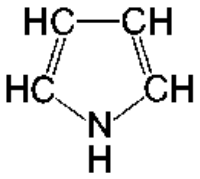
Porfyriny
a žlučová barviva

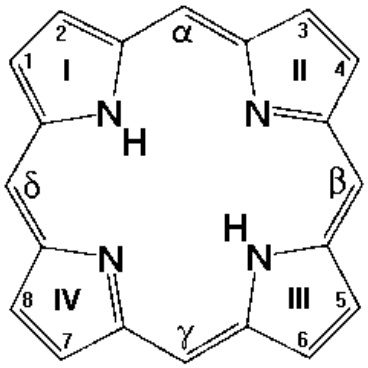
Evžen Křepela

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Porfyriny (makrocyklické tetrapyroly)



pyrrol

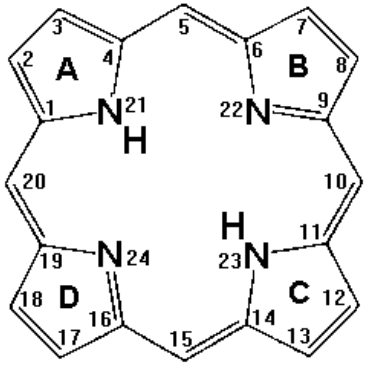


Fischerovo číslování
(staré)

pyrolové kruhy
I = A
II = B
III = C
IV = D

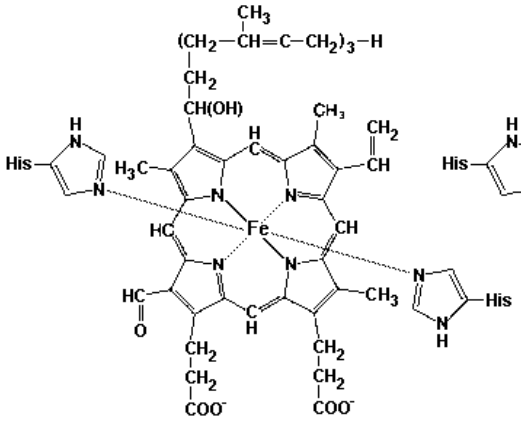
metinové můstky
α = 5
β = 10
γ = 15
δ = 20

polohy substituentů na kruzích
1 = 2
2 = 3
3 = 7
4 = 8
5 = 12
6 = 13
7 = 17
8 = 18



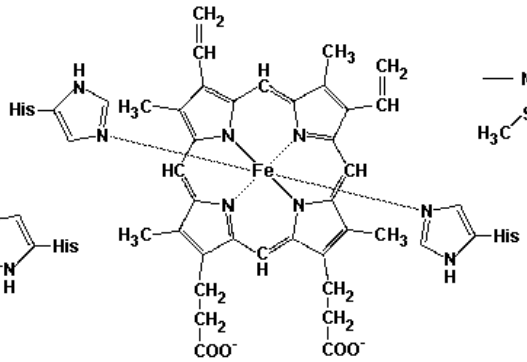
schema číslování 1 - 24
(nové)

Porfyriny se převážně vyskytují jako koordinační komplexy s ionty kovů (Fe, Co, Mg). Metaloporfyriny fungují jako prostetické skupiny biologicky významných hemoproteinů: hemoglobin, myoglobin, katalasa, peroxidasa, cytochrom-c oxidasa, cytochromy (b, c, P450), tryptophan-2,3-dioxygenasa, methylmalonyl-CoA mutasa, homocysteinmethyltransferasa, a chlorofyly



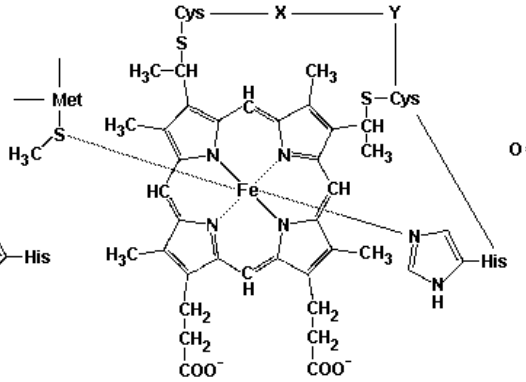
heme *a* of cytochrome-c oxidase

noncovalently bound



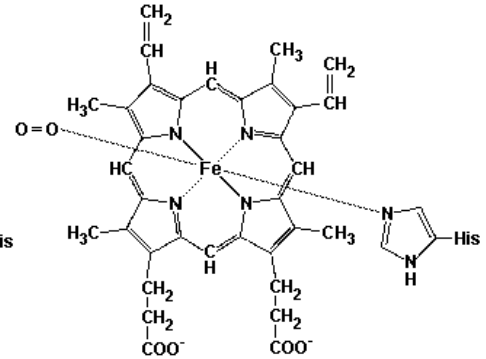
heme *b* of cytochrome b

noncovalently bound



heme *c* of cytochrome c

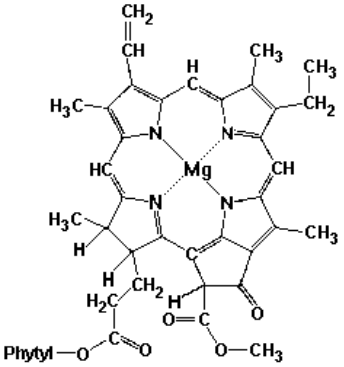
covalently bound



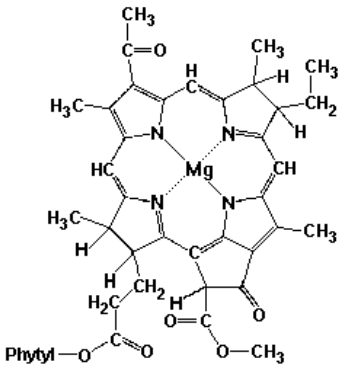
protoheme

noncovalently bound in hemoglobin and myoglobin

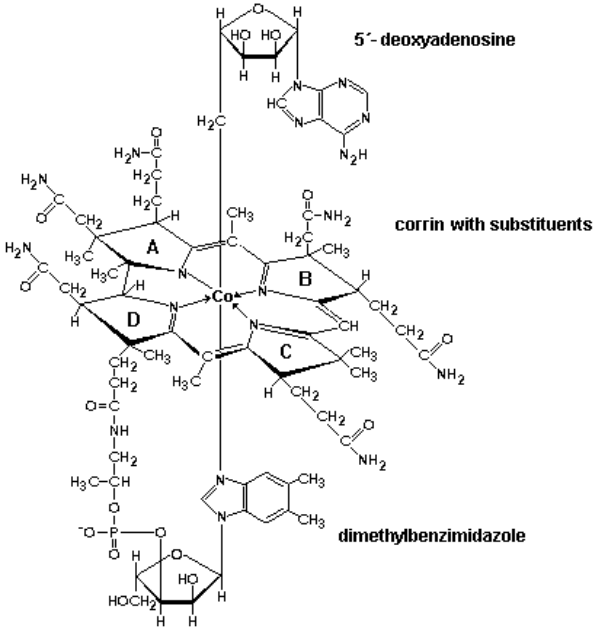
If the 5th and 6th coordination sites of iron are occupied no reaction with O_2 or CO is possible



