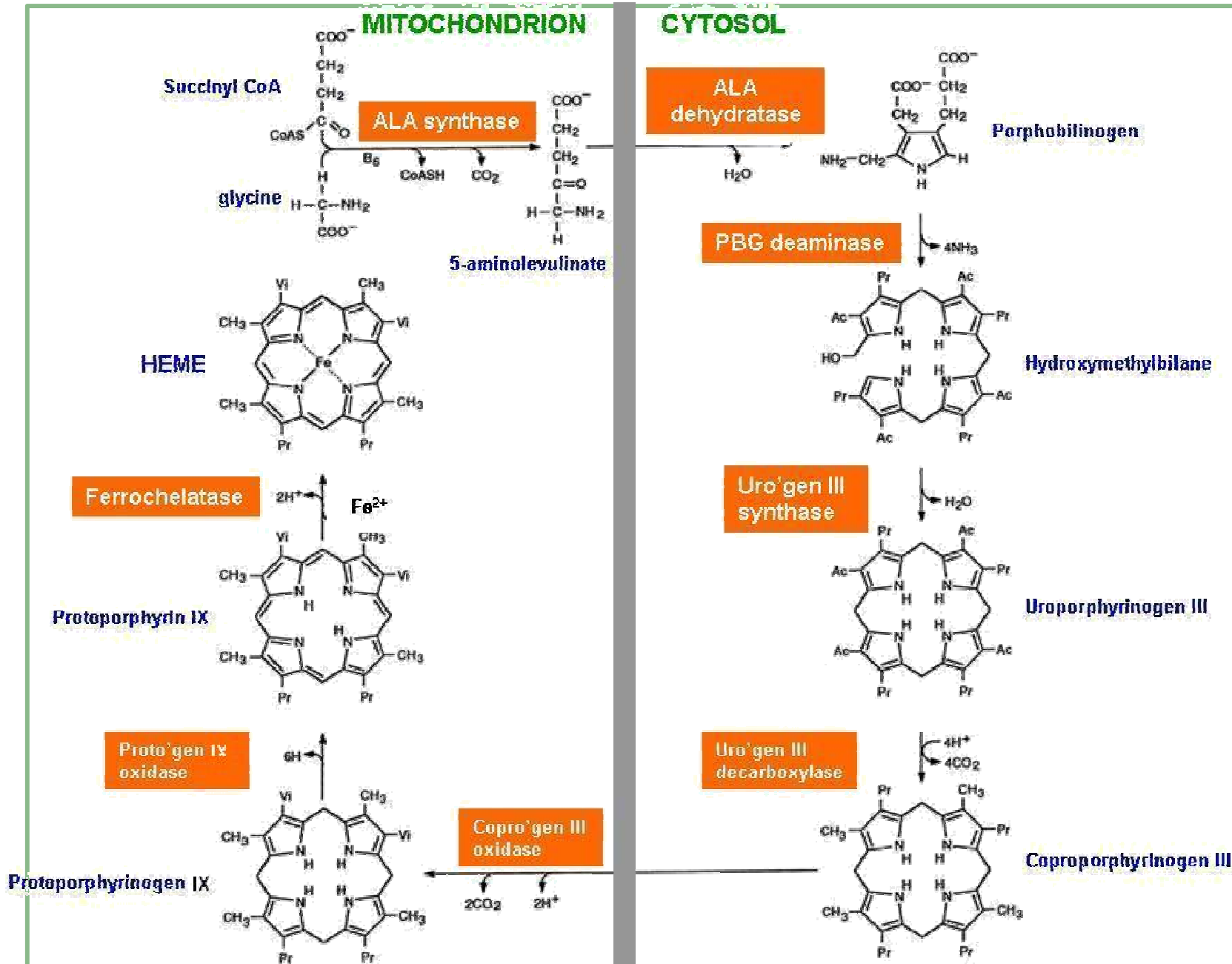
Porfyriny - tetrapyroly, prekurzory hemu

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

Porfyrie - **defekt** tvorby kteréhokoliv **enzymu syntézy porfyrinů za stupněm ALA**

- vysoká koncentrace ALA typická

# Porfyriny – biosyntéza



# 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:

- Kožní, 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 ( Porfyrina 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)

