

Hemoglobin a jeho deriváty (1. LF UK, VL, Praktická cvičení z biochemie)

→ Tento článek je určen pro výuku Praktických cvičení z biochemie na 1.LF UK. Pro toto téma je ve WikiSkriptech základní článek na stránce Hemoglobin.

Hemoglobin je červené krevní barvivo, které zajišťuje transport kyslíku z plic do tkání a transport CO₂ a protonů z periferních tkání do dýchacích orgánů.

Koncentrace hemoglobinu u zdravého dospělého muže je přibližně 150 g/l, u dospělé ženy asi 140 g/l. Jeden gram hemoglobinu může navázat až 1,34 ml kyslíku.^[1]

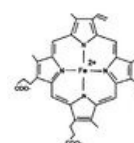
Struktura hemoglobinu

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 α , β , γ , a δ , které se liší počtem a sledem aminokyselin. Tetramer je tvořen dvěma α řetězci a dvěma dalšími typy řetězců, které udávají charakter celé molekuly hemoglobinu. U dospělých převládá hemoglobin A, na jehož struktuře se podílejí kromě dvou α řetězců (141 aminokyselin) dva β řetězce (146 aminokyselin).



Hemoglobin

Součástí každé podjednotky je polypeptidový řetězec, na který je navázán kovalentně jeden **hem**. Základem molekuly hemu je protoporfyrin, tvořený 4 pyrrolovými jádry spojenými methenylovými 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 (O₂).



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 anémie (chudokrevnost) se používá při poklesu hemoglobinu nebo erytrocytů pod dolní limit fyziologických hodnot. Anémie patří k velmi častým klinickým nálezům. Jde o stav, který vede ke snížení vazebné kapacity pro kyslík a k následné poruše tkáňového dýchání.

Příčiny anémie

Anémie vzniká za situace, kdy erythropoéza není schopna krýt požadavky na tvorbu nových červených krvinek. Vychází se v důsledku krevních ztrát nebo zvýšeného zániku červených krvinek či nedostatečné tvorby červených krvinek. Následující přehled uvádí některé konkrétní příčiny anémií:

1. *Anémie ze zvýšených ztrát krve:*
 - Akutní ztráta krve.
 - Chronická ztráta krve.
2. *Anémie ze zvýšeného rozpadu erytrocytů (hemolytické stavy).*
 - Autoimunitní hemolytické anémie (přítomnost protilátek proti vlastním erytrocytům).
 - Porucha membrány erytrocytů (odchylka ve složení erytrocytové membrány).
 - Dědičné enzymové defekty erytrocytů (pyruvátkináza, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza).
 - Nestabilní hemoglobiny – hemoglobinopatie (např. hemoglobin S u srpkovité anémie).
3. *Anémie ze snížené tvorby erytrocytů.*
 - Nedostatek látek potřebných pro erythropoézu (nedostatek železa, nedostatek vitamínu B12, nedostatek kyseliny listové, nedostatek erythropoetinu – chronická renální onemocnění, nedostatek dalších látek např. vitamínů B1, B6).
 - Anémie v důsledku chemického, fyzikálního a radiačního poškození.
 - Anémie 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 hemoglobinu v krvi

Oxidace hemoglobinu na methemoglobin:



Přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin:



Methemoglobin

Kyanmethemoglobin

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.

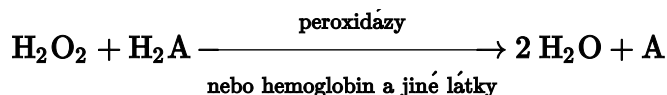
Hodnocení: Referenční rozmezí koncentrace hemoglobinu v krvi (B hemoglobin) pro dospělého muže je 130–180 g/l a pro ženu 120–160 g/l.

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**, erythrocyturie) nebo průnik volného hemoglobinu, příp. svalového myoglobinu, do definitivní moči (**hemoglobinurie**, resp. myoglobinurie) je téměř vždy patologickým nálezem. **Makroskopickou hematurii** pozorujeme pouhým okem; moč má narůžovělé zbarvení (přirovnává se k vodě z vypraného masa) a spektroskopicky v ní lze prokázat hemoglobin. V moči bývá nejméně 1 g hemoglobinu na litr. U masivní hemoglobinurie může mít moč až zbarvení černého piva (degradace hemoglobinu na hematin). **Mikroskopická hematurie** je prokazatelná pouze biochemicky.

