

# Uživatel: Pau/Pískoviště

## Hemoglobin a jeho deriváty

Hemoglobin je červené krevní barvivo, které zajišťuje transport kyslíku z plic do tkání a transport  $\text{CO}_2$  a protonů z periferních tkání do dýchacích orgánů.

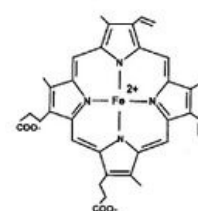
Je to **tetramerní protein** tvořený čtyřmi podjednotkami. Vždy dvě a dvě podjednotky jsou identické. Ve fyziologicky se vyskytujících hemoglobinech jsou zastoupeny čtyři typy polypeptidových řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , a  $\delta$ , které se liší počtem a sledem aminokyselin. Tetramer je tvořen dvěma  $\alpha$  řetězci a dvěma dalšími typy řetězců, které udávají charakter celé molekuly hemoglobinu. U dospělých převládá hemoglobin A, na jehož struktuře se podílejí kromě dvou  $\alpha$  řetězců (141 aminokyselin) dva  $\beta$  řetězce (146 aminokyselin).

Součástí každé podjednotky je polypeptidový řetězec, na který je navázán kovalentně jeden **hem**.

Základem molekuly hemu je protoporfyrin, tvořený 4 pyrrolovými jádry spojenými methenyllovými můstky s centrálně vázaným železem. Hemové železo je celkově šestivazné - čtyřmi koordinačními vazbami je spojeno s atomy dusíku pyrrolových jader. Další koordinační valenci se železo váže s imidazolovou skupinou aminokyseliny histidinu v globinovém řetězci. Šestá valence Fe je určena pro molekulu kyslíku ( $\text{O}_2$ ).



Hemoglobin



Hem

## Hemoglobin v krvi

Stanovení hemoglobinu v krvi patří k nejzákladnějším laboratorním vyšetřením. Koncentrace hemoglobinu v krvi je hlavním kritériem pro posouzení, zda jde o anemii. Termín anemie (chudokrevnost) se používá při poklesu hemoglobinu nebo erytrocytů pod dolní limit fyziologických hodnot. Anemie patří k velmi častým klinickým nálezům. Jde o stav, který vede ke snížení vazebné kapacity pro kyslík a k následné poruše tkáňového dýchání.

**Anemie** vzniká za situace, kdy erytropoéza není schopna krýt požadavky na tvorbu nových červených krvinek. Vyvíjí se v důsledku krevních ztrát nebo zvýšeného zániku červených krvinek či nedostatečné tvorby červených krvinek. Následující přehled uvádí některé konkrétní příčiny anemií:

### 1. Anemie ze zvýšených ztrát krve:

- Akutní ztráta krve
- Chronická ztráta krve

### 2. Anemie ze zvýšeného rozpadu erytrocytů (hemolytické stavy)

- Autoimunitní hemolytické anemie (přítomnost protilátek proti vlastním erytrocytům)
- Porucha membrány erytrocytů (odchylka ve složení erytrocytové membrány)
- Dědičné enzymové defekty erytrocytů (pyruvátkinasa, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa)
- Nestabilní hemoglobiny - hemoglobinopatie (např. hemoglobin S u srpkovité anemie)

### 3. Anemie ze snížené tvorby erytrocytů

- Nedostatek látek potřebných pro erytropoézu (nedostatek železa, nedostatek vitamínu B12, nedostatek kyseliny listové, nedostatek erytropoetinu - chronická renální onemocnění, nedostatek dalších látek např. vitamínů B1, B6)
- Anemie v důsledku chemického, fyzikálního a radiačního poškození
- Anemie při chronických zánětlivých, infekčních a nádorových onemocněních

Zvýšení hodnot hemoglobinu může být projevem dehydratace organismu nebo chronicky snížené plicní ventilace. Vzácně může být způsobena některými myeloproliferativními stavy, např. polycytemia vera.

**Princip stanovení:**

Fotometrické stanovení je založeno na oxidaci dvojmocného železa v hemoglobinu hexakynoželezitanem draselným na trojmocné železo. Vzniklý methemoglobin se v další reakci s kyanidem draselným přeměňuje na velmi stálý kyanmethemoglobin s jediným širokým absorpčním maximem ve viditelné oblasti při 540 nm.