chlorophyll *a*



bacteriochlorophyll *a*



5´-deoxyadenosine

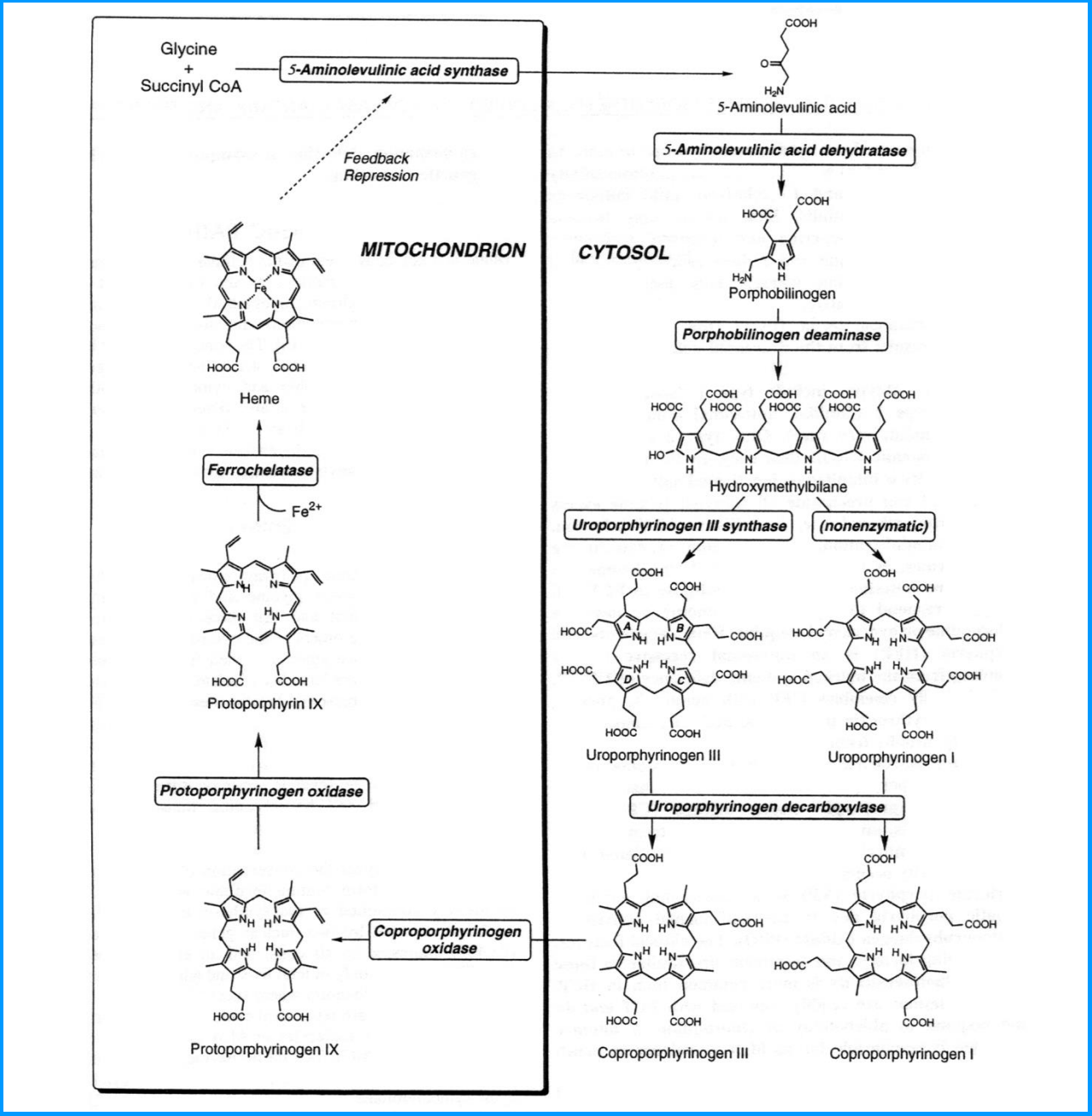
corrin with substituents

dimethylbenzimidazole

5´-deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B_{12})

(required by methylmalonyl-CoA mutase and homocysteine methyltransferase)

Biosyntéza hemu



Regulace exprese aminolevulátsynthasy 1

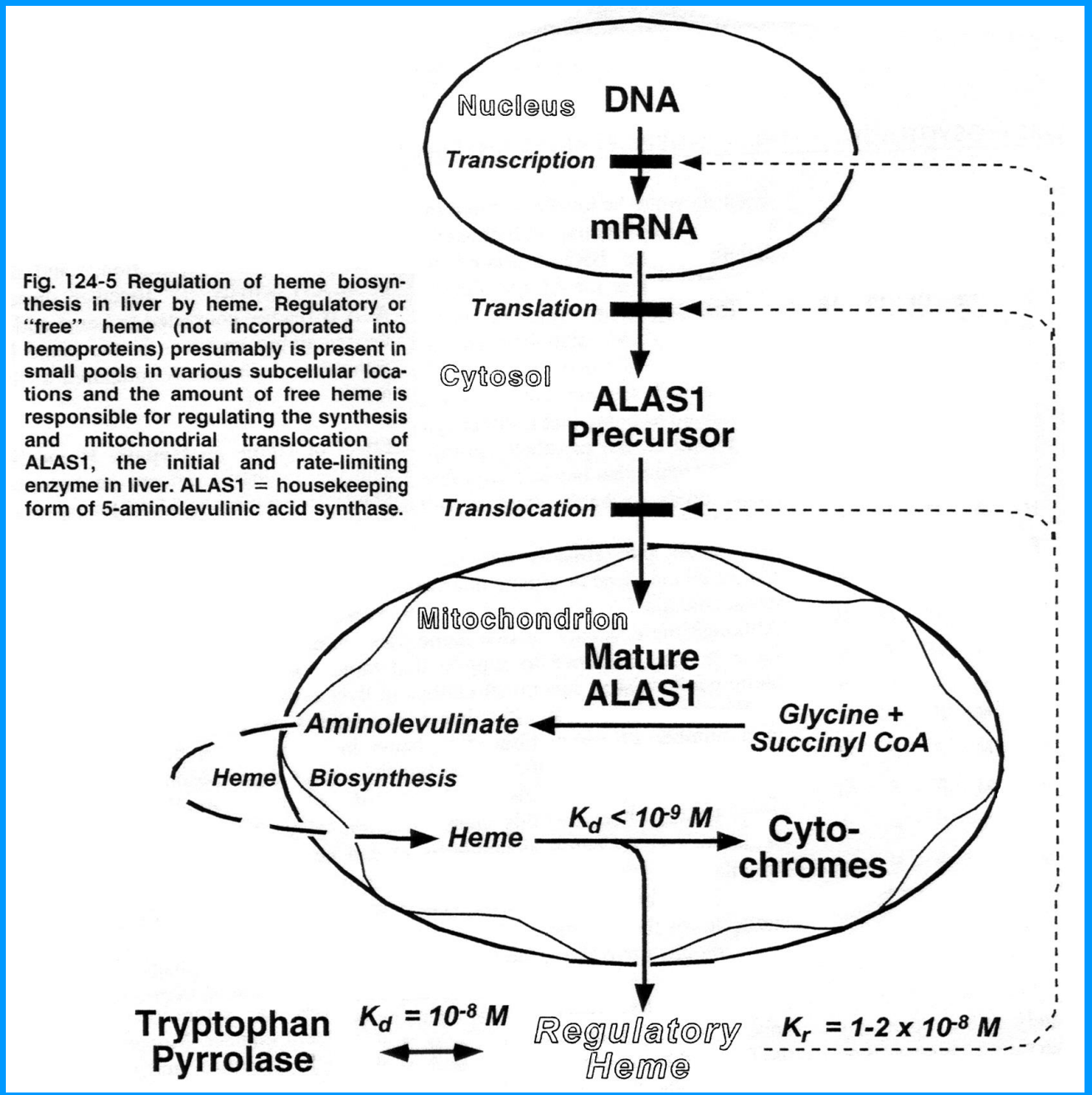


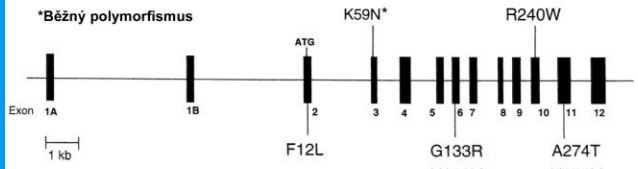
Fig. 124-5 Regulation of heme biosynthesis in liver by heme. Regulatory or "free" heme (not incorporated into hemoproteins) presumably is present in small pools in various subcellular locations and the amount of free heme is responsible for regulating the synthesis and mitochondrial translocation of ALAS1, the initial and rate-limiting enzyme in liver. ALAS1 = housekeeping form of 5-aminolevulinic acid synthase.

Klasifikace lidských porfyrií sdružených s deficitem specifických enzymů biosyntetické dráhy hemu

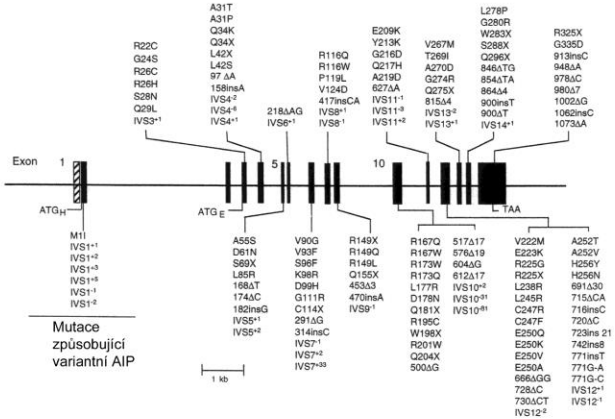
Porfyrie	Mutovaný gen a deficitní enzym	Aktivita enzymu (% normálních hodnot)	Typ porfyrie (Průběh)	Dědičnost†	Hlavní symptomatologie	Biochemické nálezy*		
						Erytrocyty	Moč	Stolice
Porfyrie z deficitu 5-aminolevulinát-dehydratasy (ADP)	5-aminolevulinát-dehydratasa (ALAD)	2	Hepatální‡ (Akutní)	AR	Neurovisceralní	Zn-protoporfyrin	ALA, koproporfyrin	
Akutní intermitentní porfyrie (AIP)	porfobilinogen-deaminasa (PBGD)	50	Hepatální (Akutní)	AD	Neurovisceralní		ALA, PBG,§ uroporfyrin	
Kongenitální erytropoetická porfyrie (CEP)	uroporfyrinogen III synthasa (UROS)	<15	Erytropoetický (Chronický)	AR	Fotosensitivita kůže	uroporfyrin I, koproporfyrin I	uroporfyrin I, koproporfyrin I	koproporfyrin I
Porphyria cutanea tarda (PCT)	uroporfyrinogen-dekarboxylasa (UROD)	50	Hepatální (Chronický)	AD¶	Fotosensitivita kůže		uroporfyrin, heptakarboxyporfyrin	isokoproporfyrin
Hepatoerytropoetická porfyrie (HEP)	uroporfyrinogen-dekarboxylasa (UROD)	<25	Hepatální‡ (Chronický)	AR	Fotosensitivita kůže	Zn-protoporfyrin	uroporfyrin, heptakarboxyporfyrin	isokoproporfyrin
Hereditární koproporfyrie (HCP)	koproporfyrinogen-oxidasa (CPO)	50	Hepatální (Akutní)	AD	Neurovisceralní a občas fotosensitivita kůže		ALA, PBG, koproporfyrin	
Porphyria variegata (VP)	protoporfyrinogen-oxidasa (PPO)	50	Hepatální (Akutní)	AD	Neurovisceralní a fotosensitivita kůže		ALA, PBG, koproporfyrin	koproporfyrin, protoporfyrin
Erytropoetická protoporfyrie (EPP)	ferochelatasa	30	Erytropoetický (Chronický)	AD	Fotosensitivita kůže	volný protoporfyrin		protoporfyrin

*Uvedeny pouze hlavní zvýšené komponenty.
†AR = autosomální recesivní, AD = autosomální dominantní.
‡Tyto porfyrie mají také erytropoetické vlastnosti včetně zvýšení erytrocytárních porfyrinů.
§ALA = 5′-aminolevulinát, PBG = porfobilinogen.
¶Dědičný deficit UROS je částečné odpovědný za familiární (typ II) PCT.