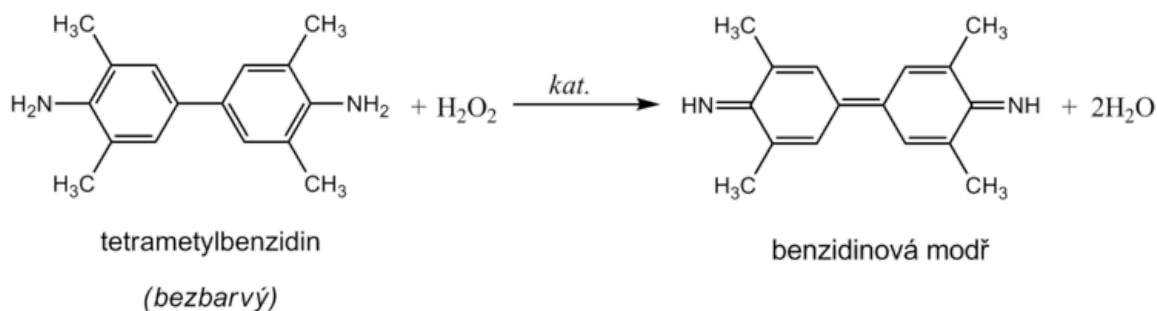
Stanovení hemoglobinu v moči

Hemoglobin katalyzuje, podobně jako peroxidáza, oxidaci (dehydrogenaci) některých substrátů (např. derivátů benzidinu) peroxidem vodíku:



Nejedná se však o enzymovou aktivitu (katalýzu podmiňuje hemové železo), a proto se neztrácí ani po tepelné denaturaci. Hovoříme o **pseudoperoxidázové aktivitě**, která se využívá k citlivým, ale nespecifickým důkazům hemoglobinu nebo stopových množství krve. Výhodné je ke sledování reakce použít chromogenní substrát, tj. látku poskytující dehydrogenací výrazně zbarvený produkt (často benzidin nebo jeho nekancerogenní deriváty, aminofenazon apod.).

Reagenční zóna diagnostických proužků obsahuje chromogen (např. tetrametylbenzidin) se stabilizovaným peroxidem vodíku (např. kumenhydroperoxidem). V přítomnosti volného hemoglobinu (**hemoglobinurie**) se indikační zóna zbarví rovnoměrně modře. Pokud jsou v moči přítomny erytrocyty (**erythrocyturie**), vytvářejí se intenzivně zelenomodře zbarvené tečky až skvrny.



S hemoglobinurií se můžeme setkat u intravaskulární hemolýzy. K častější erythrocyturii vede jak poškození glomerulární membrány (**glomerulární hematurie**), tak krvácení z jakékoliv části vývodných cest močových. Často ji nacházíme u infekcí močových cest, urolitiázy a nádorů urogenitálního traktu.

Kromě hemoglobinu poskytuje pseudoperoxidázovou reakci i myoglobin, který se může do moči vylučovat při rozpadu kosterního svalstva (rabdomyolýza, crush-syndrom). Pozitivita zkoušky může být způsobena i peroxidázami leukocytů či některých bakterií, kvasinek nebo plísní, které se mohou vyskytovat v moči zejména při infekcích močových cest. Chceme-li vyloučit možnost falešně pozitivní reakce účinkem buněčných peroxidáz, je nutno reakci provádět s povařenou močí.

Kontaminace odběrové nádoby silnými oxidačními činidly rovněž vyvolává falešnou pozitivitu reakce. Na druhé straně může přítomnost silně redukujících látek (např. kyselina askorbová) zpomalit až zastavit pseudoperoxidázovou reakci a být tak příčinou falešně negativních výsledků.