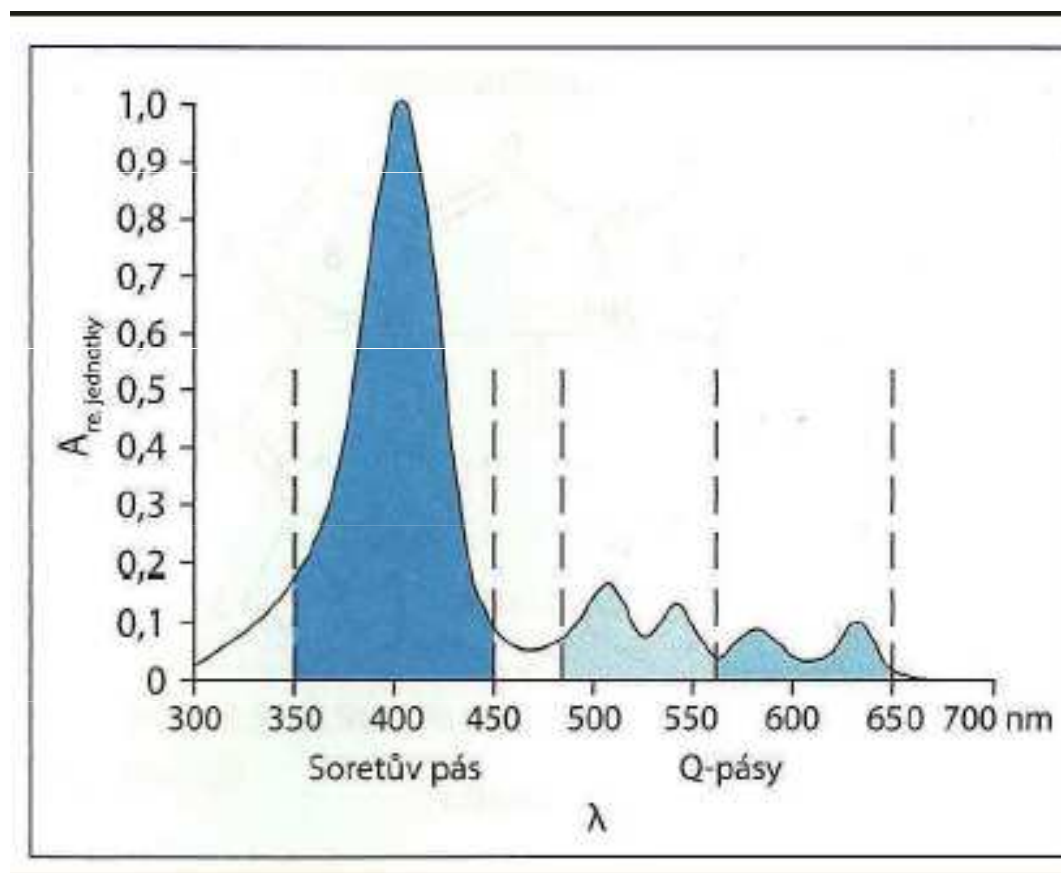
## Stanovení celkových porfyrinů:

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

## Stanovení jednotlivých porfyrinů:

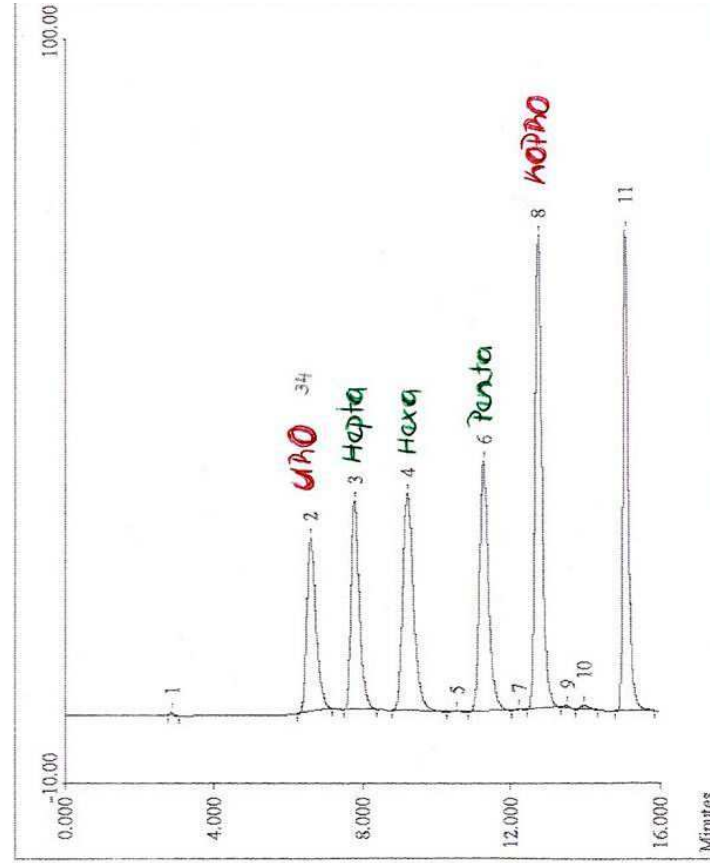
- V okyselené moči **metodou HPLC** na reverzní fázi s použitím fluorescenčního detektoru (fosf. pufr, metanol)
- Materiál – sbíraná moč za 24 hod konzervovaná  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
Nutno chránit před světlem
- **Referenční rozmezí**
  - Uroporfyriu** : do 0,050  $\mu\text{mol}$  / 24 hod
  - 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