Hodnocení: Referenční rozmezí koncentrace hemoglobinu v krvi (B hemoglobin) pro dospělého muže je 130 - 180 g/l a pro ženu 120 - 160 g/l. **Úkol: Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi** - pdf

## Hemoglobin v moči

Močí zcela zdravých lidí se vyloučí až milion erytrocytů za den. Toto velmi malé množství nelze prokázat běžnými chemickými zkouškami. Výskyt většího množství erytrocytů (**hematurie**) nebo průnik volného hemoglobinu, příp. svalového myoglobinu, do definitivní moči (**hemoglobinurie**, resp. myoglobinurie) je téměř vždy patologickým nálezem. Moč s nadměrnou příměsí hemoglobinu má narůžovělé až masové zbarvení a spektroskopicky v ní lze prokázat hemoglobin; u masivní hemoglobinurie může nabýt až zbarvení černého piva (degradace hemoglobinu na hematin).

- **Hematurie** je nálezem, kterému je třeba věnovat patřičnou pozornost, neboť může být příznakem závažného onemocnění uropoetického traktu. Krev v moči může být renálního nebo extrarenálního původu. Je příznakem zánětlivých onemocnění ledvin, jako jsou glomerulonefritidy a pyelonefritidy. Dalším závažným zdrojem erytrocytů v moči může být ruptura malých cév nebo krvácení při nádorech či poranění ledvin nebo jiných oblastí uropoetického systému, a dále urolitiáza.

- **Hemoglobinurie** se vyskytuje při intravaskulární hemolýze u hemolytických anemií, při transfúzi inkompatibilní krve nebo paroxysmální hemoglobinurii. Chemicky nelze odlišit hemoglobin v erytrocytech od volného hemoglobinu. To je možné zjistit vyšetřením močového sedimentu, neboť při hemoglobinurii nenalezneme erytrocyty.

**Principem** chemického zjištění hemoglobinu nebo erytrocytů v moči je tzv. **pseudoperoxidázový účinek** hemoglobinu. Některé látky, jako např. hemoglobin, hem a jeho deriváty (i chlorofyl), méně též ionty  $\text{Fe}^{3+}$ , katalyzují neenzymovou oxidaci (dehydrogenaci) vhodných organických sloučenin peroxidem vodíku:

Soubor:Pseudoperoxidázová aktivita.jpg

Výhodné je ke sledování reakce použít chromogenní substrát, tj. látku poskytující dehydrogenací výrazně zbarvený produkt (zde aminofenazon, často též benzidin nebo jeho nekancerogenní deriváty). Diagnostické proužky **hemoPHAN** obsahují v indikační zóně o-tolidin (3,3'-dimethylbenzidin) a kumenhydroperoxid v kyselé pufované směsi. Stejnou reakci katalyzují enzymy – peroxidázy, které slouží k odstraňování peroxidu vodíku vznikajícího v průběhu některých oxidoredukčních dějů v buňkách. Z poznaných krevních elementů mají vysokou peroxidázovou aktivitu leukocyty. Katalytická aktivita enzymu se ztrácí jeho tepelnou denaturací. Pozitivita zkoušky na pseudoperoxidázový účinek hemoglobinu v moči může tedy být způsobena i peroxidázami leukocytů nebo některých bakterií. V tomto případě opakování zkoušky s povařeným vzorkem dá negativní výsledek, zatímco pseudoperoxidázová aktivita neenzymových katalyzátorů zůstává i po povaření vzorku zachována.

**Úkol: Průkaz krve a krevního barviva v moči** - pdf

## Hemoglobin ve stolici- okultní krvácení

Průkaz okultního (skrytého) krvácení slouží k zachytu časných fází kolorektálního karcinomu, kdy je možná radikální a efektivní léčba. Vyšetření spočívá v zachycení stop krve ve stolici, používají se různé metodické postupy:

- Metody využívají **pseudoperoxidázové aktivity** hemoglobinu. Pacient musí držet 3 dny před vyšetřením dietu, vyloučit ze stravy nedovařené maso, salámy, banány, rajčata, nesmí užívat léky obsahující kyselinu askorbovou nebo acetylsalicylovou. Poté si pacient sám odebírá vzorky ze tří po sobě jdoucích stolic a aplikuje je na testovací karty. Vyhodnocení se provádí v laboratoři, princip je podobný jako u diagnostických proužků **hemoPHAN**
- Další metody jsou založeny na **imunochemickém průkazu** hemoglobinu pomocí protilátky proti lidskému hemoglobinu. Imunochemické metody jsou citlivější a specifitější, není zapotřebí držet před vyšetřením dietu. Pozitivní výsledky musí být ověřeny dalšími diagnostickými metodami.

