

# Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki

## Importance of porphyrins in laboratory diagnostics

Ljuba Krnjak, Milan Skitek

**POVZETEK:** Porfirini so ciklični tetrapiroli, derivati osnovnega tetrapirrol porfina. So vmesni presnovni produkti v biosintezi hema. Sintetizirajo se v vseh celicah sesalcev. Pri zdravem človeku se v manjših količinah izločajo iz organizma z blatom in urinom. Poznamo tri glavne vrste porfirinov: uroporfirin, koproporfirin in protoporfirin. Bolezni, ki se pojavljajo v zvezi z njimi, so dedne ali pridobljene motnje v biosintezi hema. Za boljše razumevanje jih razdelimo v eritropoetične ali hepatične oblike, glede na primarni položaj pomanjkanja encima. Za klinični dokaz hepatičnih porfirij so ponavadi pomembni sekundarni dejavniki kot: zdravila, hormoni, prehrana, alkohol, določene halogenske hidrokarbonske mešanice in poškodbe jeter. Pri akutnih hepatičnih porfirijah je nujno takojšnje diagnosticiranje in zdravljenje.

**Ključne besede:** porfirini, porfirija, porfinurija, porfirinemija.

**ABSTRACT:** Porphyrins are cyclic tetrapyrroles which can be considered as derivatives of the parent tetrapyrrole. They are synthesized in all mammalian cells. They excrete of the health human body in small quantities through excrement and urinous. In humans, there are three major porphyrins: uroporphyrin, coproporphyrin and protopotphyrin. Porphyrins are hereditary or acquired disorders of heme biosynthesis. For practical reasons, they are classified into erythropoietic or hepatic forms according to the primary site of enzyme deficiency. For the clinical manifestation of hepatic porphyrias secondary factors are usually of importance, e.g. drugs, hormones, nutrition, alcohol, certain halogenated hydrocarbon compounds, hepatic lesions. Acute hepatic porphyrias have to give rise to medical emergencies and require intensive care treatment.

**Key words:** porphyrins, porphyrias, porphyuremia, porphyrinemia

### 1 Uvod

Porfirije spadajo v skupino redkih bolezni. Pojavljajo se po vsem svetu. Povezane so s podedovanimi in pridobljenimi motnjami v biosintezi hema. Primarne ali podedovane bolezni v porfirinskem metabolizmu so relativno redke, pogostejše so nekatere sekundarne ali pridobljene motnje. Laboratorijska diagnostika porfirinskih bolezni je v osnovi povezana z analitiko porfirinov in porfirinskih intermediatov. Vedno bolj postajajo pomembni analizni postopki, ki omogočajo spremljanje koncentracij metabolitov, značilnih za porfirinske motnje.

### 2 Zgradba in vrste porfirinov

Porfirini so ciklični tetrapiroli, derivati osnovnega tetrapirrol porfina. V derivatih porfina so  $\beta$ -vodikovi atomi popolnoma ali delno substituirani z različnimi stranskimi verigami, kot so: alkil, hidroksialkil, vinil, karbonil ali karboksilna skupina. Različni porfirini so razvrščeni glede na vrsto stranskih verig. V skladu s tem razlikujemo naslednje porfirine: protoporfirin, koproporfirin, etioporfirin, mezoporfirin in uroporfirin. Vsi naravni protoporfirini vsebujejo dve različni stranski verigi vsakega pirolovega obroča. Torej so pri dveh različnih verigah možne štiri izomere. Protoporfirin se v naravi nahaja le kot izomer številka IX in ker je opredeljen kot derivat koproporfirina III, se lahko imenuje tudi

protoporfirin III. Protoporfirin IX je v obliki hema in hemoglobina, mioglobina in v večini citokromov. Porfirini kompleksirajo številne kovinske ione in tvorijo metaloporfirine. Porfirinogeni, ki so intermediiati v sintezi porfirinov predstavljajo porfirine, v katerih sta dva dušika v pirolnih obročih in vsi metilenski ogljiki hidroženirani. Vsi biološki metaloporfirini se na enak način sintetizirajo do stopnje protoporfirina IX (1).

### 3 Biosinteza porfirinov in hema

Ime »porfirin« je grškega izvora in izhaja iz besede »porphyrin«. Rastopine porfirinov so temno rdeče do škrlatno obarvane. V strukturi tetrapirolovega obroča so prisotne številne konjugirane dvojne vezi. Porfirini in hem se sintetizirajo v vseh celicah sesalcev. Aktivnost biosinteze je najbolj pomembna v kostnem mozgu in jetrih. Niz reakcij vodi do sinteze hema, ki se začne s sukcinil koecimom A in glicinom ter konča z vključitvijo  $Fe^{2+}$  iona v molekulo protoporfirina IX (Slika 1) (2). Pri sintezi hema sodeluje osem encimov, štirje v mitohondrijih in štirje v citosolu. Predlagana imena encimov so bila objavljena leta 1992 v soglasju s komisijo za nomenklaturu "The International Union of Biochemistry" (Mednarodno združenje za biokemijo). Sprejeta imena encimov so preprečila zamenjave z do tedaj uporabljenimi imeni. Imena encimov so navedena v preglednici 2 (3).