Hemoglobin ve stolici - okultní krvácení

Okultní (skryté) krvácení (OK) je označení pro chemický průkaz krve ve stolici, která má normální makroskopický vzhled. Průkaz okultního krvácení ve stolici slouží k záchytu časných fází kolorektálního karcinomu, kdy je ještě možná radikální a efektivní léčba. Dále umožňuje detekci prekanceróz tlustého střeva, především adenomových

polypů.

Principiálně se používají dva metodické přístupy pro zachycení okultního krvácení:

- Metody založené na průkazu **pseudoperoxidázové aktivity** hemoglobinu. Princip je stejný jako u stanovení hemoglobinu v moči. 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 nasycené chromogenem. Vyhodnocení se provádí v ordinaci nebo v laboratoři přidáním roztoku peroxidu vodíku a odečtením zbarvení.

 Podrobnější informace naleznete na stránce *Haemoccult*.

- Další metody jsou založeny na **imunochemickém průkazu** hemoglobinu pomocí protilátky proti lidskému hemoglobinu. Imunochemické metody jsou citlivější a specifičtější, není zapotřebí držet před vyšetřením dietu.

 Podrobnější informace naleznete na stránce *Testy okultního krvácení ve stolici*.

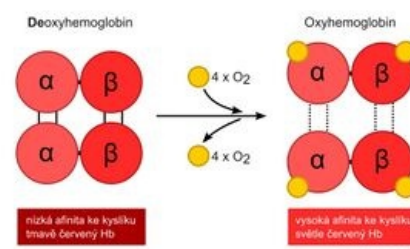
Pozitivní výsledky musí být ověřeny dalšími diagnostickými metodami.

Deriváty hemoglobinu

K derivátům hemoglobinu se řadí následující typy:

Oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin

Hemoglobin nesoucí kyslík se označuje jako **oxyhemoglobin (oxyHb)**. Každá molekula Hb může vázat 4 molekuly kyslíku. Po uvolnění kyslíku hovoříme o **deoxyhemoglobinu (deoxyHb)**. V obou formách je železo dvojmocné, neboť pouze hemoglobin obsahující Fe^{II+} může reverzibilně vázat a přenášet molekulu kyslíku. Oxygenace molekuly hemoglobinu mění elektronový stav komplexu Fe^{II+} -hem, což se projeví změnou barvy tmavě červeného odstínu typického pro žilní krev na jasně červenou barvu tepenné krve. V lidském organismu je asi 98,5 %^[2] kyslíku vázáno právě na hemoglobin.



Oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin

Karbaminohemoglobin

Karbaminohemoglobin je hemoglobin, na kterém je navázaný CO_2 . Oxid uhličitý se váže na globinový řetězec hemoglobinu. Vazba CO_2 na hemoglobin snižuje afinitu hemoglobinu ke kyslíku.

Methemoglobin

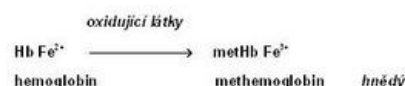
Methemoglobin (metHb; též *hemiglobin* nebo *ferihemoglobin*^[1]) je charakterizován přítomností **trojmocného železa**, které vzniká oxidací dvojmocného železa v hemoglobinu^[3]. Methemoglobin ztrácí schopnost reverzibilně vázat kyslík. Na jeho místě váže Fe^{III+} šestou koordinační vazbou molekulu vody. Barva methemoglobinu je čokoládově hnědá.

Methemoglobin je v erytrocytech v malém množství přítomen i fyziologicky (asi 1–3 % celkové koncentrace hemoglobinu^[4]). Děje se tak především účinkem dusitanů, které vznikají z dusičnanů obsažených v potravě. Zpětnou redukci methemoglobinu na hemoglobin zajišťuje především NADH-dependentní cytochrom-b₅ reduktáza (též methemoglobinreduktáza). Menší roli hraje NADPH-dependentní methemoglobinreduktáza, která je závislá na dodávce NADPH z pentózového cyklu a na přítomnosti dalšího elektronového přenašeče (např. flavinu).^[5] Neenzymové mechanismy zahrnují působení glutathionu a kyseliny askorbové.