**Úkol: Test na okultní krvácení v zažívacím traktu** - pdf

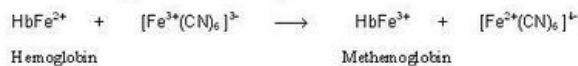
## Deriváty hemoglobinu

K derivátům hemoglobinu se řadí následující typy:

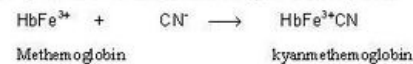
### Oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin

Hemoglobin nesoucí kyslík se označuje jako **oxyhemoglobin (oxyHb)**. Po uvolnění kyslíku hovoříme o **deoxyhemoglobinu (deoxyHb)**. V obou formách je železo dvojmocné, neboť pouze hemoglobin obsahující  $\text{Fe}^{2+}$  může reverzibilně vázat a přenášet molekulu kyslíku. Oxygenace molekuly hemoglobinu mění elektronový stav komplexu  $\text{Fe}^{2+}$  - hem, což se projevuje změnou barvy tmavě červeného odstínu typického pro žilní krev na jasné červenou barvu tepenné krve

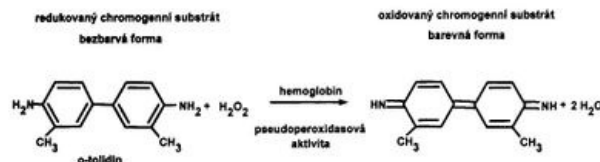
#### 1. oxidace hemoglobinu na methemoglobin



#### 2. přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin



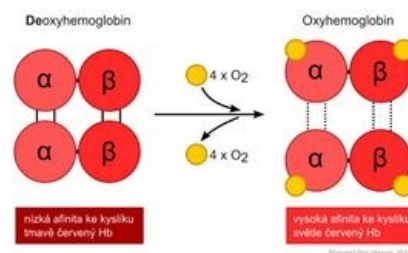
Princip stanovení hemoglobinu v krvi



Princip průkazu krve v moči

## Methemoglobin

Methemoglobin (metHb) je charakterizován přítomností **trojmocného železa**, které vzniká oxidací dvojmocného železa v hemoglobinu. Methemoglobin ztrácí schopnost reverzibilně vázat kyslík. Na jeho místě váže Fe<sup>3+</sup> šestou koordinační vazbou molekulu vody. Barva methemoglobinu je čokoládově hnědá. Methemoglobin se stále tvoří v malém množství v erytrocytech. Denní produkce představuje asi 3 %. Jeho zpětná redukce na hemoglobin je zajišťována enzymovými i neenzymovými reakcemi. Enzymovou redukci zabezpečuje NADH-dependentní methemoglobinreduktasa. Neenzymové mechanismy zahrnují působení glutathionu a kyseliny askorbové.



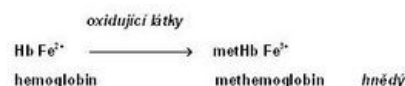
Oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin

Zvýšená koncentrace methemoglobinu v krvi se označuje jako **methemoglobinemie**. Příčiny vzniku jsou různé.

- **Dědičná methemoglobinemie** je obvykle způsobena vrozeným defektem NADH-dependentní methemoglobinreduktasy nebo přítomností abnormálního hemoglobinu M.
- **Získaná methemoglobinemie** je nejčastější formou methemoglobinemie. Může být vyvolána působením oxidujících látek:

- a) otravou některými látkami (nitrobenzen, anilin a jeho deriváty - např. některá barviva)
- b) působením některých léků (lokální anestetika, fenacetin, sulfonamidy)
- c) zvýšeným obsahem dusičnanů a dusitanů ve vodě a v potravinách

### 1. vznik methemoglobinu



### 2. redukce methemoglobinu na hemoglobin



Methemoglobinemie - vznik a terapie

Na zvýšený obsah těchto látek jsou zvláště citliví novorozenci v důsledku nezralosti redukčních systémů a zvýšeného podílu fetálního hemoglobinu, který se snadněji oxiduje. Methemoglobinemie se projevuje cyanózou s charakteristickým šedohnědým odstínem a hypoxií

Příznaky methemoglobinemie

Hodnoty methemoglobinu	Příznaky
0 - 2 %	normální hodnota
< 10 %	cyanóza
< 35 %	cyanóza a další příznaky (bolest hlavy, dušnost)
70 %	smrtelná koncentrace

Součástí terapie získané methemoglobinemie je podávání některých redukčních činidel – methylenové modři nebo kyseliny askorbové

## Karbonylhemoglobin

Karbonylhemoglobin (COHb) vzniká **vazbou oxidu uhelnatého** na hemoglobin. Vytvořená vazba je 250 – 300 krát silnější než vazba kyslíku. Karbonylhemoglobin nemůže transportovat kyslík a v důsledku snížené schopnosti krve přenášet kyslík se vyvíjí buněčná hypoxie. V nadbytku kyslíku je vazba oxidu uhelnatého na hemoglobin reverzibilní. Proto je při otravě oxidem uhelnatým nejdůležitější inhalace O<sub>2</sub>. V malém množství se COHb může vyskytnout i u zdravých osob. U obyvatel měst se prokazují hodnoty kolem 2 %, u silných kuřáků může COHb stoupnout až na 10 % z celkového hemoglobinu. Několikaminutový pobyt v prostředí obsahující 0,1 % CO může zvýšit koncentraci karbonylhemoglobinu na 50 %. Oxid uhelnatý vzniká při nedokonalém spalování fosilních paliv, dále je obsažen ve výfukových plynech a v kouři při požárech v uzavřených místnostech.