# Stanovení celkových porfyrinů



Matouš B. a kol. Základy lék. chemie a biochemie. Galén Praha

# Chromatogram s píky jednotlivých porfyrinů





# Stanovení porfyrinů a jejich prekursorů

## Kvantitativní stanovení

### 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 - kazuistika

## 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 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.

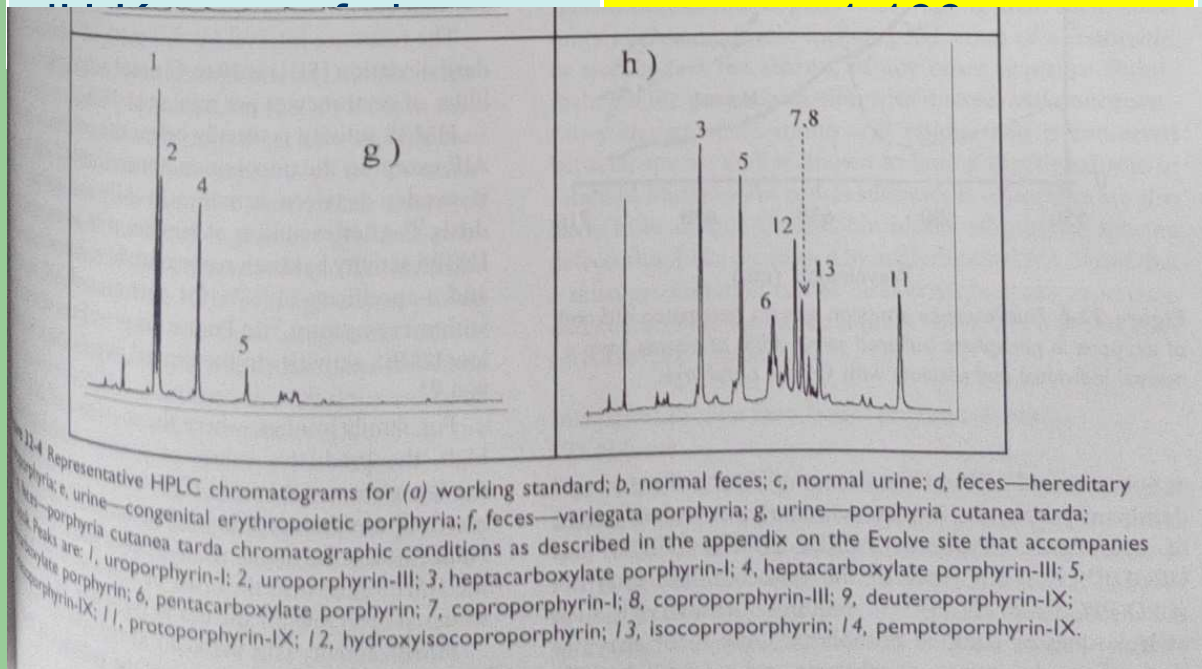
# Porfyrie

Test	Rok/Měsíc					Referenční interval	
	1/1	1/2	1/3	3/1	5/1	<input type="radio"/> SI	<input type="radio"/> KJ
<b>Sérum</b>							
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
BilT	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
<b>Moč</b>							
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