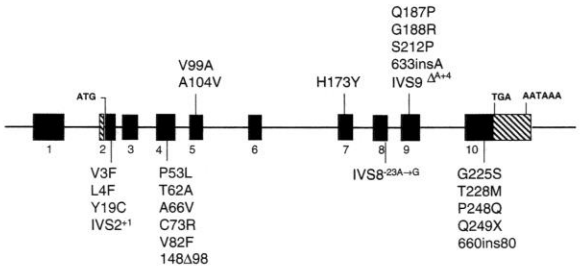
Mutace genů kódujících enzymy biosyntetické dráhy hemu jsou příčinou dědičných porfyrií



Lidský ALAD gen a lokalizace mutací způsobujících ADP.

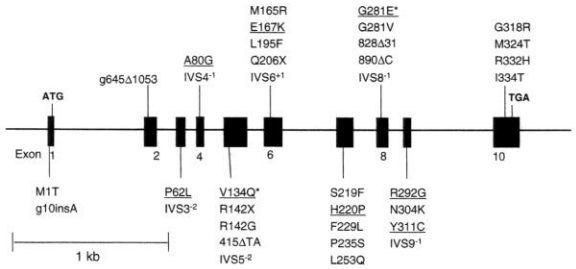


Lidský PBGD gen a lokalizace některých z mnoha mutací způsobujících AIP.

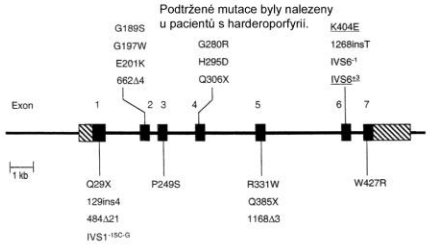


Lidský UROS gen a lokalizace mutací způsobujících CEP.

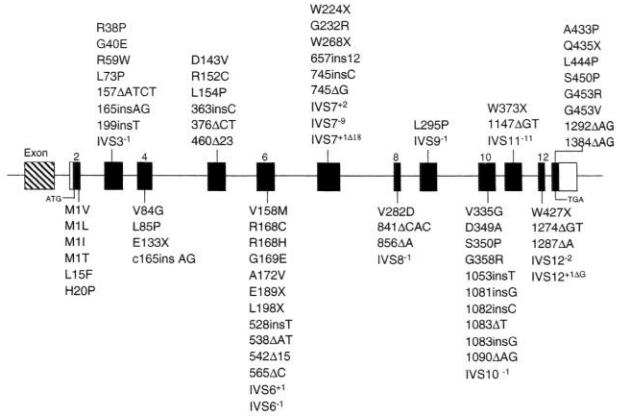
Mutace identifikované u HEP jsou podtrženy.
*Mutace, které byly identifikovány u PCT i u HEP.



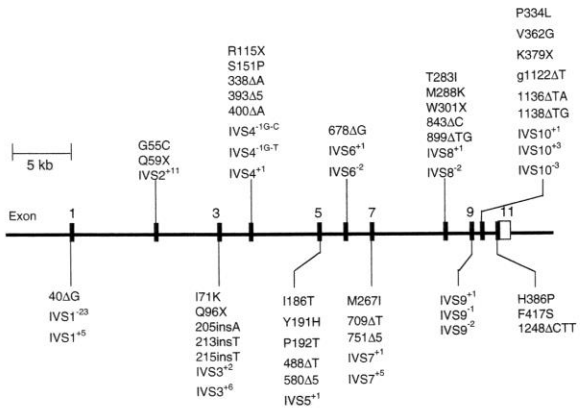
Lidský UROD gen a lokalizace mutací způsobujících familiární (typ 2) PCT a HEP.



Lidský CPO gen a lokalizace mutací způsobujících HCP.



Lidský PPO gen a lokalizace mutací způsobujících PV.



Lidský gen ferochelatasy a lokalizace mutací způsobujících EPP.

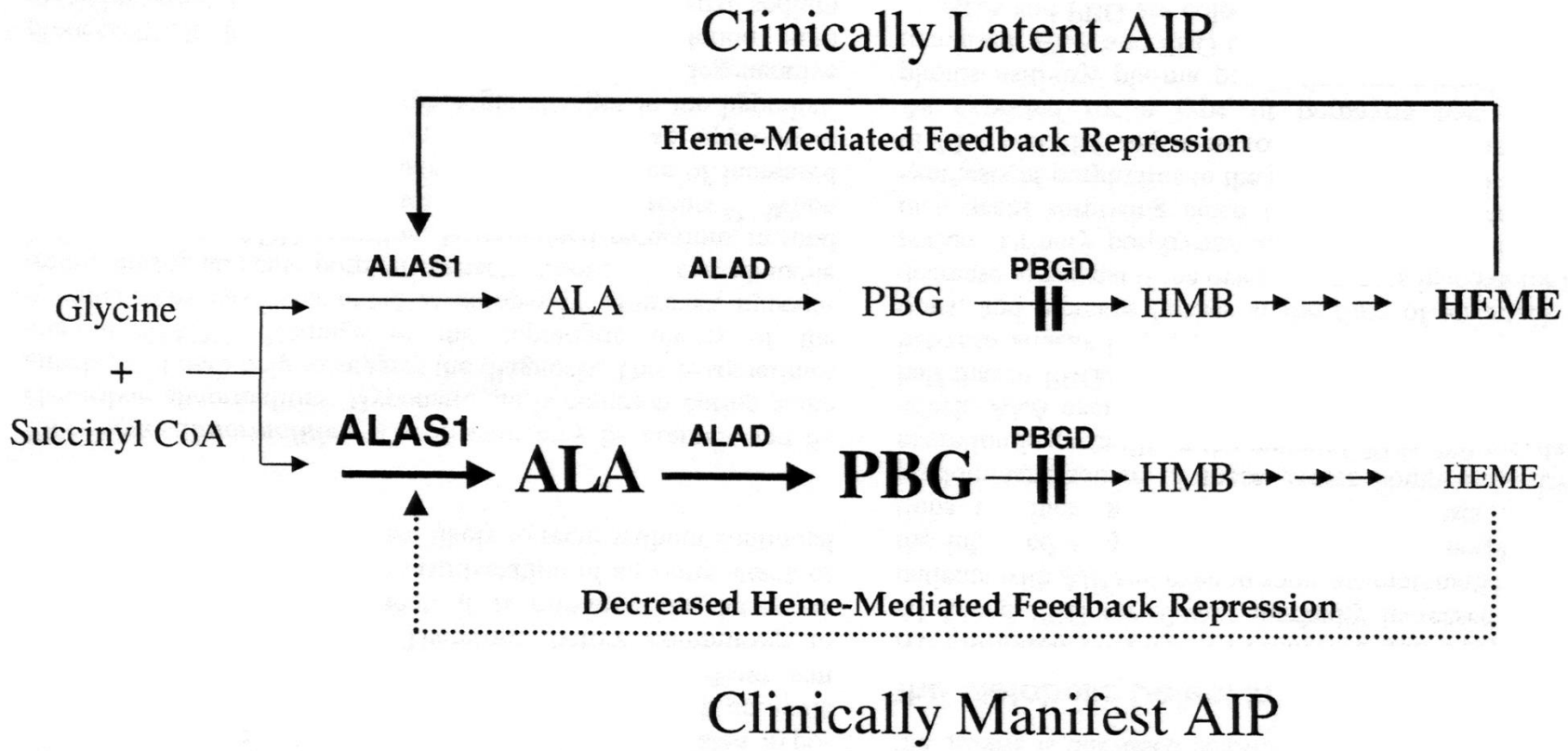


Fig. 124-13 Enzymatic block in AIP and loss of heme-mediated repression of hepatic ALAS1 when the disease is made clinically manifest by precipitating factors such as drugs, steroids, and dietary alterations. In the presence of PBGD deficiency, factors that stimulate heme synthesis result in decreased availability of heme for the regulatory heme pool in hepatocytes. ALA 5-aminolevulinic acid; ALAD = 5-aminolevulinic acid dehydratase; ALAS1 = ALA synthase, housekeeping form; HMB = hydroxymethylbilane; PBG = porphobilinogen; PBGD = porphobilinogen deaminase.