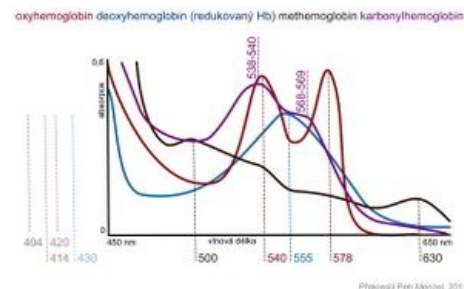
Příznaky otravy oxidem uhelnatým

Hodnoty COHb v %	Příznaky
10	při větší námaze dušnost
20 - 40	bolesti hlavy, dušnost, únava, zvracení
40 - 60	hyperventilace, tachykardie, synkopa, křeče
60 - 80	kóma, smrt

Karbonylhemoglobin se vyznačuje karmínově červeným zbarvením; také osoby s těžkou otravou oxidem uhelnatým mívají „zdravě“ růžovou barvu pleti. Ve srovnání s hemoglobinem je karbonylhemoglobin odolnější vůči chemickým vlivům, působením různých činidel se mění pomaleji.

## Spektrofotometrie derivátů hemoglobinu

Hemoglobin a jeho deriváty mají ve viditelné oblasti světla charakteristická absorpční spektra, kterých se využívá k jejich analýze a rychlé identifikaci. Pro všechny hemoproteiny jsou typická výrazná absorpční maxima v oblasti 400 - 430 nm, tzv. Soretův pás. Další absorpční vrcholy jsou podstatně nižší. **Oxyhemoglobin** je charakterizován dvěma neúplně oddělenými maximy v oblasti 540 a 578 nm. **Deoxyhemoglobin** má jedno absorpční maximum při 555 nm. Hlavní absorpční maximum **methemoglobinu** je při 630 nm a druhý nevýrazný vrchol při 500 nm je závislý na pH. Reakcí methemoglobinu s kyanidem draselným mizí maximum při 630 nm, neboť vzniká kyanmethemoglobin. Pokles absorbance při 630 nm je úměrný koncentraci methemoglobinu. **Kyanmethemoglobin** vykazuje široké absorpční maximum při 540 nm, kterého se využívá při stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi. Spektrum **karbonylhemoglobinu** se podobá spektru oxyhemoglobinu, ale poloha vrcholů je posunuta směrem k nižším vlnovým délkám.



Absorpční spektra hemoglobinu a jeho derivátů

Absorpční maxima hemoglobinu a jeho derivátů

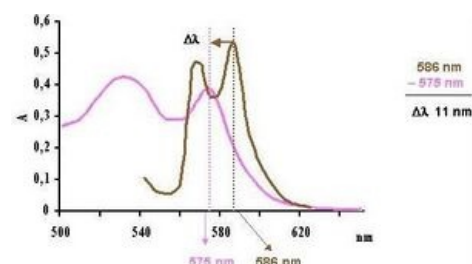
Derivát hemoglobinu	Absorpční maxima (nm)
Hemoglobin redukovaný	431, 555
Oxyhemoglobin	414, 540, 578
Methemoglobin	404, 500, 630
Karbonylhemoglobin	420, 538-540, 568-569
Kyanmethemoglobin	421, 540

## Úkol: Spektrofotometrické vyšetření hemoglobinu a jeho derivátů - pdf

### Stanovení karbonylhemoglobinu

Stanovení karbonylhemoglobinu v krvi patří mezi základní toxikologická vyšetření. Je objektivním kritériem při hodnocení akutních i chronických otrav oxidem uhelnatým.

- *Spektrofotometrické hodnocení.* Karbonylhemoglobin lze stanovit rychle spektrofotometricky na základě odečtení posunu absorpčního maxima ředěné krve od 586 nm. Posun maxima ve spektru je závislý na poměru COHb a O<sub>2</sub>Hb ve vzorku.
- *Reakce s taninem.* Orientačně lze karbonylhemoglobin stanovit reakcí s taninem nebo Ajatinem (asi od 10 % COHb). Tanin vytváří v přítomnosti karbonylhemoglobinu jahodově červenou sraženinu. V nepřítomnosti karbonylhemoglobinu je zbarvení sraženiny hnědošedé.
- *Analýzátory acidobazické rovnováhy.* Analýzu toxikologicky nejdůležitějších derivátů hemoglobinu COHb a metHb umožňují rovněž moderní analyzátory acidobazické rovnováhy, které mají zabudovaný fotometrický systém pro jejich měření.