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

- Dědičná methemoglobinemie** je obvykle způsobena vrozeným defektem NADH-dependentní methemoglobinreduktázy nebo přítomností abnormálního hemoglobinu M.
- Získaná methemoglobinemie** je nejčastější formou methemoglobinemie. Může být vyvolána působením oxidujících látek^[6]:
 - otravou některými látkami (nitrobenzen, anilin a jeho deriváty – např. některá barviva),
 - působením některých léků (lokální anestetika – benzokain, dále fenacetin, sulfonamidy),
 - 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 snáze 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, *karboxyhemoglobin*) vzniká **vazbou oxidu uhelnatého** na hemoglobin. Vytvořená vazba je 250–300krát 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 O₂.

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 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

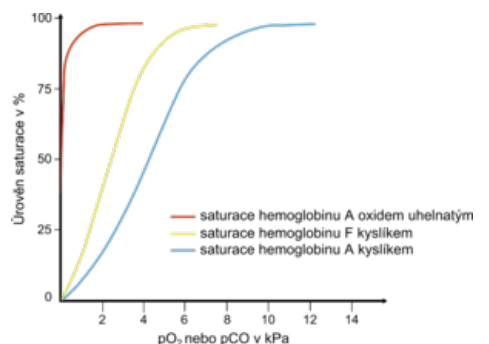
Hemoglobin a jeho deriváty mají ve viditelné oblasti světla charakteristická absorpční spektra, kterých se využívá k jejich analýze a rychlé identifikaci. Pro všechny hemoproteiny jsou typická výrazná absorpční maxima v oblasti 400–430 nm, tzv. Soretův pás. Další absorpční vrcholy jsou podstatně nižší. **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 maxima hemoglobinu a jeho derivátů

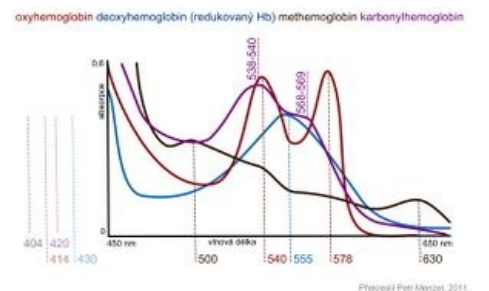
Derivát hemoglobinu	Absorpční maxima [nm]
Hemoglobin redukovaný	431, 555
Oxyhemoglobin	414, 540, 578
Methemoglobin	404, 500, 630
Karbonylhemoglobin	420, 538–540, 568–569
Kyanmethemoglobin	421, 540

Stanovení karbonylhemoglobinu:

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

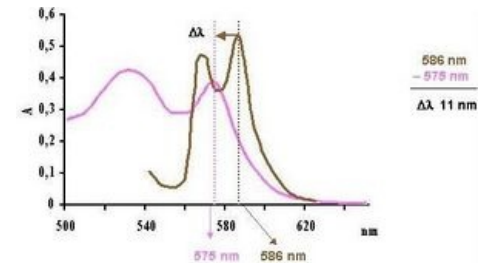


Saturační křivka hemoglobinu



Absorpční spektra hemoglobinu a jeho derivátů

- **Spektrofotometrické hodnocení.** Karbonylhemoglobin lze stanovit rychle spektrofotometricky na základě odečtení posunu absorpčního maxima ředěné krve od 586 nm^[7]. Posun maxima ve spektru je závislý na poměru COHb a O₂Hb 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.
- **Analyzátory 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-
spektrofotometrie

Železo

Železo je jedním z nejdůležitějších prvků v lidském organismu. V těle dospělého člověka je obsaženo více než 70 mmol (4,0–4,5 g) železa. U žen je toto množství nižší než u mužů, což se přičítá ztrátám krve při menses.

Distribuce železa v organismu

Forma	Funkce	Protein	Množství v g
Aktivní železo	transport kyslíku	hemoglobin	2,5–3,0
		myoglobin	0,3
	přenos elektronů	cytochromy, cytochromoxidáza	0,2
		kataláza, peroxidáza	
Zásobní železo		feritin, hemosiderin	0,8–1,0
Transportní železo		transferrin	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 se absorbuje jako Fe²⁺ aktivním transportem v duodenu a v horní části jejunu, a to dvěma způsoby:

1. na porfyrin vázané Fe ve formě stabilního lipofilního komplexu;
2. Fe^{II+} – cheláty rozpustné ve vodě.