### **Sintaza aminolevulinse kisline EC 2.3.1.36**

V prvi reakciji biosinteze hema nastane aminolevulinška kislina (ALA). Sintetizira se v mitohondrijih z encimom sintazo aminolevulinse kisline iz glicina in sukcinil koencima A v prisotnosti piridoksalfosfata. Aktivnost encima sintaze aminolevulinse kisline uravnava hitrost celotne sinteze hema, vendar je njena aktivnost manjša od aktivnosti ostalih encimov sistema (4).

### **Sintaza porfobilinogena EC 4.2.1.24**

Drugi encim v biosintezi hema je encim sintaza porfobilinogena, ki katalizira nastanek porfobilinogena iz dveh molekul ALA. ALA nastaja v mitohondrijskem matriksu in se premika v citosol, kjer deluje. Zmanjšana aktivnost sintaze porfobilinogena je zelo redka motnja. Bolezen se deduje avtosomno recesivno. Pri homozigotih je aktivnost encima zmanjšana za več kot 95 %. V literaturi najdemo opisanih šest takšnih primerov. Oseba, ki je heterozigotna za mutacijo, ne zbolí, je zgolj prenašalka. Heterozigoti so povezani s prirojenimi porfirinskimi motnjami. Oblike motenj so blage, včasih nezaznavne (fenotipsko, biokemijsko) ali pa so klinično spregledane. Povzročitelji motenj so lahko zunanji dejavniki, na primer svinec. Laboratorijska ugotovitev o znižani aktivnosti sintaze porfobilinogena pokaže zvišano koncentracijo ALA z normalno koncentracijo porfobilinogena (5).

### **Hidroksimetilbilan sintaza EC 4.3.1.8**

Tretji encim v biosintezi hema je hidroksimetilbilan sintaza, ki katalizira sintezo štirih molekul porfobilinogena v hidroksimetilbilan (6). Akutna intermitentna porfirija se pojavi pri posamezniku, kjer je aktivnost hidroksimetilbilan sintaze v eritrocitih 50 % ali manj. Bolezen je avtosomno recesivna. Za pojav teh obolenj je potrebna mutacija na obeh alelih genskega lokusa. Incidenca v svetu je približno 5 do 10 primerov na 100 000 prebivalcev. Več kot 90 % posameznikov z mutiranim genom nikoli ne zbolí (7).

### **Uroporfirinogen III sintaza EC 4.2.1.75**

Četrty encim v biosintezi hema je uroporfirinogen III sintaza. Ta katalizira pretvorbo hidroksimetilbilana v uroporfirinogen. Pri homozigotih je aktivnost encima nizka. Heterozigoti pri tem niso prizadeti. Motnja se izraža z močno fotoobčutljivostjo in temno rdečo barvo urina v neonatalnem obdobju (8). Zobje in kosti fluorescirajo. Ko bolezen napreduje, zajame še druge dele telesa, na primer prste in nos, ki so izpostavljeni sončnim žarkom. Smrt najpogosteje nastopi že v zgodnjem otroštvu. Nastop bolezní v kasnejšem življenjskem obdobju vodi v kopičenje porfirinov, ki ni vedno povezano z značilno fotoobčutljivostjo. Pri bolnikih so opazne brazgotine in deformacije rok, prstov, nosu in ušes. Laboratorijske preiskave pokažejo zvišano izločanje porfirinov v urinu, tudi do 20-krat več kot je normalno. To je redka avtosomno recesivna motnja, ki se pojavlja kot kongenitalna eritropoetična porfirija ali Güntherjeva bolezen (4).

### **Uroporfirinogen dekarboksilaza EC 4.1.1.37**

V peti stopnji biosinteze hema se uroporfirinogen dekarboksilira v koproporfirinogen. Porfirija kutanea tarda je najbolj prepoznavna porfirija z incidenco 1 primer na 25 000. Pojavlja se kot dedna ali pridobljena bolezen. Porfirija kutanea tarda je avtosomno dominantno dedna bolezen in ima 50 % zmanjšano aktivnost encima v jetrih in eritrocitih. Nasprotno je pri pridobljeni porfiriji kutanea tarda za 50 % zmanjšana aktivnost encima le v jetrih, v eritrocitih pa je aktivnost encima normalna. Pri bolnikih se pojavi značilna prizadetost kože in

jetet. Laboratorijski rezultati pokažejo zvišane vrednosti uroporfirinov in koproporfirinov v urinu (9). Hepatoeritropoetična porfirija je zelo redka dedna bolezen, pri kateri aktivnost encima ponavadi za 5 do 10 % odstopa od normalne aktivnosti (4).