Stanovení karbonylhemoglobinu spektrofotometrií

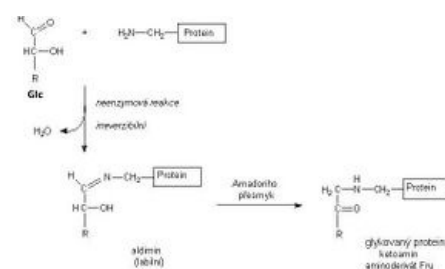
## Úkol: Orientační stanovení karbonylhemoglobinu - pdf

### Glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub>

Glykovaný hemoglobin vzniká neenzymovou reakcí mezi hemoglobinem a glukosou v krvi. Jeho tvorba je ireverzibilní.

Hladina glykovaného hemoglobinu proto odráží koncentraci glukosy v krvi po celou dobu existence erytrocytu, tj. asi 120 dní, a využívá se k posouzení úspěšnosti léčby/kompenzace diabetu v období 4-8 týdnů před vyšetřením. Nejčastěji se stanovuje forma stabilní frakce HbA<sub>1c</sub>. Používá se následující terminologie:

*Glykovaný hemoglobin* - suma sacharidových aduktů na N-terminálním konci nebo ε aminoskupinách lysinu v hemoglobinu.  
*HbA<sub>1</sub>* - suma různých minoritních frakcí hemoglobinu (glykovaných), včetně HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1a1/a2</sub>, HbA<sub>1b1/b2/b3</sub>, HbA<sub>1d1/d2/d3</sub> a HbA<sub>1e</sub>.  
*HbA<sub>1c</sub>* - glukosový adukt valinu na N-terminálním konci β-globinu; odpovídá tzv. stabilnímu ketoaminu (N-[1-deoxyfruktosyl]hemoglobinu).



Princip neenzymové glykace proteinů

Glykovaný hemoglobin je možné stanovit pomocí iontoměničové chromatografie s následnou spektrofotometrií.

Hodnocení: Množství glykovaného hemoglobinu se vyjadřuje v % k celkovému hemoglobinu. Referenční meze zdravých dospělých je 2,8-4,0 %.

## Úkol: Stanovení glykovaného hemoglobinu - pdf



# Železo

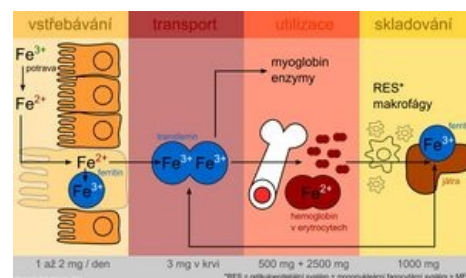
Železo je jedním z nejdůležitějších prvků v lidském organismu. V normálním lidském těle dospělého člověka je obsaženo více než 70 mmol (4,0 - 4,5 g) železa. Největší podíl železa je zabudován v hemoglobinu.

Distribuce železa v organismu

Forma a funkce	Protein	Množství v g
AKTIVNÍ ŽELEZO		
Transport kyslíku	hemoglobin	2,5-3,0
	myoglobin	0,3
Přenos elektronů	cytochromy, cytochromoxidasa	0,2
Rozklad peroxidu vodíku	katalasa, peroxidasa	
ZÁSOBNÍ ŽELEZO	feritin, hemosiderin	0,8-1,0
TRANSPORTNÍ ŽELEZO	transferin	0,003

## Metabolismus železa

Přítomnost železa je nezbytná pro funkci buněk. Jako součást hemu se účastní transportu kyslíku a jako součást cytochromů podmiňuje přenos elektronů v dýchacím řetězci. Nežádoucím účinkem železa jako přechodného a velmi reaktivního prvku je účast v radikálových reakcích, při nichž vznikají tzv. reaktivní formy kyslíku. Ty mohou poškozovat buněčné membrány, proteiny a DNA. Železo je absorbováno jako  $\text{Fe}^{2+}$  aktivním transportem v duodenu a v horní části jejunu. Po vychytání střevní mukózou je část inkorporována do zásobní formy - **feritinu** v intestinálních buňkách. Část absorbovaného železa přestupuje do plazmy, kde je transportováno ve vazbě na **transferin**. Plazmatické železo je zachycováno buňkami cílových tkání prostřednictvím receptoru pro transferin a buď je zabudováno do hemu nebo uloženo do zásoby ve formě feritinu. Využití specifické transportní bílkoviny transferinu a zásobního proteinu feritinu pro uskladnění železa představuje ochranné mechanismy, které mají zamezit toxickému působení oxidoredukčně aktivního železa.