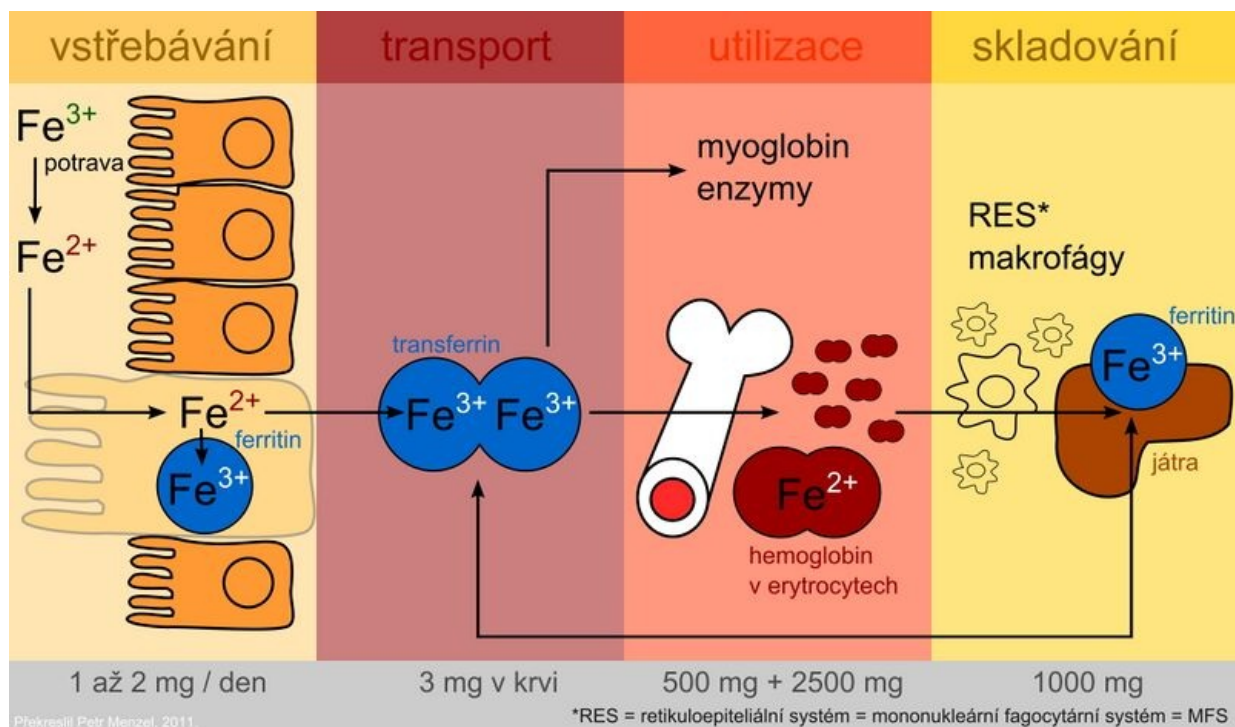
Jen nepatrná část se vstřebává v ionizované formě.

Ve stravě bývá průměrně 10–50 mg železa za den, ale vstřebává se pouze 10–15 %. Ve sloučeninách hemu (maso) se absorbuje lépe, nehemové Fe v rostlinné stravě mnohem hůře. Kromě toho rostliny obsahují oxaláty, fytáty, taniny a jiné fenolické sloučeniny, jež tvoří s Fe nerozpustné nebo chelátové komplexy, které se těžko vstřebávají. Askorbová kyselina na druhé straně absorpci železa zlepšuje.