Kategorie bezpečných a nebezpečných léků u akutních porfyrií *

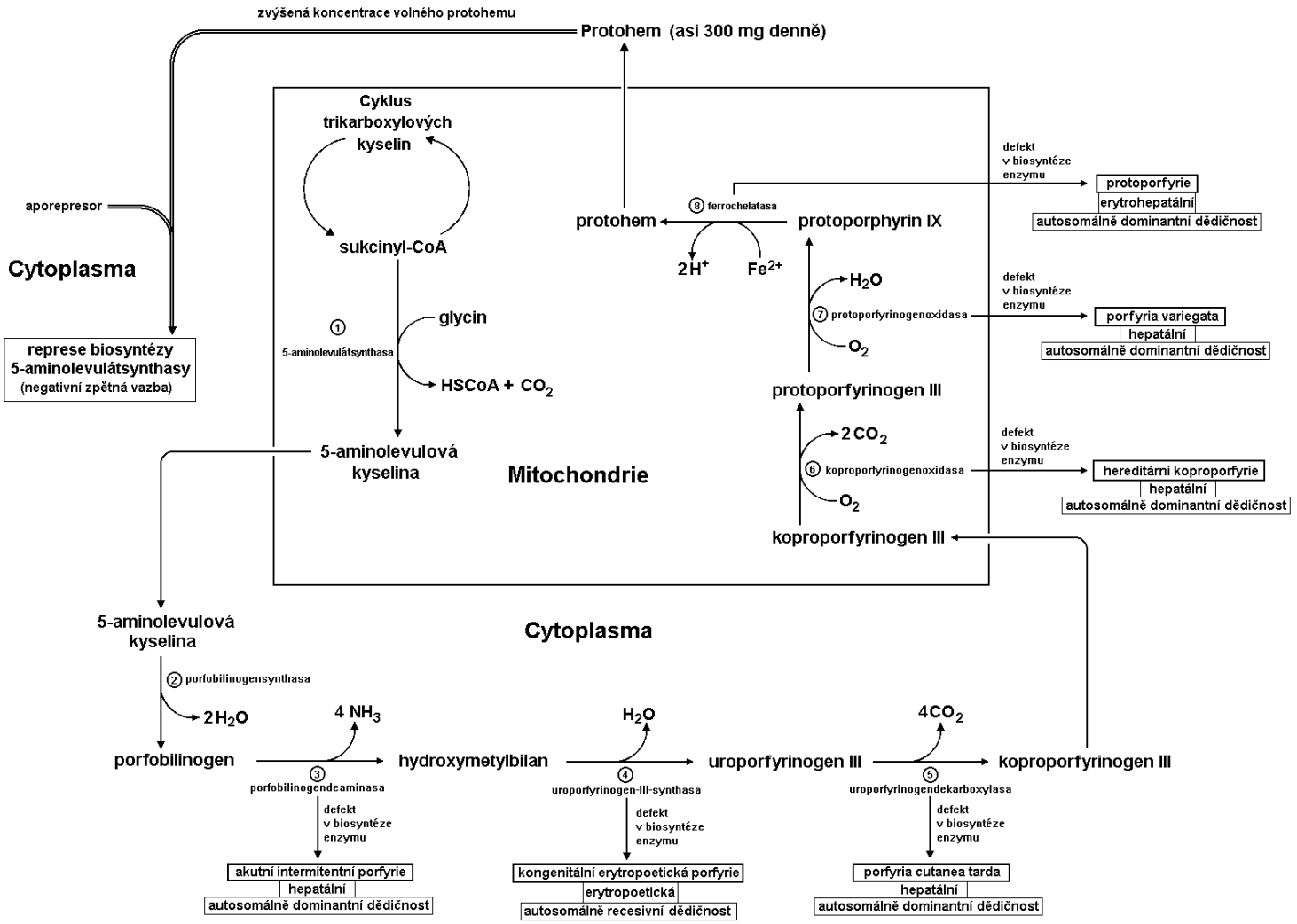
Bezpečné	Pravděpodobně bezpečné	Potenciálně nebezpečné	Nebezpečné
Acetaminophen (paracetamol)[383,968] Acetazolamide[383,386] Allopurinol[383,386] Amiloride[383,386] Aspirin[383,968] Atropine[383,968] Bethanidine[383,384] Bromides[466,974] Bumetanide[386] Chloral hydrate[39,255,383] Cimetidine[459] Corticosteroids[279,383] Coumarins[383] Fluoxetine[383,386,387] Gabapentin[468] Gentamycin[383] Guanethidine[39,279,384] Insulin[383,967] Narcotic analgesics[39,383] Ofloxacin[383] Penicillin and derivatives[279,383,967] Phenothiazines[39,383] Propranolol[279,1008] Streptomycin[279,383] Succinylcholine[383,967] Tetracycline[279]	Adrenaline[383] Azathioprine[988,993] Chloramphenicol[968,969] Cisapride[383] Colchicine[233,383] Cytarabine[987] Chloroquine[233,383] Digoxin[383] Daunorubicin[987] Doxazosin[384] Estrogens (natural/endogenous)[370,469,1006,1007] Ibuprofen[383] Indomethacin[383] Labetalol[383] Lithium[383] Losartan[380] Methenamine[279] Methylphenidate[383,969] Naproxen[383] Neostigmine[279,383] Nitrous oxide[279,383] Penicillamine[383] Procaine[383] Propanidid[279,383] Propofol[383] Propoxyphene[279,383] Rauwolfia alkaloids[279] 6-Thioguanine[987] Thiouracils[383] Thyroxine[383] Tubocurarine[383] Vigabatrin[468] Vitamin B[279] Vitamin C[279]	Alfadolone acetate[985,986] Alfaxolone[985,986] Alkylating agents [cyclophosphamide, ifosfamide, busulphan, altretamine (hexamethylmelamine); dacarbazine, chlorambucil, and melphalan may be safer)][388,967,981,987,988] Altretamine (hexamethylmelamine, see alkylating agents) Amitriptyline (see tricyclic antidepressants) Benzodiazepines[383,989,990] Busulphan (see alkylating agents) Captopril (see ACE inhibitors) Cephalosporins[383] Chlorambucil (see alkylating agents) Chlordiazepoxide[968,969,991] Clonidine[15,992] Cyclophosphamide (see alkylating agents) Cyclosporin[383,993] Diazepam[968,969,991] Diltiazem (see calcium channel blockers) Colistin[383] Dacarbazine (see alkylating agents) Diphenhydramine[383,969] EDTA (see iron chelators) Etomidate[383,986,994] Estrogens (synthetic)[474,995] Erythromycin[383] 5-Fluorouracil[988] Gold compounds (see heavy metals) Fluroxene[996,997] Heavy metals[383,967,971,998] Hydralazine[39,383] Hyoscine[383] Ifosfamide (see alkylating agents) Imipramine (see tricyclic antidepressants) Iron chelators (DFO, EDTA) Ketamine[383,390] Lisinopril (see ACE inhibitors) Mefenamic acid[383] Melphalan (see alkylating agents) Mifepristone (RU-486)[999,1000] Methyldopa[383,971] Metyrapone[969] Nalidixic acid[383] Nikethamide[383,967,969,970] Nitrazepam[383,991] Nitrofurantoin[279,383] Nortriptyline (see tricyclic antidepressants) Pentazocine[380,383,971,986,1001] Phenoxybenzamine[39] Procarbazine[988] Pyrazinamide[967,1002] Spironolactone[39,383] Theophylline[383,967] Tiagabine[468] Tramadol[380] Tricyclic antidepressants[383,386,967,968,1003] Troglitazone[1004,1005]	ACE inhibitors (especially enalapril)[380,383] Antipyrine (phenazone)[383,967,968] Aminopyrine (amidopyrine)[383,967,968] Aminoglutethimide[383,969] Barbiturates[248,254,256,383,968] N-Butylscopolammonium bromide[383] Calcium channel blockers (especially nifedipine)[380–382,384] Carbamazepine[383,467] Carisoprodol[383] Chlorpropamide[383,967,970–972] Danazol[475,476] Dapsone[383,973] Diclofenac[383] Enalapril (see ACE inhibitors) Diphenylhydantion[256,466,467,974] Ethosuximide (see succinimides) Ergot preparations[383,971] Ethchlorvynol[967] Ethinamate[970] Felbamate[468] Glutethimide[279,969,971] Griseofulvin[49,975] Ketoconazole[383] Lamotrigine[468,976] Mephenytoin[383,969,977] Metoclopramide[368,369,978] Meprobamate[39,383,969] Methyprylon[39,383,969] Nefazadone[387] Nifedipine (see calcium channel blockers) Novobiocin[383] Phenylbutazone[34,383,967,968] Primidone[383] Pargyline[39,383,969] Progesterone & progestins[370,979] Rifampin[383,980,981] Succinimides[383,969] Sulfasalazine[982] Sulfonamide antibiotics[256,383] Sulfonmethane (Sulfonal) & sulfonethylmethane(Trional)[983] Sulfonylureas[383,970] Trimethadione[383,969,977] Valproic acid[466,984] Tranylcypromine[969]

Léky (generické názvy) jsou zařazeny do čtyř kategorií v závislosti na síle důkazů o jejich bezpečné aplikaci. Je značné množství důkazů pro klasifikaci léků na kategorie “bezpečné” a “nebezpečné”, avšak málo důkazů či konfliktní důkazy pro další dvě kategorie léků. Tento seznam zdaleka není vyčerpávající a nereflektuje všechny informace a názory o aplikační bezpečnosti léků u akutních porfyrií. Některé citované reference mohou odrážet spíše konflitní názory než podporovat tuto klasifikaci.