Distribuce železa v organismu

## Vyšetření metabolismu železa

V praxi se běžně setkáváme s onemocněními spojenými se změnami metabolismu a užití železa. Laboratorní vyšetření metabolismu železa zahrnuje následující vyšetření:

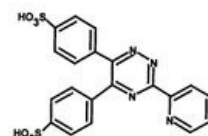
- železo v séru
- sérový transferin a vazebná kapacita pro železo
- sérový feritin
- transferinový receptor

Uvedené parametry jsou důležitými diagnostickými ukazateli pro průkaz poklesu či nárůstu zásob železa ještě ve stádiích, která nejsou doprovázena výraznými klinickými projevy.

### Stanovení železa v séru

Pro stanovení železa v séru se používají kolorimetrické metody, atomová absorpční spektrofotometrie a další speciální techniky. Nejužívanější jsou fotometrické metody, založené na reakci železa s komplexotvornou látkou. Všechny postupy zahrnují následující kroky:

- uvolnění  $\text{Fe}^{3+}$  z vazby na transferin pomocí kyselin nebo tenzidů (např. HCl)
- redukce  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ , která je nezbytná pro reakci s komplexotvorným činidlem, k redukci se používá např. kyselina askorbová
- reakce  $\text{Fe}^{2+}$  s komplexotvorným činidlem obsahujícím reaktivní skupiny  $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$  za vzniku barevného komplexu. Ionty kovu vytvářejí cheláty s dvěma atomy dusíku. V současnosti se využívají především dvě komplexotvorné látky - **bathofenentrolin** a **ferrozin** (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-sulfofenyl)-1,2,4-triazin - PST, chráněný název FerroZine), který má vyšší absorpční koeficient a je lépe rozpustný ve vodě. **Hodnocení:** Koncentrace sérového železa podléhá cirkadiálnímu rytmu a jsou ovlivněny i dalšími faktory. To omezuje diagnostický význam tohoto parametru. Je špatným ukazatelem tkáňových zásob železa a je nutné ho vždy posuzovat v kombinaci se sérovým transferinem a vazebnou kapacitou pro železo. Snížené koncentrace doprovázejí nedostatek železa, způsobený např. velkými nebo opakovanými krevními ztrátami, nedostatečným příjmem železa potravou nebo narušenou absorpcí. Nález není specifický, neboť se sníženými hladinami se setkáváme rovněž u akutní infekce nebo chronických zánětlivých onemocnění (přesun železa do tkání). Vysoké hladiny železa se vyskytují u hemochromatózy (viz níže), za podmínek



Ferrozín

předávkování nebo intoxikace železem, při zvýšeném rozpadu erytrocytů a u některých jaterních onemocnění.

Referenční hodnoty: muži: 9-29  $\mu\text{mol/l}$  ženy: 7-28  $\mu\text{mol/l}$

## Úkol: Stanovení Fe v séru kolorimetrickou metodou - pdf

### Sérový transferin a vazebná kapacita pro železo

Železo je transportováno krví ve vazbě na specifický protein s  $\beta_1$ -elektroforetickou pohyblivostí – **transferin**, který je syntetizován v játrech. Rychlost jeho tvorby je nepřímo úměrná zásobám železa v organismu; zvyšuje se při nedostatku železa a při nadbytku klesá. Biologická funkce transferinu spočívá ve schopnosti snadno tvořit netoxické komplexy se železem a přenášet Fe absorbované sliznicí tenkého střeva do kostní dřeně nebo do zásobních forem (feritinu nebo hemosiderinu). Každá molekula transferinu váže 2 atomy  $\text{Fe}^{3+}$  (1 g transferinu váže 25,2  $\mu\text{mol}$  železa). Transferin může být stanoven přímo pomocí imunochemických metod nebo nepřímo jako schopnost transferinu vázat železo - tzv. vazebná kapacita pro železo. **Celková vazebná kapacita pro železo** (TIBC – total iron binding capacity) je množství železa, které je transferin schopen vázat v případě, že všechna vazebná místa jsou obsazena. Odpovídá normální koncentraci transferinu. Obvykle je železem nasycena pouze 1/3 transferinu – **vázaná kapacita**. Volný transferin bez navázaného železa představuje **volnou vazebnou kapacitu** (2/3 transferinu), která je k dispozici pro transport železa při zvýšených požadavcích.

Přepočet mezi koncentrací transferinu a celkovou vazebnou kapacitou:

$$\text{Celková vazebná kapacita } (\mu\text{mol/l}) = \text{transferin } (\text{g/l}) \times 25,2$$

Referenční rozmezí pro koncentraci transferinu v séru (S-transferin) je 2,0-3,6 g/l a pro celkovou vazebnou kapacitu je 50-70  $\mu\text{mol/l}$ .