### **Koproporfirinogen oksidaza EC 1.3.3.3**

Koproporfirinogen oksidaza je šesti encim, ki sodeluje v biosintezi hema. Nahaja se na notranji strani membrane mitohondrija. Mehanizmi za transport reaktantov in produkta skozi mitohondrijske membrane niso pojasnjeni.

Hereditarna koproporfirija je akutna hepatična porfirija, ki se izraža kot akutna nevrološka porfirija ali porfirija s fotoobčutljivostjo ali pa kot oboje hkrati (v približno 30% primerov). Bolezen se deduje avtosomno dominantno s prirojeno encimsko okvaro koproporfirinogen oksidaze. Laboratorijske preiskave pokažejo zvišanje koproporfirina III v blatu in urinu. V akutnih stanjih bolezní so zvišane vrednosti porfobilinogena in ALA v urinu. Bolniki so občutljivi na sončno svetlobo zaradi kopičenja porfirinov v koži (10).

### **Protoporfirinogen oksidaza EC 1.3.3.4**

Sedmi encim v biosintezi hema je encim protoporfirinogen oksidaza v membrani mitohondrijev. Ta oksidira protoporfirinogen v protoporfirin IX. Protoporfirin IX nastaja z encimsko oksidacijo kot edini porfirin v biosintezi hema. Ostali porfirini nastajajo z neencimsko oksidacijo in predstavljajo ireverzibilno pot v biosintezi hema.

Porfirija variegata se lahko pojavi kot akutna nevrološka porfirija ali porfirija z močno fotoobčutljivostjo ali kot oboje hkrati (v približno 30 % primerov). Bolezen je dominantno dedna. Laboratorijski rezultati pokažejo trajno zvišanje porfirinov in koproporfirinov v blatu. Akutni napadi bolezní so povezani z zvišanimi vrednostmi ALA, porfobilinogena, koproporfirinov in uroporfirinov v urinu. Bolniki so močno občutljivi na sončno svetlobo in mehanske poškodbe (4).

### **Ferohelataza EC 4.99.1.2**

Zadnja faza v biosintezi hema je vgrajevanje  $\text{Fe}^{2+}$  v protoporfirin IX. To reakcijo katalizira encim ferohelataza na notranji membrani mitohondrija. Tako nastane hem. Ferohelataza je specifična za  $\text{Fe}^{2+}$  in preprečuje vezavo  $\text{Fe}^{3+}$  v molekulo porfirina. Za vezavo tekmujejo kovinski ioni z valenco 2+. Na primer:  $\text{Zn}^{2+}$  je v visokih koncentracijah prisoten ob nastajanju rdečih krvnih celic in neposredno tekmuje z  $\text{Fe}^{2+}$  za encimski vstop v protoporfirin IX. Nastali cinkov protoporfirin (ZPP) je posredni pokazatelj razpoložljivosti železa pri dozorevanju eritroblasta. Porast zvišanih koncentracij ZPP pri različnih pridobljenih motnjah je povezan z motnjami v metabolizmu železa, kar povzroča pomanjkanje železa in anemije pri kroničnih boleznih. Zvišane koncentracije aluminija pri dializnih bolnikih ali zastupitev s svinčcem prav tako povzročijo zvišanje ZPP z motnjo v metabolizmu železa (11).

Aktivnost encima ferohelataze pri eritropoetični protoporfiriji znaša 50 %. Zvišane so koncentracije protoporfirina v krvi, žolču in blatu. Presežek protoporfirina se nalaga v koži, posledica je občutljivost kože na sončno svetlobo že v otroštvu. Bolezen preide v kronično fazo kot solarni ekcem. Za zdravljenje bolnikov je potrebna primerna zaščita pred soncem in  $\beta$  karoteni, ki zmanjšujejo fotoobčutljivost (12).

## 4 Nadzor biosinteze hema

V sintezo hema je vključenih osem encimov, ki delujejo v tesni medsebojni povezavi. Genetski material, ki določa njihovo sintezo, je nameščen na različnih kromosomih. Gena za sintazo aminolevulinske kisline in hidroksimetilbilan sintazo kontrolirata sintezo hema.