Další informace jsou dostupné na webové adrese Americké porfyrické nadace: www.enterprise.net.apf

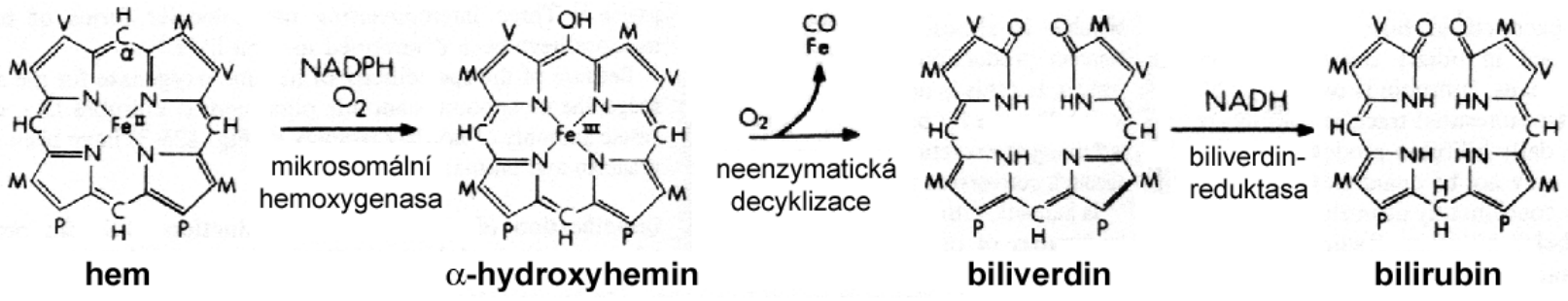
Souhrn biosyntézy protohemu
a negativní regulace 5-aminolevulátsythasy,
klíčového enzymu pro biosyntézu biologicky významných metaloporfyrinů.

Porfyrie, vrozené poruchy metabolismu protohemu.

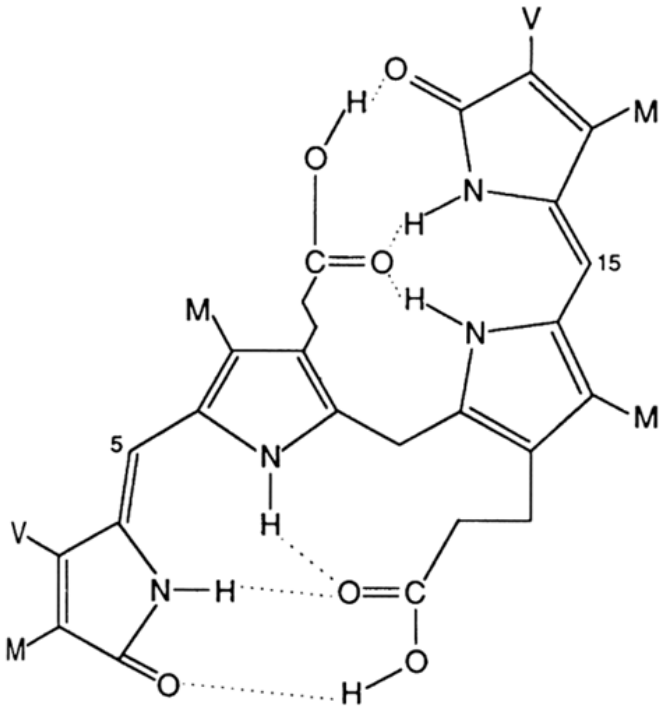


Porfyrinogeny jsou bezbarvé, zatímco porfyriny jsou zbarvené a každý porfyrin vykazuje charakteristické absorpční spektrum jak ve viditelné tak i v ultrafialové oblasti. Všechny porfyriny silně absorbují světelné záření o vlnové délce blízké 400 nm (Soretův absorpční pás).
Porfyriny emitují silně červenou fluorescenci po ozáření ultrafialovým světlem.

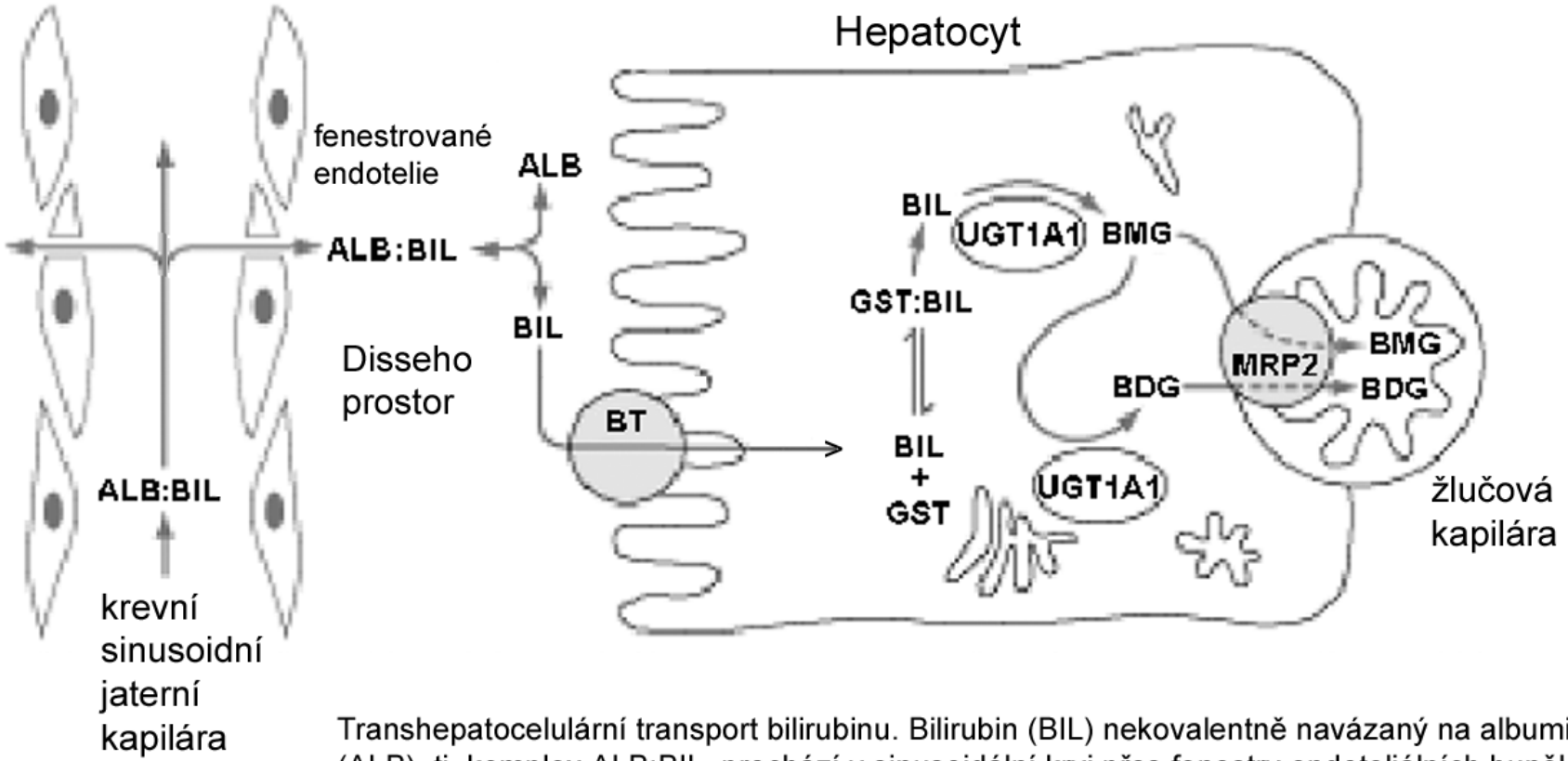
Biodegradace hemu



Mechanismus odbourávání hemu na biliverdin a redukce biliverdinu na bilirubin.