**Saturace transferinu:** Z hodnot koncentrace železa a transferinu můžeme vypočítat **saturaci transferinu (TfS)**, která je definována jako poměr sérové koncentrace železa k sérové koncentraci transferinu. Jedná se o citlivý parametr pro odhalení latentního nedostatku železa.

$$\text{Saturace transferinu } (\%) = \frac{S - \text{železo } (\mu\text{mol/l})}{S - \text{transferin } (\text{g/l}) \times 25,2} \times 100$$

Hodnoty saturace transferinu:

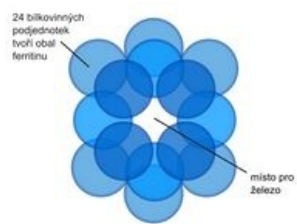
fyziologické hodnoty: 25-50%

snížení saturace při nedostatku železa: < 15% (nutno zahájit substituční léčbu)

zvýšení saturace při nadbytku železa: > 50%

### Feritin a hemosiderin

**Feritin** je nejdůležitější zásobní protein pro železo. Molekula feritinu je přizpůsobena vázat velké množství  $\text{Fe}^{3+}$  v rozpustné a netoxické formě pro organismus. Feritin je tvořen vnějším proteinovým obalem z 24 podjednotek – apoferitinem (Mr 440 000), ohraničujícím dutinu, ve které může být soustředěno až 4500 atomů železa ve formě oxyhydroxidu železitého  $(\text{FeO.OH})_n$  v mikrokrystallické podobě s fosfáty  $(\text{FeO.OPO}_3\text{H}_2)$ . Vstup a výstup atomů železa umožňují póry mezi jednotlivými podjednotkami obalu molekuly feritinu. Normálně je jeho kapacita využita asi z 20 %. Ukládá se do buněk v játrech, slezině a střevní sliznici. V krevním séru se feritin nachází ve velmi nízké koncentraci. Sérové koncentrace feritinu jsou **měřítkem zásob železa** v organismu. Nízké koncentrace indikují vyčerpání celkové tělesné rezervy železa a slouží k časnému odhalení anémie z nedostatku železa ještě v prelatentní fázi. Zvýšené koncentrace feritinu jsou doprovodným jevem vysokých tkáňových zásob železa. Dále se s nimi setkáváme u mnohých pacientů s onemocněním jater, některými maligními nádory (nádorový marker) nebo zánětlivými onemocněními (pozitivní reaktant akutní fáze).



Schema struktury feritinu

Referenční rozmezí pro koncentraci feritinu v séru (S-feritin) je pro muže 30-300  $\mu\text{g/l}$  a pro ženy 20-120  $\mu\text{g/l}$ .

**Hemosiderin** je dalším zásobním proteinem pro železo. Vzniká agregací denaturovaného feritinu s dalšími komponentami. Vytváří partikule o velikosti 1 až 2  $\mu\text{m}$ , které jsou při použití barvení na železo viditelné ve světelném mikroskopu. Hemosiderin obsahuje větší množství Fe než feritin, ale vzhledem ke špatné rozpustnosti ve vodě je obtížně dostupné. Tvoří se za situace, kdy množství železa v organismu převyší skladovací kapacitu feritinu.

### Transferinový receptor

Železo transportované krví transferinem je zachycováno buňkami prostřednictvím specifického transferinového receptoru (TfR). V určitém stádiu vývoje se nachází na povrchu všech buněk, nejvíce je však exprimován na povrchu prekursorů buněk červené řady v kostní dřeni. TfR je transmembránový protein, který je tvořen dvěma identickými podjednotkami, spojenými disulfidovou vazbou. Oddělením extracelulárních domén receptoru se do cirkulace uvolňuje tzv. **solubilní (rozpuštěná) frakce transferinového receptoru (sTfR)**, který může být v podobě dimeru nebo monomeru. Buňky reagují na snížení zásob železa syntézou zvýšeného množství transferinových receptorů. Zvýšení sTfR je spolehlivým **ukazatelem nedostatku železa pro krvetvorbu**. Se

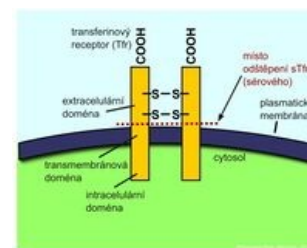
zvýšenými hladinami sTfR se setkáváme u *anemií z nedostatku železa* nebo u *hemolytických anemií*. Cenné je stanovení sTfR u anemických pacientů, u nichž je zvýšen feritin z důvodů reakce akutní fáze. Stanovení koncentrace sTfR je možno využít i u pacientů s transplantovanou kostní dření pro sledování průběhu erythropoézy.

Ke stanovení se používají imunochemické metody.