Po vychytání střevní mukózou se část železa inkorporuje do zásobní formy – **feritinu** v intestinálních buňkách. Část absorbovaného železa přestupuje do plazmy, kde je transportováno ve vazbě na **transferrin**. Důležitou roli při přenosu železa přes bazolaterální membránu enterocytů má protein **ferroportin** (nachází se i v membráně makrofágů a hepatocytů). Je to hlavní místo regulace homeostázy železa v organismu. Klíčovým faktorem regulace je protein **hepcidin**, který je syntetizován v játrech. Vazbou na ferroportin inhibuje transport železa z buněk a tím přispívá k jeho sekvestraci v nich. Hladina hepcidinu se zvyšuje při zánětu. Hepcidin je částečně zodpovědný i za **anémii chronických chorob**. Mutace genu pro hepcidin vedou k **juvenilní hemochromatóze typu 2B**.

Plazmatické železo je zachycováno buňkami cílových tkání prostřednictvím receptoru pro transferrin 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.

Při deskvamaci odumřelých slizničních buněk odchází nezužité železo stolicí spolu s nevstřebaným železem.



Vyšetření metabolismu železa

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

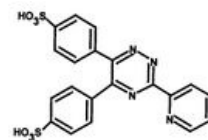
- železo v séru
- sérový transferin a vazebná kapacita pro železo
- sérový feritin
- transferinový receptor

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:

1. Uvolnění Fe^{3+} z vazby na transferin pomocí kyselin nebo tenzidů (např. HCl).
2. Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} , která je nezbytná pro reakci s komplexotvorným činidlem. K redukci se používá např. kyselina askorbová.
3. Reakce Fe^{2+} s komplexotvorným činidlem obsahujícím reaktivní skupiny $-N=C-C=N-$ 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.



Ferrozin

Hodnocení

Koncentrace sérového železa podléhá cirkadiánnímu 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 onemocněních (přesun železa do tkání). Vysoké hladiny železa se vyskytují u hemochromatózy (viz níže), při předávkování nebo intoxikaci železem, při zvýšeném rozpadu erytrocytů a u některých jaterních onemocněních.

Referenční hodnoty

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

Sérový transferin a vazebná kapacita pro železo

Železo je transportováno krví ve vazbě na specifický protein s β_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 dva atomy Fe^{3+} (1 g transferinu váže 25,2 μmol 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. 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:

$$\text{Celková vazebná kapacita } [\mu\text{mol/l}] = \text{transferin } [\text{g/l}] \cdot 25,2.$$

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 celkové vazebné kapacitě transferinu pro železo. Jedná se o citlivý parametr pro odhalení latentního nedostatku železa.

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

Hodnocení saturace transferinu

fyziologické hodnoty: 25–50 %

snížení saturace při nedostatku železa: < 15 %

zvýšení saturace při nadbytku železa: > 50 %

Feritin a hemosiderin

Feritin je nejdůležitější zásobní protein pro železo. Molekula feritinu je přizpůsobena vázat velké množství 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 $(\text{FeO} \cdot \text{OH})_n$ v mikrokrytalické podobě s fosfáty $(\text{FeO} \cdot \text{OPO}_3\text{H}_2)$. 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.

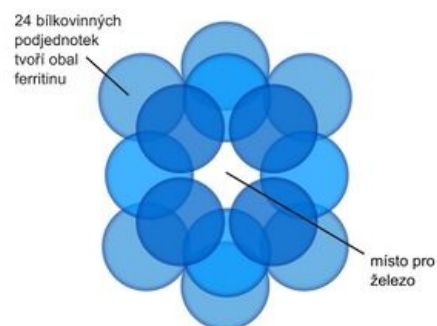
V krevním séru se feritin nachází ve velmi nízké koncentraci. Sérové koncentrace feritinu jsou **měřítkem zásob železa** v organismu. Nízké koncentrace indikují vyčerpání celkové tělesné rezervy železa a slouží k časnému odhalení anémie z nedostatku železa ještě v prelatentní fázi. Zvýšené koncentrace 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).

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 μm , které jsou při použití barvení na železo viditelné ve světelném mikroskopu. Hemosiderin obsahuje větší množství železa 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.



Schema struktury feritinu

(Překlad Petr Maršal, 2011)

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.