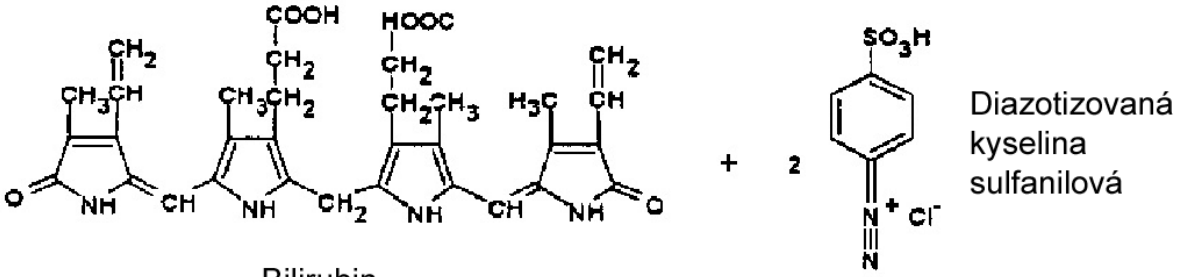
Konformace bilirubinu ukazující intramolekulární strukturu vodíkových vazeb mezi NH a O skupinami a OH a O skupinami. Přes přítomnost polárních karboxylových skupin bilirubin je nepolární a lipofilní. Po přerušení intramolekulárních vodíkových vazeb bilirubinu glukuronidací nebo konverzí bilirubinu na konfigurační nebo strukturní izomery vznikají ve vodě rozpustné bilirubinové pigmenty.



Transhepatocelulární transport bilirubinu. Bilirubin (BIL) nekovalentně navázaný na albuminu (ALB), tj. komplex ALB:BIL, prochází v sinusoidální krvi přes fenestry endoteliálních buněk do Disseho prostoru, odkud disociovaný bilirubin vstupuje do hepatocytu přes jeho plasmatickou membránu mechanismem usnadněné difuse zprostředkované bilirubinovým transporterem (BT). Uvnitř hepatocytu je bilirubin navázán na glutathion-S-transferasu (GST) a komplex GST:BIL difunduje do hladkého endoplasmatického retikula, kde je disociovaný biliruin esterifikován na monoglukuronid (BMG) a pak na diglukuronid (BDG) účinkem bilirubin-UDP-glukuronidtransferasy (UGT1A1). Bilirubinglukuronidy jsou aktivně transportovány přes kanalikulární plasmatickou membránu hepatocytu do žluči. Aktivní transport je závislý na ATP a je zprostředkován MRP2 transportním proteinem.

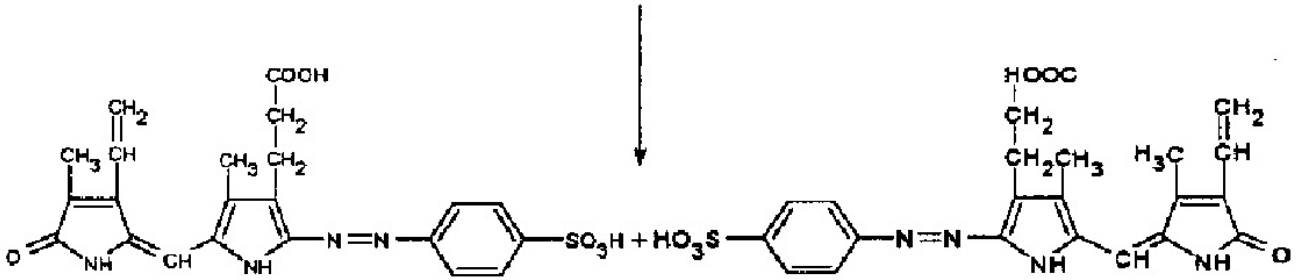
Stanovení bilirubinu jako diazopigmentu van den Berghovou metodou

Přímo reagující bilirubin	Nepřímo reagující bilirubin
Estery bilirubinu (hlavně bilirubin monoglukuronid a bilirubin diglukuronid)	Neesterifikovaný bilirubin (hlavně komplexy bilirubin : albumin a bilirubin : fosfolipid : albumin) a) po denaturaci s methanolem, b) po vytěsnění s acetátem, benzoanem, kofeinem, nebo difilinem.



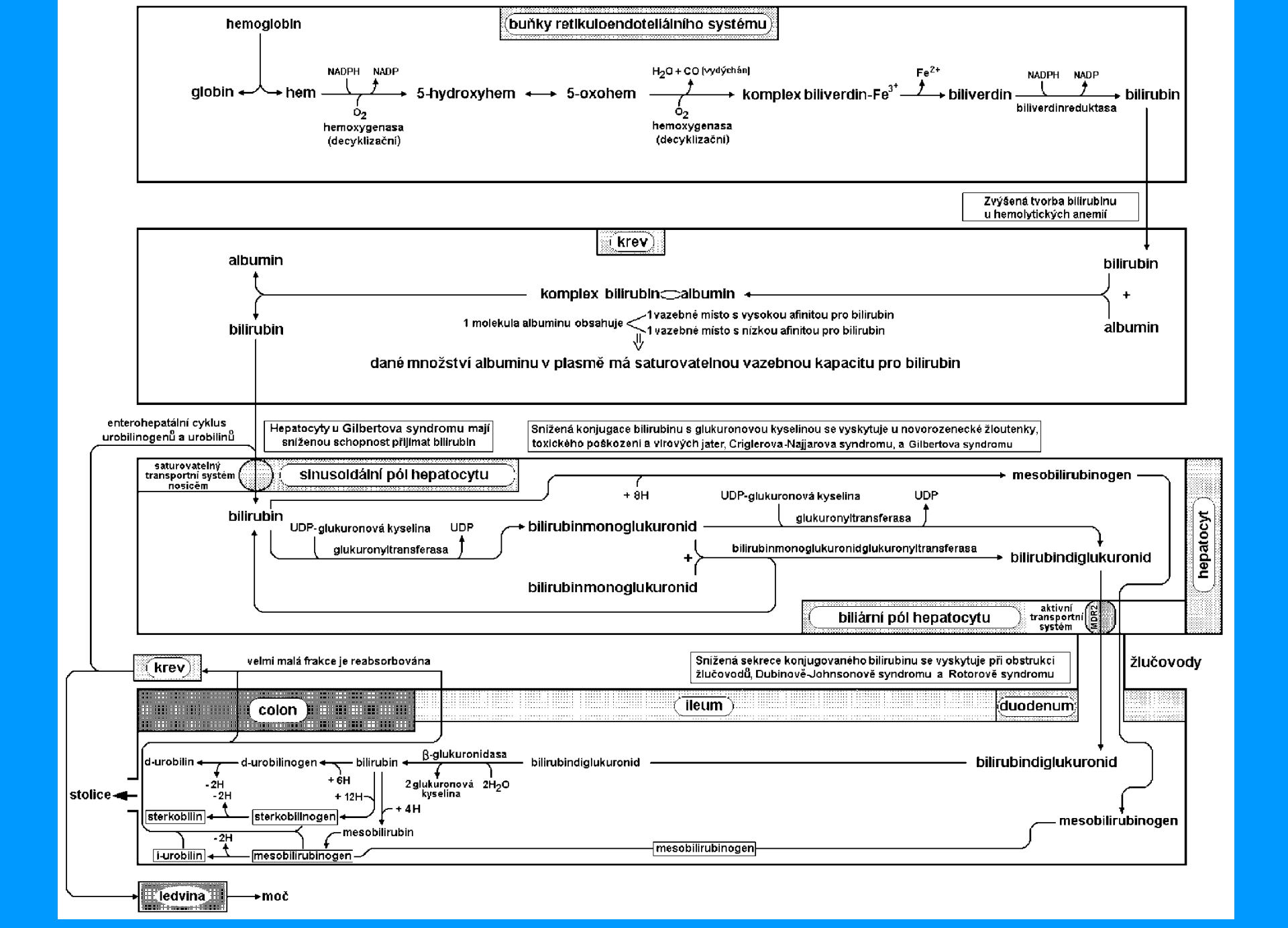
Bilirubin

Diazotizovaná kyselina sulfanilová



Diazopigment A (směs dvou izomerů)

Souhrn katabolismu hemu a metabolismu žlučových barviv



Faktory ovlivňující koncentraci neesterifikovaného bilirubinu v séru

Vzestup	Pokles*
Hladovění◊ Fyzická aktivita Těhotenství Estrogeny, orální kontraceptiva Alkoholické nápoje Sepse	Ultrafialové záření Kortisol Sulfonamidy Fenobarbital