Sintaza aminolevulinske kisline ima dva izoencima: eritroidnega in neeritroidnega. Eritroidni gen je bil izoliran na X kromosomu, neeritroidni gen pa na kromosomu 3. V neeritroidnih tkivih je za normalno delovanje, na primer mitohondrijskih citohromov, potrebna nizka koncentracija hema. Neeritroidni izoenzim se sintetizira na prostih poliribosomih v obliki predhodnika. Predhodnik se naprej preoblikuje v zrel encim preko translokacije v mitohondrijih predvsem s cepitvijo N-terminalnega konca predhodnika. Dokazano je, da hem inhibira prenos predhodnika sintaze aminolevulinske kisline v mitohondrijih, kar predstavlja pomembno kontrolno točko, saj se sintaza aminolevulinske kisline v citoplazmi hitro razgrajuje. V nasprotju z drugimi celicami mora razvijajoči se eritroblast akumulirati visoke koncentracije hema za nastanek hemoglobina.

Hidroksimetilbilan sintaza ima tudi dve encimski obliki: eritroidno in neeritroidno, vendar se v nasprotju z sintazo aminolevulinske kisline te oblike razvijajo iz istega gena. Bolj kot sintaza aminolevulinske kisline deluje hidroksimetilbilan sintaza v dozorevajočem eritrocitu kot kontrola za sintezo hema in omogoča akumulacijo hema v eritrocitih. Humani gen je sestavljen iz 15 eksonov s preko 10 kilobaznih parov v DNA. Prisotna sta dva promotorja, ki povzročita dve različni obliki sporočilne mRNA: eritroidne in neeritroidne. Vodilni promotor je aktiven v vseh celicah in inducira transkripcijo daljše neeritroidne mRNA, ki povzroči nastanek izoencima, sestavljenega iz 361 aminokislin. Nevodilni promotor pa je aktiven samo v eritroidnem tkivu in povzroči nastanek mRNA, ki je krajša za sekvenco prvega eksona. Primarna struktura eritroidnega encima je zgrajena iz 344 aminokislin in je identična strukturi neeritroidnega izoencima, razen v odsotnosti 17 aminokislin na amino terminalnem koncu. Okvara v prvem eksonu hidroksimetilbilan sintaznega gena lahko povzroči normalno koncentracijo encima v razvijajočem eritrocitu in zmanjšano koncentracijo v drugih tkivih. Približno 5 % bolnikov z akutno prehodno porfirijo ima normalne koncentracije hidroksimetilbilan sintaze v eritrocitih (13).

## 5 Motnje v biosintezi porfirinov

Izraz »porfirija« je leta 1911 opisal Günther (14). Porfirinske motnje so bile pred preučitvijo biosinteze hema opredeljene s kliničnimi značilnostmi. Porfirije so tudi razvrščene glede na vrsto tkiva, to je, ali gre za hepatično ali eritropoetično tkivo. Na splošno porfirinske motnje delimo na primarne ali podedovane in sekundarne ali pridobljene motnje. Pridobljene motnje so veliko pogostejše kot podedovana stanja. Laboratorijska podpora pri diagnostiki porfirinskih motenj je v določanju zvišanih porfirinov in porfirinskih intermediatov. Dodatne informacije dobimo z merjenjem aktivnosti posameznega encima, ki sodeluje v biosintezi hema in s testiranjem genske osnove. Danes je molekularna biologija vse bolj uveljavljeno diagnostično orodje za preučevanje porfirij (15).

### Primarne ali podedovane porfirinske motnje

Metabolne abnormalnosti v primarnih porfirinskih motnjah so rezultat podedovanih sprememb v genih, ki kodirajo specifične encime v

biosintezi hema. Primarne porfirinske motnje lahko razdelimo v dve večji skupini: 1) nevrološke in/ali psihiatrične oblike porfirij, ki se pogosto pojavljajo v akutnem stanju in 2) oblike, povezane s fotoobčutljivostjo (16, ). Ta razvrstitev je pomembna za diagnostiko bolezni. Simptomi nevroloških porfirij so na primer povezani z zvišanjem predhodnikov porfirinov, porfobilinogena in ALA. Simptomi fotoobčutljivosti so povezani z akumulacijo porfirinov. Če se porfirini povišano izločajo v urinu, gre za porfirinurijo, če pa je zvišana njihova koncentracija v eritrocitih gre za porfirinemijo. Znane porfirije so: kongenitalna eritropoetična porfirija (KEP), eritropoetična porfirija (EPP), hepatoeritropoetična porfirija (HEP), akutna intermitentna porfirija (AIP), hereditarne koproporfirija (HK), porfirija variegata (PV) in porfirija kutanea tarda (PKT). Vse te bolezni so podedovane, z izjemo PKT, ki je lahko podedovana ali pridobljena zaradi podedovane in/ali pridobljene okvare encima uroporfirinogen dekarboksilaze.

### Sekundarne ali pridobljene porfirinske motnje

Nastajajo pod vplivom zunanjih dejavnikov kot so: zastrupitve s težkimi kovinami (najbolj pogosta je zastrupitev s svincem), alkoholom, pri anemijah, levkemijah, infekcijah, boleznih jeter in pri Hodgkinovi bolezni. Zvišano koncentracijo porfirinov zasledimo v urinu in blatu (17).