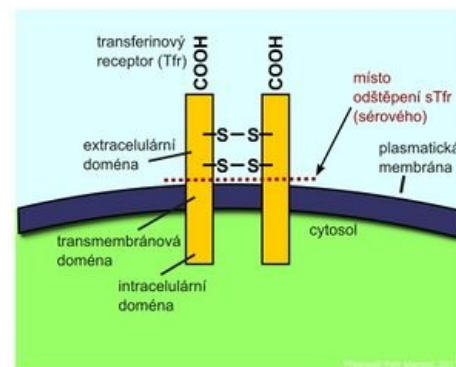
Ke stanovení se používají imunochemické metody.

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 anémii (hypochromní mikrocytární anémie)**, která patří mezi **nejčastější hematologická onemocnění**. Anémie 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 anémií.

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



Transferinový receptor

- **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 snižené pod 12 µg/l.
- Při **latentním nedostatku železa** jsou jeho zásoby v podstatě vyčerpány. Feritin je snižen 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 anémie.
- Při **manifestním nedostatku železa** dochází k rozvoji anémie s poklesem hodnot hemoglobinu pod dolní hranici normy. U anémie 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 snižená celková vazebná kapacita pro železo.

Laboratorní nález u nedostatku železa

Prelatentní nedostatek železa	Latentní nedostatek železa	Manifestní nedostatek železa
snížování 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 – anémie

Nadbytek železa

Organismus není vybaven exkreční cestou pro železo, a proto se za určitých okolností může přebytné 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 %)

Hemochromatóza

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

- **Primární hemochromatóza** je dědičné onemocnění způsobené zvýšenou resorpcí železa ze střeva. Přebytné 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 anémie. V biochemickém obraze nalézáme zvyšující se hladiny feritinu a železa v séru, stoupá saturace transferinu při jeho současném poklesu.

Otrava železem

Náhodné požití většího množství přípravků hrozí dětem (tablety podobné lentilkám). Smrtelná dávka pro dítě je 600 mg. Pro dospělého je příjem železa 40 mg/ kg toxikologicky závažný, příjem 60 mg/kg je smrtelný^[8].

Příznaky zahrnují nevolnost, zvracení (i zvracení krve), bolesti břicha, průjem (někdy krvavý). Velké ztráty tekutin jsou příčinou šoku, selhání ledvin a smrti. Pokud nemocný přežije tuto fázi otravy, může po 12 hodinách upadnout do bezvědomí, křečí a jaterního selhání. Přežije-li i tuto druhou fázi, otrava může zanechat trvalé následky (poškození střeva).

Léčba akutní otravy

- Výplach žaludku.
- Nasogastrální sondou podat chelační činidlo deferoxamin  (5–10 g do 50–100 ml vody).
- Zvážit intravenózní podání desferoxaninu k vyvázání vstřebaného železa. V moči se objeví růžově červený komplex deferoxaminu se železem. Léčbu je třeba opakovat do té doby, než se barva moči vrátí k normě^[8].

Odkazy

Reference

1. ŠVÍGLEROVÁ, Jitka. *Hemoglobin* [online]. Poslední revize 2009-02-18, [cit. 2010-11-11]. <<https://web.archive.org/web/20160416205421/http://wiki.lfp-studium.cz/index.php/Hemoglobin>>.
2. KITTAR, Otomar a ET AL.. *Lékařská fyziologie*. 1. vydání. Praha : Grada, 2011. 790 s. s. 131. ISBN 978-80-247-3068-4.
3. ŠVECOVÁ, D a D BÖHMER. Vrozená a získaná methemoglobinémie a ich liečba. *Časopis lékařů českých*. 1998, vol. 137, s. 168-170, ISSN 1803-6597.
4. RICHARD, Alyce M, James H DIAZ a Alan David KAYE. Reexamining the risks of drinking-water nitrates on public health. *Ochsner J* [online]. 2014, vol. 14, no. 3, s. 392-8, dostupné také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4171798/?tool=pubmed>>. ISSN 1524-5012.
5. XU, F, K S QUANDT a D E HULTQUIST. Characterization of NADPH-dependent methemoglobin reductase as a heme-binding protein present in erythrocytes and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. 1992, vol. 89, no. 6, s. 2130-4, dostupné také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC48610/?tool=pubmed>>. ISSN 0027-8424.
6. CORTAZZO, Jessica A a Adam D LICHTMAN. Methemoglobinemia: a review and recommendations for management. *J Cardiothorac Vasc Anesth* [online]. 2014, vol. 28, no. 4, s. 1043-7, dostupné také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953868>>. ISSN 1053-0770 (print), 1532-8422.
7. LEDVINA, M. Rychlé spektrofotometrické stanovení karbonylhemoglobinu v krvi. *Biochem Clin Bohemoslov*. 1987, vol. 16, s. 493-495, ISSN 0139-9608.
8. ŠEBKOVÁ, Sylva. *Otrava železem* [online]. ©2003. Poslední revize 2003-10-06, [cit. 2021-08-16]. <<http://medicina.cz/clanky/5819/34/Otrava-zelezem/>>.