## Poruchy metabolismu železa

### Nedostatek železa (sideropenie)

Nedostatek železa v organismu bývá zpravidla způsoben jeho nedostatečným vstřebáváním ze střeva nebo chronickými ztrátami krve. Může vyústit v "sideropenickou anemii (hypochromní mikrocytární anemie)", která patří mezi "nejčastější hematologická onemocnění". Anemie je však zpravidla pozdní příznak postupně se vyvíjející sideropenie. V krevním obraze se projeví až po téměř úplném vymizení železa. Proto je potřebné odhalit nedostatek železa v časném stádiu, které ještě není doprovázeno anemií.



Transferinový receptor

Na základě stanovení základních parametrů metabolismu železa rozlišujeme tři stupně nedostatku:

- **Prelatentní nedostatek železa** je označení pro stav, kdy dochází k postupnému poklesu zásob, ale ještě není ovlivněna dodávka železa do erytroblastů kostní dřeně. Asi u poloviny nemocných jsou hladiny feritinu v séru sniženy pod 12 µg/l.
- Při **latentním nedostatku železa** jsou jeho zásoby v podstatě vyčerpány. Feritin je snížen pod dolní hranici normy a je v tomto stádiu již doprovázen i snížením hladiny železa v séru a sníženou dodávkou do erytroblastů kostní dřeně. Zvyšuje se vazebná kapacita pro železo. Citlivým ukazatelem latentního nedostatku železa je pokles saturace transferinu pod 15 %. Nerozvíjí se však ještě anemie.
- Při **manifestním nedostatku železa** dochází k rozvoji anemie s poklesem hodnot hemoglobinu pod dolní hranici normy. U anemie z nedostatku železa je typický nález nízkého sérového železa a feritinu, je zvýšená koncentrace transferinu (vazebná kapacita pro železo). U hemolytických anemií nebo při nadbytku železa je naopak sérové železo zvýšené, současně je snižena celková vazebná kapacita pro železo.

Laboratorní nález u nedostatku železa

Prelatentní nedostatek železa	Latentní nedostatek železa	Manifestní nedostatek železa
snížení zásobního železa - pokles feritinu	nedostatek zásobního železa - pokles feritinu	nedostatek zásobního železa - pokles feritinu
	snížení sérového železa	snížení sérového železa
	pokles saturace transferinu pod 15%	pokles transferinu pod 10%
	zvýšení celkové vazebné kapacity pro železo	zvýšení celkové vazebné kapacity pro železo
	zvýšení sTfR	zvýšení sTfR
		snížení koncentrace hemoglobinu - anemie

### Nadbytek železa

Organismus není vybaven exkreční cestou pro železo, a proto se za určitých okolností může přebytké železo hromadit ve tkáních. Včasná diagnostika může zabránit poškození tkání nadbytkem železa. Přetížení železem se rozvíjí většinou velmi pomalu. Rozlišujeme 3 stádia:

- Ve stádiu **prelatentního nadbytku železa** se zvyšuje jeho obsah v orgánech, ale bez překročení jejich zásobní kapacity.
- V období **latentního stádia přetížení železem** je překročena zásobní kapacita buněk, ale ještě není poškozena funkce orgánů, zvyšuje se hladina feritinu i hladina železa v séru a stoupá saturace transferinu nad 55%.
- Ve fázi **manifestního nadbytku železa** jsou již poškozeny některé orgány

Laboratorní nález u nadbytku železa

Prelatentní nadbytek železa	Latentní nadbytek železa	Manifestní nadbytek železa
zvyšování zásob železa - zvýšení feritinu	zvyšování zásob železa - zvýšení feritinu nad 300 µg/l	zvyšování zásob železa - zvýšení feritinu (při těžkém postižení nad 2000 µg/l)
	zvýšení železa v séru	výrazné zvýšení železa v séru
	zvýšení saturace transferinu nad 55%	zvýšení saturace transferinu (při těžkém postižení může převýšit 90%)

### Hemochromatosa

Hromadění železa v tkáních souvisí s onemocněním, které označujeme jako hemochromatóza.

- **Primární hemochromatóza** je dědičné onemocnění způsobené zvýšenou resorcí železa ze střeva. Přebytké železo se ukládá v parenchymatózních orgánech jako jsou játra, srdce, pankreas, nadledviny. V postižených orgánech působí toxicky a narušuje jejich funkci tím, že může katalyzovat chronické reakce vedoucí k tvorbě volných radikálů. Hlavními klinickými projevy jsou hyperpigmentace kůže,

hepatosplenomegalie a diabetes mellitus.

- **Sekundární hemochromatóza** se může vyvinout jako následek např. opakovaných transfúzí, nadbytečného příjmu přípravků obsahujících železo nebo hemolytické anemie. V biochemickém obraze nalézáme zvyšující se hladiny feritinu a železa v séru, stoupá saturace transferinu při jeho současném poklesu.