## 6 Analizni postopki

### 6.1 Določanje predhodnikov porfirinov

Porfobilinogen in ALA sta dobro topna v vodi, se koncentrirata v urinu in ju zato v kliničnih laboratorijih določamo skoraj izključno v urinu. Postopki določanja porfobilinogena in ALA najpogosteje temeljijo na barvni reakciji z Ehrlichovim aldehydним reagentom in kislom raztopino paradimetilaminobenzaldehida (DMAB). Porfobilinogen reagira z Ehrlichovim reagentom, pri čemer nastane obarvan produkt najpogosteje rožnato rdeče ali škrlatne barve. Danes uporabljamo več različnih modifikacij Ehrlichovega reagenta, ki se med seboj razlikujejo po koncentraciji DMAB ter vrsti in koncentraciji kisline.

#### 6.1.1 Določanje porfobilinogena v urinu

Za meritve porfobilinogena je pomembno, da ločimo med kvalitativnimi presejalnimi testi kot so Watson-Schwartzov (18) in Hoeschev test (19) in kvantitativnimi določanji. Presejalni testi so relativno slabo občutljivi in pogosto lažno pozitivni, oziroma lažno negativni. Presejalni testi se v glavnem uporabljajo v primeru nujnih določitev, ki pa jih moramo kasneje potrditi s kvantitativno metodo. Referenčne vrednosti porfobilinogena v naključnem vzorcu urina so pod 2,0 mg/L (8,8  $\mu\text{mol/L}$ ), v 24-urnem vzorcu pa pod 3,4 mg/d (15  $\mu\text{mol/d}$ ). Pri nevroloških ali psihiatričnih porfirijah zasledimo tudi do 10-kratno zvišanje vrednosti porfobilinogena v urinu od zgorajne referenčne meje. Danes so na tržišču že dostopni reagenti za porfobilinogen presejalne teste, v katere je vključen anionski izmenjevalec, ki loči porfobilinogen od drugih interferenčnih substanc. Pri tem dobimo bolj zanesljive rezultate. Najpogostejša metoda za kvantitativno določitev porfobilinogena je postopek z ionskim izmenjevalcem. Bolj občutljive metode pa so osnovane na HPLC metodi (20).

#### 6.1.2 Določanje ALA v urinu

Pri odkrivanju akutnih nevroloških porfirij določamo ALA skupaj s porfobilinogenom. Porfobilinogen in ALA sta zvišana pri akutnih porfirijah,

pri tem ALA nekoliko manj. ALA je pomembna še pri ovrednotenju zelo redke porfirije zaradi zmanjšane aktivnosti porfobilinogen sintaze. Postopki za določanje ALA so podobni tistim za določanje porfobilinogena. Na razpolago imamo postopke z ionskimi izmenjevalci in alternativne fotometrične metode za hitre teste. Postopki običajno zahtevajo dodatno reakcijo z reagentom, kot je acetilaceton, ki konvertira ALA v pirolni derivat, ki nato povzroči nastanek značilne barve z Erlichovim reagentom. Problem interferenc je tu še večji kakor pri porfobilinogenu. Zvišane koncentracije ALA povzročijo tako akutna kot kronična izpostavljenost etanolu (21) in svincu (17). Pri določanju ALA je pomembno tudi shranjevanje vzorca do analize. Urine lahko shranjemo pri 4°C v temi do 14 dni brez izgub aktivnosti ALA. Medtem ko je porfobilinogen bolj stabilen pri pH vrednosti 8 do 9, je ALA bolj stabilna pri pH vrednosti 3 do 4. Pri bolj kislem pH pa se njena stabilnost zmanjša. Referenčna vrednost ALA v naključnem vzorcu urina je pod 4,5 mg/L (34 μmol/L) in v 24-urnem urinu pod 7,5 mg/d (57 μmol/d).

## 6.2 Določanje porfirinov

Večina porfirinskih spojin močno absorbira pri valovni dolžini 400 nm, kar imenujemo Soretov pas. Vzbujanje s Soretovim pasom proizvaja karakteristično fluorescenco v oranžno rdečem območju pri valovni dolžini 550 do 650 nm. Intenziteta fluorescence je odvisna od pH in je bolj intenzivna v kisljih raztopinah. Fluorescenca omogoča detekcijo porfirinov tudi v nanomolarnih koncentracijah. Kvantitativna metoda za indentifikacijo porfirinov je HPLC s fluorescenčnim detektorjem. Priprava ustreznih kalibratorjev predstavlja problem zaradi nizke topnosti porfirinov, težnje po dimerizaciji in tvorbe drugih oblik agregatov v vodnih raztopinah. Nove tehnike, kot so kapilarna elektroforeza (22) in masna spektrometrija (23), bodo imele pomembno vlogo v prihodnosti pri določanju porfirinov.