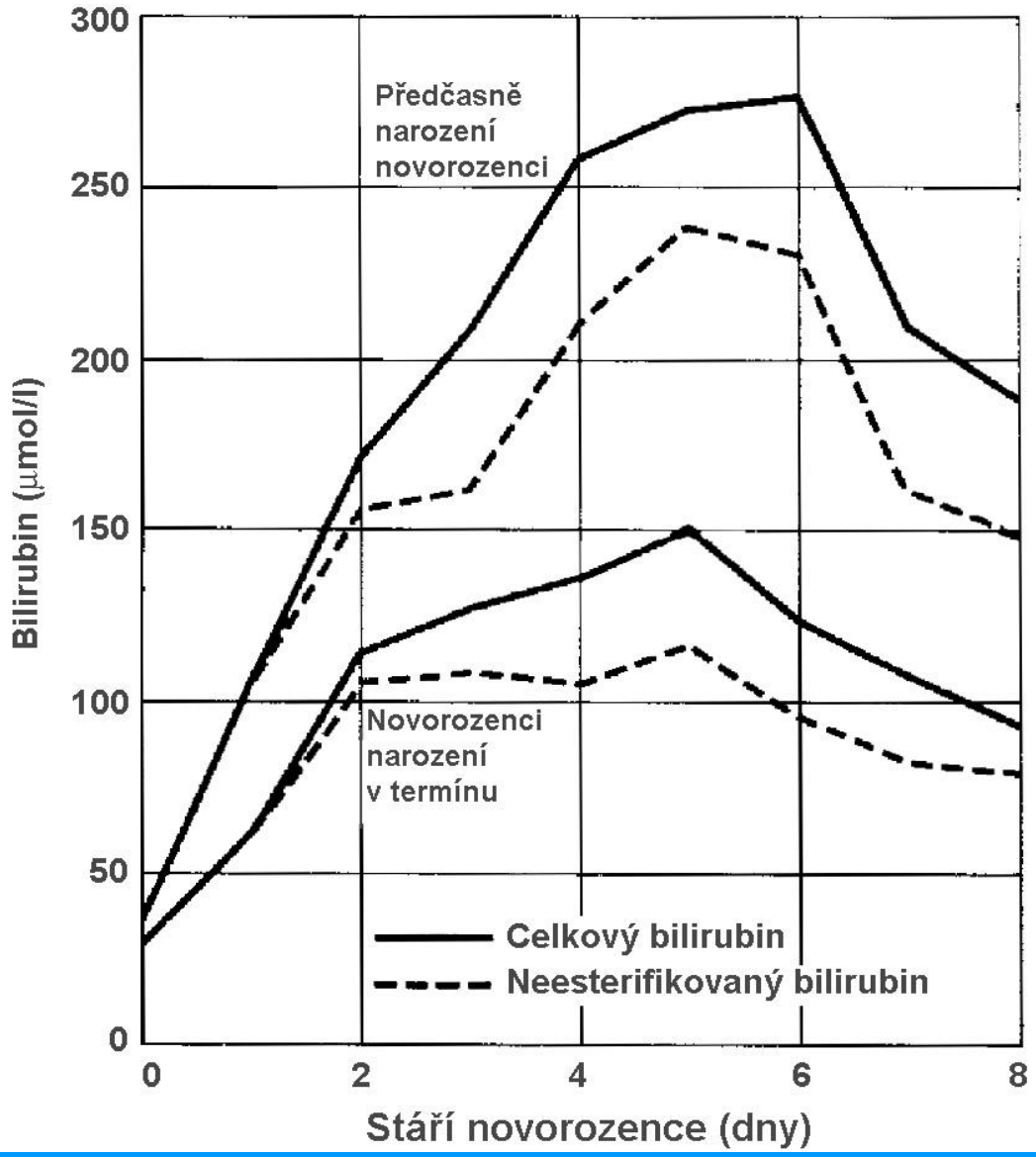
◊ Zejména u Gilbertova syndromu

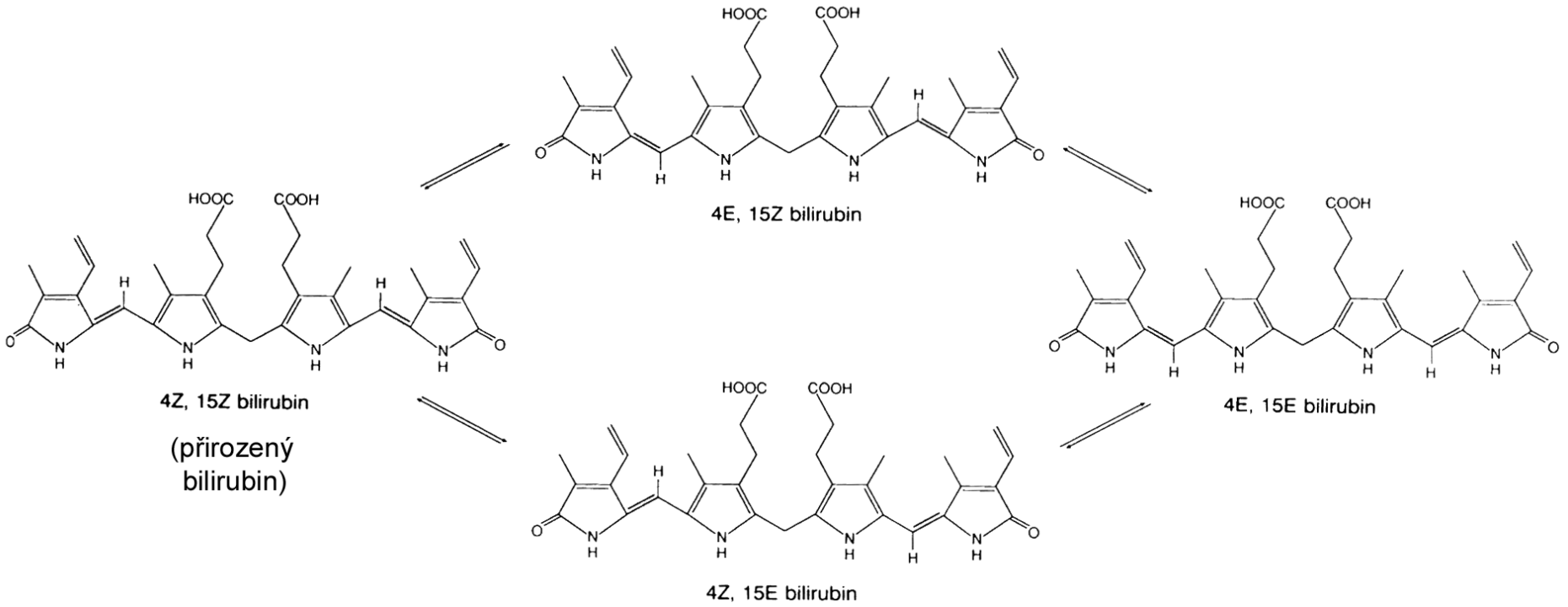
*Buď z důvodu migrace bilirubinu do tkání (čímž vzniká riziko jádrového ikteru u novorozence, např. po podání sulfonamidů) nebo z důvodu zvýšení metabolismu (esterifikace) bilirubinu v játrech (např. po podání fenobarbitalu, který indukuje tvorbu UGT1A1).

Interpretace hodnot neesterifikovaného (nepřímého) bilirubinu v séru

Koncentrace neesterikovaného bilirubinu v séru μmol/l	Rychlost produkce bilirubinu	Odklízení bilirubinu játry
< 17	obvykle normální	obvykle normální
17 – 60	zvýšená nebo normální	normální nebo snížené
> 60	zvýšená nebo normální	obvykle snížené

Fyziologická žloutenka novorozenců:
celkový bilirubin a neesterifikovaný bilirubin v séru
u 10 novorozenců narozených v termínu a
u 23 novorozenců narozených v předtermínu.





Fotoizomery bilirubinu. Přtomnost dvou methenových můstků obsahujících dvojnou vazbu je příčinou vzniku konfiguračních (geometrických) izomerů bilirubinu. Každá dvoujná vazba může existovat v Z nebo E konfiguraci. Přirozeně se vyskytující, nejvíce stabilní a ve vodě nerozpustná forma bilirubinu je Z,Z izomer. Tento izomer podléhá fotoizomerizaci na konfigurační izomery (Z,E; E,Z a E,E), které jsou mnohem polárnější v důsledku nemožnosti tvorby intramolekulárních vodíkových vazed a jsou vylučovány z jater bez glukuronidace. Určitá část fotoizomerů bilirubinu je taktéž vyloučena do moče.

Laboratorní výsledky u zdravých jedinců a u pacientů se třemi různými příčinami žloutenky

Stav	Bilirubin v séru	Urobilinogen v moči	Bilirubin v moči	Urobilinogen ve stolici
Zdraví	3 - 20 μmol/l (z tohoto celkového* bilirubinu je asi 95% tvořeno bilirubinem nekonjugovaným)	0 - 4 mg/24 h	Nepřítomen	40 - 280 mg/24 h
Hemolytická anemie	Zvýšen nekonjugovaný**	Zvýšen	Nepřítomen	Zvýšen
Obstrukce žlučových cest	Zvýšen konjugovaný ***	Nepřítomen	Přítomen	Stopy nebo absence
Akutní virová hepatitida	Zvýšen konjugovaný i nekonjugovaný	Zvýšen v preiktterické fázi. Snížen nebo nepřítomen v iktterické fázi (nastala-li mikroobstrukce žlučových kanálků).	Přítomen (nastala-li mikroobstrukce žlučových kanálků).	Snížen nebo stopy

*Celkový bilirubin je bilirubin nekonjugovaný a konjugovaný dohromady.