Použitá literatura

- BUBNOVÁ, Eva, Alena BUDĚŠÍNSKÁ a Jana STRÍBRNÁ. *Praktická cvičení z lékařské chemie a molekulární biologie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. 200 s. ISBN 80-7184-725-9.
- BURTIS, Carl A a Edward R ASHWOOD. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. vydání. Philadelphia : Saunders, 1994. 2326 s. ISBN 0-7216-4472-4.
- ČERMÁK, J. Současné možnosti léčebného ovlivnění stavů s nedostatkem či nadbytkem železa v organismu. *Remedia*. 1994, roč. 4, s. 254-259, ISSN 0862-8947.
- DOLEŽALOVÁ, Věra, et al. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. 286 s. ISBN 80-7013-198-5.
- DZÚRIK, Rastislav. *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. 2. vydání. Martin : Osveta, 1996. 464 s. ISBN 80-217-0256-7.
- CHROMÝ, Vratislav. *Analytické metody v klinické chemii*. 1. vydání. Brno : Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2000. 211 s. ISBN 80-210-2363-5.
- KAPLAN, Lawrence A, Amadeo J. PESCE a Steven C. KAZMIERCZAK. *Clinical chemistry*. 3. vydání. St. Louis : Mosby, 1996. 1064 s. ISBN 0-8151-5243-4.
- Kolektiv autorů. *Lékařská chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha, Bratislava : Avicenum, Osveta, 1991.

- KRAML, Jiří. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*. 4. vydání. Praha : Karolinum, 1991. 311 s. ISBN 80-7066-453-3.
- MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie : požadování a hodnocení biochemických vyšetření..* 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998.. 832 s. ISBN 80-7184-650-3.
- MEŠKO, Dušan. *Vademékum klinickej biochémie*. 1. vydání. Martin : Osveta, 1998. 1647 s. ISBN 80-8063-005-4.
- MURRAY, Robert K, et al. *Harperova biochemie*. 2. vydání. Praha : H & H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5.
- RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Praha : Galén, 1999. ISBN 80-7262-023-1.
- SCHNEIDERKA, Petr. *Stanovení analytů v klinické biochemii*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1999. 153 s. sv. 1. ISBN 80-7184-761-5.
- SCHNEIDERKA, Petr. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. 119 s. ISBN 80-7184-505-1.
- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná toxikologie*. 1. vydání. Praha : Medprint, 1997. 87 s. ISBN 80-902036-4-7.
- TÁBORSKÁ, Eva a Josef TOMANDL, et al. *Biochemie*. 1. vydání. Brno : Masarykova univerzita, 1998. 160 s. ISBN 80-210-1736-8.
- TÁBORSKÝ, Otto, et al. *Metody klinické biochemie : určeno pro posluchače fakulty přírodovědecké*. 2. vydání. Praha : SPN, 1990. 158 s.
- THOMAS, Lothar, et al. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1. vydání. Frankfurt am Mein : TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. 1727 s. ISBN 3-9805215-4-0.
- ZIMA, Tomáš, et al. *Laboratorní diagnostika*. 1. vydání. Praha : Galén, 2003. 728 s. ISBN 80-7262-201-3.