### 6.2.1 Določanje porfirinov v urinu

V laboratorijih porfirine v urinu običajno določajo s presejalnimi testi, ki jim sledijo kvantitativne metode v primeru pozitivnih vzorcev (24). V nekaterih laboratorijih določajo porfirine v urinu neposredno s kvantitativno metodo.

Referenčne vrednosti so:

uroporfirin ≤3,9 (3,5-5,7) μmol/mol kreatinina ali ≤37 (32-63) nmol/dan in koproporfirin ≤22 (19-34) μmol/mol kreatinina ali ≤221 (195-320) nmol/dan.

V literaturi je objavljeno veliko število različnih postopkov uporabe HPLC za določanje porfirinov v urinu (25).

### 6.2.2 Določanje porfirinov v krvi

Koncentracija porfirinov v serumu in plazmi je zelo pomembna pri diagnostiki različnih porfirinskih motenj. Referenčna vrednost za celotne porfirine v serumu je pod 15 nmol/L. Najvišja koncentracija porfirina v polni krvi in eritrocitih je ZPP, ki ga ne najdemo v serumu in plazmi, razen ob prisotnosti hemolize. ZPP nastane v dozorevajočem eritrocitu, če je zmanjšana koncentracija razpoložljivega železa. ZPP v polni krvi se v kliničnih laboratorijih določa s fluorometrijo in z bolj dolgotrajnimi ekstrakcijskimi metodami. Referenčna vrednost ZPP v polni krvi in eritrocitih je 30 do 70 μmol/mol hema. Za določanje prostih ali s kovino kompleksiranih protoporfirinov v polni krvi obstajajo različni HPLC postopki (26).

### 6.2.3 Druge tehnike za določanje porfirinov v krvi

Zvišano vsebnost porfirinov v eritrocitih lahko določimo neposredno z uporabo fluorescenčne mikroskopije in razmazih periferne krvi (27). Ta postopek se uporablja kot presejalni test za odkrivanje eritropoetične porfirije. Vsebnost porfirinov v eritrocitni populaciji prav tako lahko določimo s pretočno citometrijo, saj je porazdelitev fluorescentnih eritrocitov drugačna pri protoporfiriji v primerjavi z normalnimi vzorci (28).

### 6.2.4 Določanje porfirinov v blatu

Analiza porfirinov v blatu se uporablja za diferencialno diagnostiko akutnih nevroloških porfirij, čeprav rezultati niso vedno jasni. Najbolj pomembna porfirina v diagnostiki porfirinskih motenj sta koproporfirin in protoporfirin (29).

Referenčne vrednosti so:

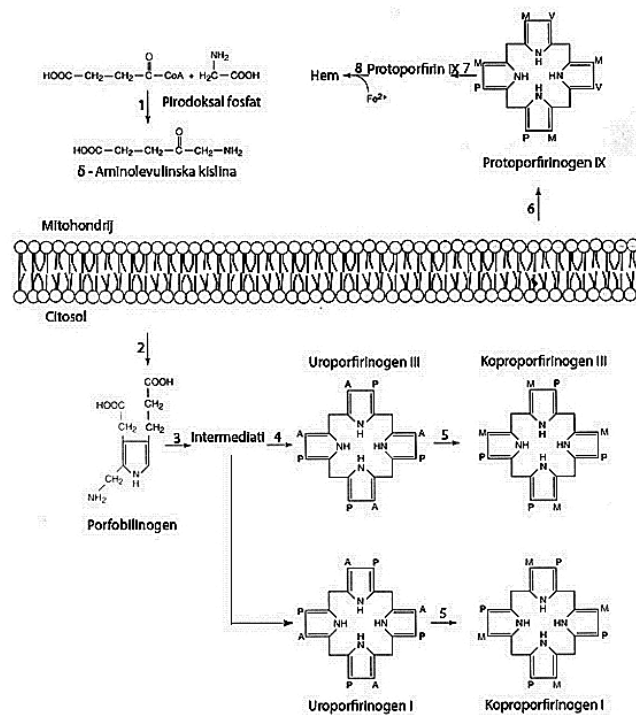
koproporfirin pod 200 μg/dan (<306 nmol/dan) ali <45 nmol/g suhe teže in

protoporfirin pod 1500 μg/dan (<2670 nmol/d) ali <150 nmol/g suhe teže.

Določanje uroporfirina je lažje in bolj ustrezno v vzorcih urina, kjer ne poteka razgradnja z bakterijami. V diagnostične namene je določanje porfirinov v žolču, ki ga dobimo z duodenalno aspiracijo bolj primereno kakor v blatu, pri čemer pa problem predstavlja pridobitev vzorca. V blatu poteka bakterijska razgradnja, kar pogosto lahko privede do napačne diagnoze porfirinskih motenj.