**Nekonjugovaný bilirubin je bilirubin neesterifikovaný (tj. nepřímý).

***Konjugovaný bilirubin je bilirubin esterifikovaný (tj. přímý).

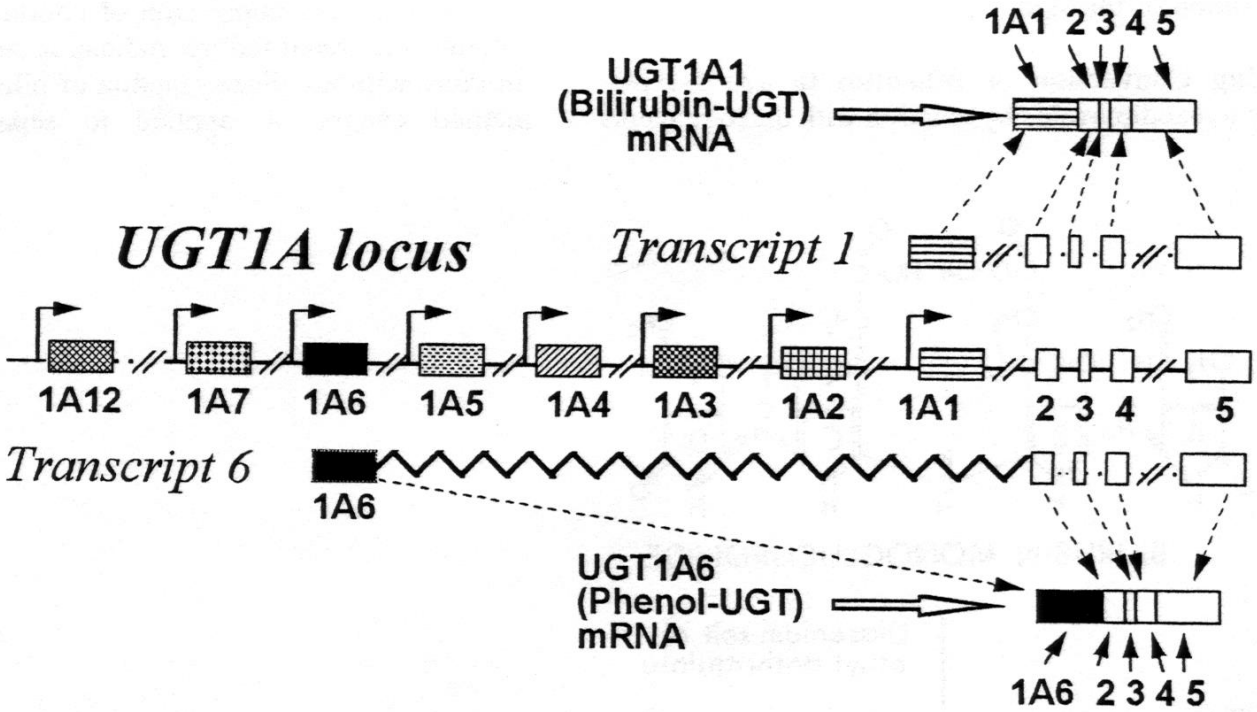


Fig. 125-10 Schematic representation of the human *UGT1A* locus, located at 2q37. This locus contains multiple genes that express bilirubin-UGT and several other UGT isoforms. Exons 2, 3, 4, and 5, located at the 3′ end of *UGT1A*, encode the identical C-terminal domains of all UGT isoforms expressed from this locus. Upstream to these common region exons are a series of unique exons (exons 1A1 through 1A12), each of which encodes the variable N-terminal domain of a different UGT isoform expressed from this locus. Each unique region exon is preceded by a separate promoter region (shown by arrows), permitting independent regulation of gene expression. Transcription can start from any of the promoters, producing transcripts of varying lengths. The unique exon located at the 5′ end of the transcript is spliced to the 3′ end of exon 2, and other unique region exons present in the transcript are spliced out. Thus, based on differential promoter usage, several mRNAs, each encoding a different member of the UGT1A subfamily, are generated. Genes belonging to this locus are named according the unique exon used in the expressed mRNA. Thus, when the transcription starts 5′ to exon 1A1 (transcript 1 in the figure), the mRNA encoding bilirubin-UGT is generated. This gene, which consists of exon 1A1 plus the common region exons 2 to 5, is termed *UGT1A1*, and the expressed enzyme is termed UGT1A1. If, on the other hand, the transcription starts 5′ to exon 1A6 (Transcript 6 in the figure), an mRNA consisting of exon 1A6 plus exons 2 to 5 is generated. This mRNA encodes a UGT isoform that accepts simple phenolic substrates, but not bilirubin. According to the current system of terminology, this gene is named *UGT1A6*, and the expressed isoform is termed UGT1A6.

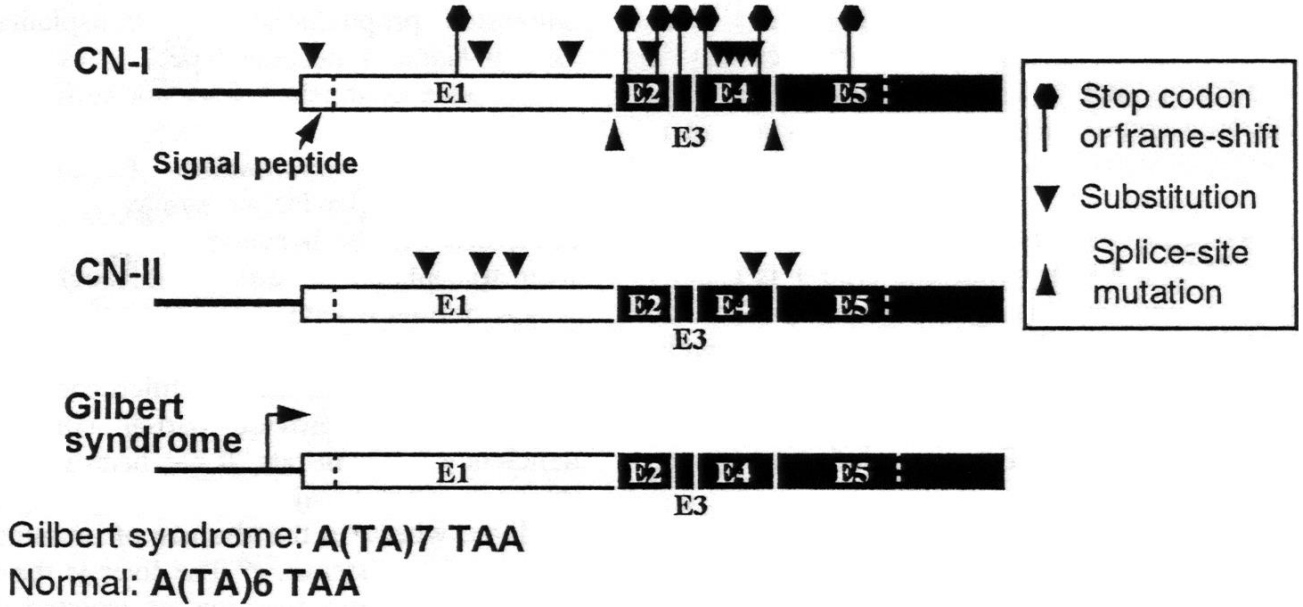


Fig. 125-16 Genetic lesions causing Crigler-Najjar syndrome type I, Crigler-Najjar syndrome type II, and Gilbert syndrome. Crigler-Najjar syndrome type I is produced by mutations, deletions, or insertions within the five exons that constitute the UGT1A1 mRNA. These genetic lesions may cause premature stop codons or substitution of a single amino acid. In two cases, there were mutations in the splice donor sequences on intron 1 and splice acceptor region of intron 4, respectively, resulting in the utilization of cryptic splice sites within exons, with consequent deletion of a segment of an exon from the mRNA. Crigler-Najjar syndrome type II is also caused by genetic lesions within the coding region of *UGT1A1*. In these cases, however, the mutations result in single amino acid substitutions that reduce the catalytic activity of the enzyme, but does not abolish it. In contrast to the two types of Crigler-Najjar syndrome, Gilbert syndrome is associated with a variant TATAA box, which contains two extra nucleotides, TA. This results in reduced expression of structurally normal UGT1A1.

Hlavní diferenciální charakteristiky Criglerova-Najjarova syndromu typu I a II a Gilbertova syndromu

Vlastnost	Criglerův-Najjarův syndrom		Gilbertův syndrom
	Typ I	Typ II	
Celkový sérový bilirubin, μmol/l	310-755 (obvykle > 345)	100-430 (obvykle ≤ 345)	typicky ≤ 70 μmol/l v nepřítomnosti hladovění nebo hemolýzy
Rutinní jaterní testy	normální	normální	normální
Odpověď na fenobarbital	žádná	pokles bilirubinu o > 25%	pokles bilirubinu k normálnín hodnotám
Jádrový ikterus	obvyklý	vzácný	nepřítomen
Histologie jater	normální	normální	obvykle normální; u některých pacientů zvýšení lipofuscinu
Charakteristiky žluči			
barva:	světlá nebo bezbarvá	pigmentovaná	normální tmavá barva
frakce bilirubinu:	> 90% nekonjugovaný	největší frakce (průměr=57%) monokonjugáty bilirubinu	hlavně dikonjugáty bilirubinu, avšak monokonjugáty zvýšeny (průměr=23%)
Aktivita bilirubin-UDP-glukuronyltransferasy	typicky nepřítomná, stopy u některých pacientů	výrazně snížená: na 0 až 10% normálních hodnot	snížena: typicky na 10 - 33% normálních hodnot
Dědičnost (u všech syndromů autosomální)	recesivní	predominantně recesivní	promotorové mutace: recesivní substituční mutace: 7 z 8 dominantní, 1 údajně recesivní