# Porfyrie

Výsledky pacienta s porfyrií – porphyria cutanea tarda

Test	Výsledek (umol/24 hod)	Ref. interval
dU-Heptaporfyrin	4,180	0,0-0,014 umol/24 hod
dU-Hexapporfyrin	0,420	0,0-0,006 umol/24 hod
dU-Pentaporfyrin	0,493	0,0-0,005 umol/24 hod
dU-Uroporfyrin	8,210	0,0-0,050 umol/24 hod
		0,0-0,280 umol/24 hod



# Hemoglobin

- Červeně zbarvená bílkovina obsažená v erytrocytech
- Patří mezi konjugované bílkoviny - spojením bílkoviny s organickým komplexem obsahujícím kov
- Hemoglobin **tvořen z hemu** (protoporfyrin IX s navázaným  $\text{Fe}^{2+}$ ) a bílkoviny **globinu**
- 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

- **Oxy-/deoxyhemoglobin** – s navázaným  $O_2$  nebo bez navázaného  $O_2$  (železo ve formě  $Fe^{2+}$ , v oxidované i neoxidované formě)
- **Karbaminohemoglobin** – fyziologický komplex s oxidem uhličitým ( $CO_2$  navázaný přes  $-NH_2$  konec  $\beta$  řetězce)
- **Methemoglobin** – vzniká z hemoglobinu oxidací železa na  $Fe^{3+}$ 
  - Nemůže vázat kyslík, normálně konc. pod 1,5%
  - Kongenitální methemoglobinémie - údržba  $Fe^{2+}$  narušena nedostatkem NADH methemoglobin reduktázy (riziko methemoglobinémie u dětí při pití vody s obsahem dusičnanů)
  - Metabolická acidóza nebo kóma - zvýšení konc. methemoglobinu
  - Hladiny nad 70% mohou být letální
- **Karbonylhemoglobin** – vzniká při otravách s CO reversibilní vazba CO, který se na  $Fe^{2+}$  váže asi 200-300x pevněji než  $O_2$ ) - hypoxie
- **Sulfhemoglobin** – Cyanóza (modravé až modrofialové zbarvení kůže a sliznic, které se objevuje při nedostatečném okysličení krve) z toxických příčin: sulfonamidy, nitrity, nitroglycerin, acetanilid; není známá léčba – zabránění intoxikaci, persistence po celou dobu života erytrocytů

# 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)

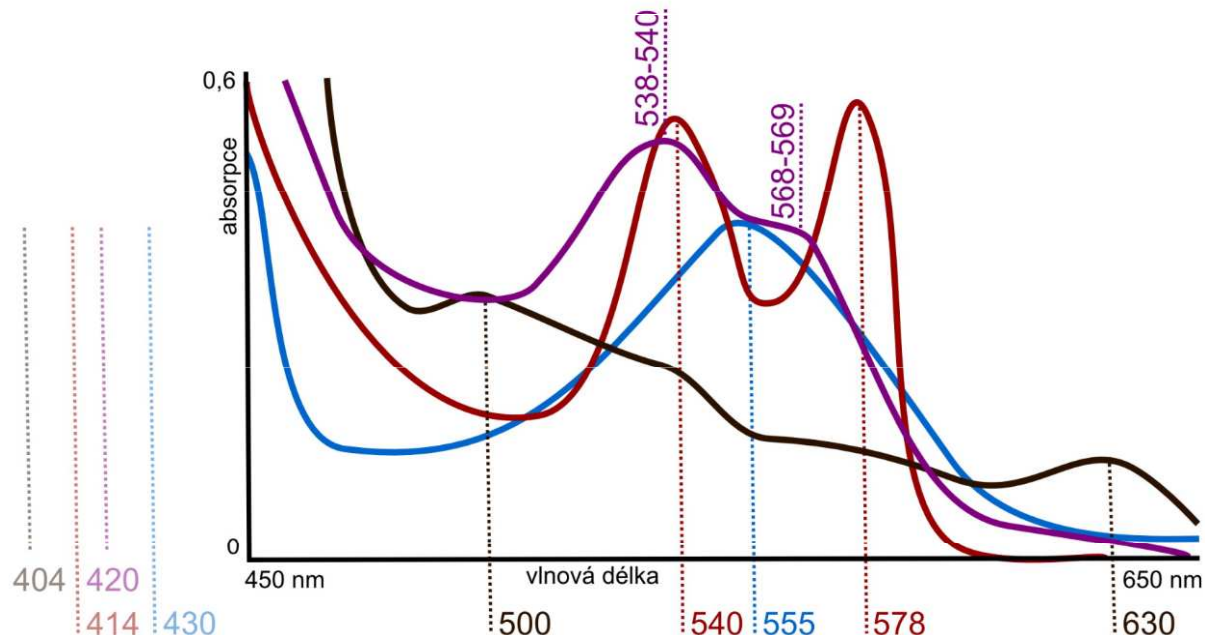
## Talasémie:

- 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 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 (redukovaný Hb) methemoglobin karboxylhemoglobin





# 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, karbonylhemoglobin, methemoglobin a sulfhemoglobin
- K methemoglobinu i sulfhemoglobinu jsou rovněž popsány fotometrické metody



6

1

2

5

3

4

# 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 heparinátém 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



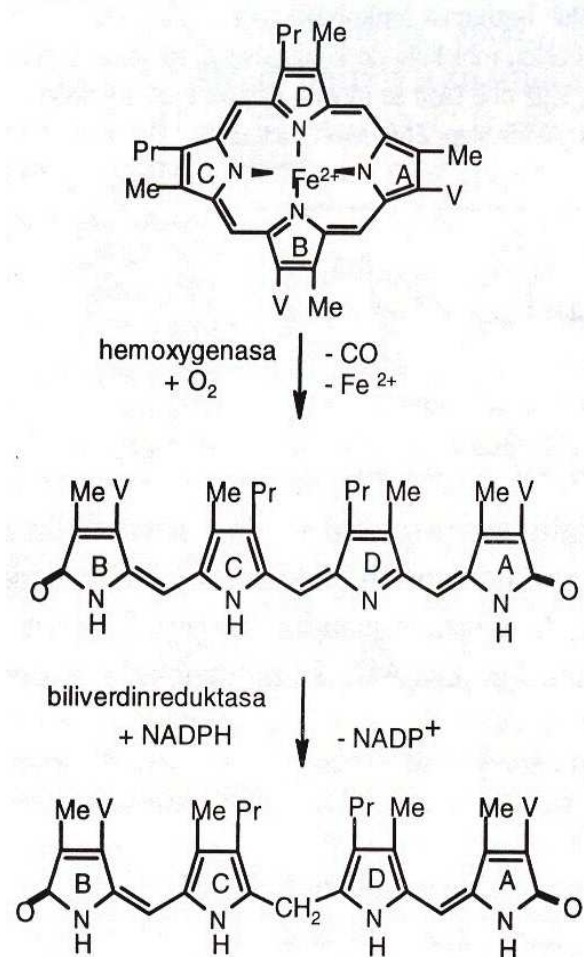
# Bilirubin

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

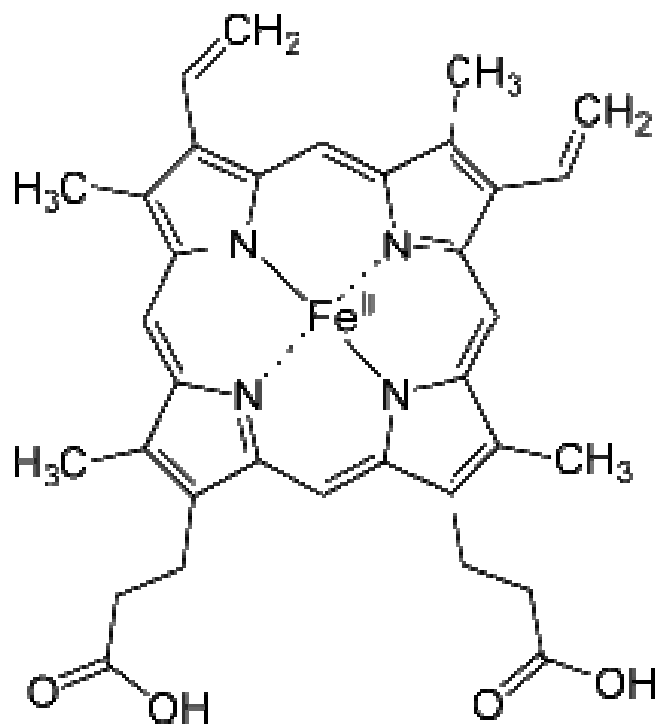
# Bilirubin

- 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

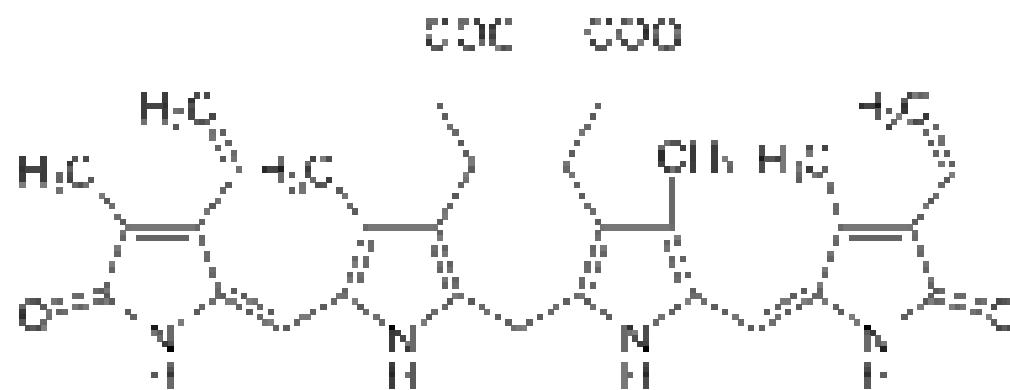
# Konverze hemu na biliverdin a redukce biliverdinu na bilirubin



# 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 (kofein, benzoát sodný)
- 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



Reakce bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou – Ehrlich v r. 1883 - současné metody z reakce vychází

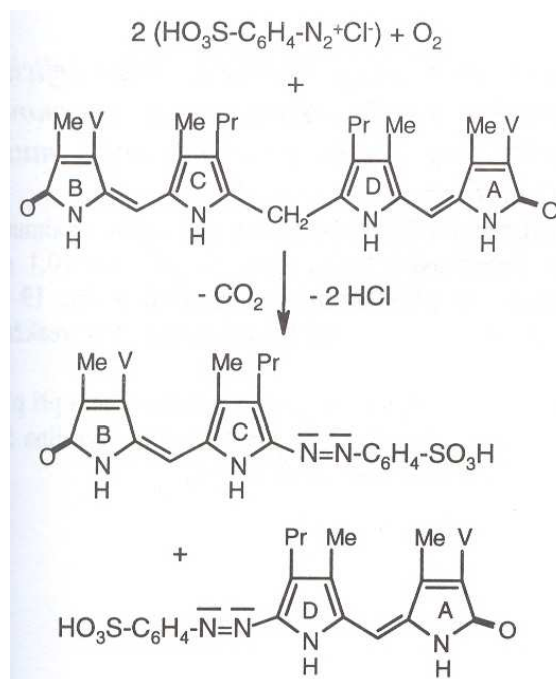
# Stanovení bilirubinu celkového a přímého s diazotovanou kyselinou sulfanilovou

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

- Celkový bilirubin - po přidavku akceleratoru - kofein + benzoát (Při stanovení bilirubinu konjugovaného se tento krok vynechá)
- Přidat diazotovanou kyselinu sulfanilovou (čínidlo 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



# Kopulace bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou - tvorba azobilirubinu



# Stanovení bilirubinu celkového s DPD

- Celkový bilirubin v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla kopuluje s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí
- Rychlá reakce dichlorofenyldiazonium tetrafluoroborátu (DPD) s bilirubinem - tvorba azobilirubinu

kyselina

Bilirubin + diazoniový iont -----> azobilirubin

- Intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná celkovému bilirubinu a může být stanovena fotometricky
- **V praxi nejrozšířenější metoda**
- Hemolýza ruší až od vysokých koncentrací hemoglobinu

# Stanovení bilirubinu

Enzymové stanovení bilirubinu přes biliverdin:

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

Stanovení bilirubinu přímou spektrofotometrií u novorozenců:

- Absorbance se měří při 454 nm
- Metoda nelze použít u starších - přítomnost karotenu a jiných pigmentů

# Interpretace biochemických nálezů

- Kámen žlučníku
- Jaterní selhání
- Virová hepatitida
- Alkoholismus
- Porfyrie str.43