## 6.3 Določanje encimov, ki sodelujejo v sintezi hema

Podedovane porfirinske motnje so povezane z zmanjšano aktivnostjo (aktivnost je 50 % ali manj) določenega encima. Z encimskimi testi



Preglednica 1: Pregled encimov v biosintezi porfirinov in hema (3).  
Table 1: Overview the Enzymes of Porphyrin and Heme Biosynthesis (3).

ENCIMI (Ostala imena encimov)	Dedne bolezni	Zvišani intermedijati
1. <b>Sintaza aminolevulinske kisline</b> (Sintaza aminolevulinske kisline)	Ni	
2. <b>Sintaza porfobilinogena</b> (Aminolevulinska dehidraza) (Aminolevulinska dehidrataza) (Aminolevulinska hidrolaza)	Porfirije	Aminolevulinska kislina
3. <b>Hidroksimetilbilan sintaza</b> (Porfobilinogen deaminaza) (Uroporfirinogen I sintaza)	AIP	Porfobilinogen Aminolevulinska kislina
4. <b>Uroporfirinogen III sintaza</b> (Uroporfirinogen kosintaza) (Uroporfirinogen izomeraza)	KEP	
5. <b>Uroporfirinogen dekarboksilaza</b>	PKT in HEP	Uroporfirin, Porfirini
6. <b>Koproporfirinogen oksidaza</b>	HK	Porfobilinogen, Koproporfirin
7. <b>Protoporfirinogen oksidaza</b>	VP	Porfobilinogen, Protoporfirin
8. <b>Ferohelataza</b> (Hem sintaza) (Hem sintetaza) (Protohem ferolijaza)	EPP	Protoporfirin

Legenda: EPP eritropoetična protoporfirija, KEP kongenitalna eritropoetična porfirija, AIP akutna intermitentna porfirija, HK hereditarna koproporfirija, VP variegata porfirija, PKT porfirija kutanea tarda, HEP hepatoeritropoetična porfirija, PKT porfirija kutanea tarda (V oklepajih so uporabljena imena encimov do leta 1992).

lahko identificiramo tiste encime, pri katerih obstaja večje tveganje za podedovane motnje. Tehnične težave, povezane z encimskimi testi bodo delno odpravljene šele, ko bomo v kliničnih laboratorijih začeli rutinsko izvajati teste na genski osnovi. Primer je porfirija variegata, ki je povezana z znižano aktivnostjo protoporfirinogen oksidaze in ferohelataze. Tako je verjetno zaradi dejstva, da se ti encimi nahajajo v kompleksu v mitohondrijih in nestabilnost enega vpliva tudi na drugega. Z drugimi besedami: določitev znižanja encimske aktivnosti še ne pomeni, da smo odkrili vzrok zmanjšanja, saj je to lahko sekundarna posledica podedovanim motnjam (15). Večina nosilcev okvarjenih encimov, kot sta hidroksimetilbilan sintaza in uroporfirinogen dekarboksilaza nikoli ne razvijejo bolezni zaradi njihove znižane encimske aktivnosti (7). Z razvojem molekularne biologije na področju diagnostike monogenih in poligenih bolezni, ki se ukvarja z ugotavljanjem mutacij na enem ali obeh alelih genskega lokusa na avtosomnih kromosomih, se izboljšuje diagnostika in zdravljenje dednih porfirinskih motenj.

## 7 Sklep

Pogostnost porfirij v Sloveniji je približno enaka kot v ostalih državah po svetu. V zadnjih desetih letih je tehnični napredek na področju molekularne biologije bistveno pripomogel k diagnozi mnogih podedovanih porfirinskih motenj. V svetu se že v mnogih kliničnih laboratorijih, inštitutih in na fakultetah ukvarjajo z molekularno diagnostiko monogenih in poligenih bolezni. Laboratorijska diagnostika dednih porfirij z encimsko okvaro ostaja odprto vprašanje v prihodnosti.

Testiranje pridobljenih porfirinskih motenj se premalo uporablja. Zunanji dejavniki lahko bistveno in funkcionalno spremenijo biosintezo hema in lahko služijo kot značilni pokazatelji toksičnih vzrokov obravnavanih bolezni. Za specifičnega bolnika je ključen izbor primernih laboratorijskih testov za vrednotenje porfirinskih bolezni. Posebno mesto zavzemajo nujni primeri akutnih porfirij, pri katerih je potrebna kakovostna in učinkovita laboratorijska podpora za pravilno diagnozo porfirinskih bolezni in primerno zdravljenje.



## 8 Literatura

1. Scott T, Eagles M. In: Concise Encyclopedia Biochemistry Second Edition. Berlin-New York 1988: 470-473.
2. Thomas M. Devlin. Biochemistry with clinical correlations. In: William M. Awad, Jr. Iron and heme metabolism, Fifth Edition. New York 2002: 1063-1071.
3. Tipton KF. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. Eur J Biochem 1994; 1:1-5.
4. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 1995: 2103-51.
5. Dyer J, Garrick DP, Pye A. Plumboporphyria (ALAD deficiency) in lead worker: A scenario for potential diagnostic confusion. British Journal of Industrial Medicine 1993; 50:1119-1121.
6. Warren MJ, Scott AI. Tetrapyrrole assembly and modification into the ligands of biologically functional cofactors. Trends Biochem. Sci 1990; 15:486-491.
7. Kushner JP. Laboratory diagnosis of the porphyrias. N. Engl. J. Med 1991;324:1432-1434.
8. Pollock SS, Rosenthal MS. Images in clinical medicine: Diagnosis of porphyria. N.Engl. J. Med 1994; 330:114.
9. McManus JF, Begley CG, Ratnaike S. Complex pattern of alternative splicing in the normal uroporphyrinogen decarboxylase gene: Implications for diagnosis of familial porphyria cutanea tarda. Clin. Chem 1994; 40:1884-1889.
10. Woods JS, Miller HD. Quantitative measurement of porphyrins in biological tissues and evaluation of tissue porphyrins during toxicant exposures. Fundam. Appl. Toxicol 1993; 21:291-297.
11. Zachee P, Boogaerts MA, Lins RL, et al. Erythropoietin, aluminum, and anaemia in patients on haemodialysis. Lancet 1990; 335:1038-1039.
12. Takeda Y, Sawada H, Tashima M, et al. Erythropoietic protoporphyria without cutaneous photosensitivity and with ringed sideroblasts in an atomic bomb survivor. Lancet 1996; 347:395-396.
13. Hindmarsh JT. Enzyme heterogeneity in the porphyrias. Clin. Biochem 1990; 23: 371-374.
14. Rimington C. Was Hippocrates the first to describe a case of porphyria? Int. J. Biochem 1993; 25:1351-1352.
15. Schreiber WE. Acute intermittent porphyria laboratory diagnosis by molecular methods. Clin. Lab. Med 1995; 15:943-956.
16. Tefferi A, Solberg LA, Ellefson RD. Porphyrias: Clinical evaluation and interpretation of laboratory tests. Mayo Clin. Proc 1994; 69:289-290.
17. Labbe RF. Lead poisoning mechanisms. Clin. Chem 1990; 36:1870-1871.
18. Watson CJ, Taddeini L, Bossenmaier I. Present status of the Ehrlich aldehyde reaction for urinary porphobilinogen. Jama 1964; 190:501.
19. Lamon J, With TK, Redeker AG. The Hoesch test: Bedside screening for urinary porphobilinogen in patients with suspected porphyria. Clin. Chem 1974; 20:1438-1440.
20. Jamani A, Pudek M, Schreiber WE. Liquid-chromatographic assay of urinary porphobilinogen. Clin. Chem 1989; 35:471-475.
21. Sieg I, Doss MO, Kandels H et al. Effect of alcohol on  $\beta$ -aminolevulinic acid dehydratase and porphyrin metabolism in man. Clin. Chim. Acta 1991; 202:211-218.
22. Wu N, Li, B, Sweedler J. V. Recent developments in porphyrin separations using capillary electrophoresis with native fluorescence detection. J. Liquid Chromatogr 1994; 17:1917-1927.
23. Luo J. Analysis of urinary and faecal porphyrin excretion patterns in human porphyrias by fast atom bombardment mass spectrometry. J. Pharm. Anal 1997;15:1289-1294.
24. Buttery JE, Chamberlain BR, Gee D et al. Total porphyrin and coproporphyrin and uroporphyrin fractions in urine measured by second-derivative spectroscopy. Clin. Chem 1995; 41:103-106.
25. Zuijderhoudt FM, Koehorst SG, Kluitenberg WE et al. On accuracy and precision of a HPLC method for measurement of urine porphyrin concentrations. Clin Chem Lab Med 2000; 38:227-230.
26. Sato H, Ido K, Kimura K. Simultaneous separation and quantitation of free and metal-chelated protoporphyrins in blood by dimensional HPLC. Clin. Chem 1994; 40:1239-1244.
27. Todd DJ, Nesbitt GS, Lavery TD et al. Erythropoietic protoporphyria: The problem of a suitable screening test. Acta Derm. Venereol (Stockh) 1990; 70:347-350.
28. Schleiffenbaum BE, Minder EI, Mohr P et al. Cytofluorometry as a diagnosis of protoporphyria. Gastroenterology 1992; 102:1044-1048.
29. Zuijderhoudt FM, Kamphuis JS, Kluitenberg WE et al. Precision and accuracy of a HPLC method for measurement of fecal porphyrin concentrations. Clin Chem Lab Med 2002; 40:1036-1039