

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Laboratorní diagnostika porfyrií

Klára Špácová

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical technology

Laboratory diagnostics of porphyria

Klára Špácová

Bachelor thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Špácová**
Osobní číslo: **C16250**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Laboratorní diagnostika porfyrií**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se laboratorní diagnostiky porfyrií.
2. V úvodu uvést rozdělení porfyrií a jednotlivé typy.
3. V další části popsat biochemickou diagnostiku porfyrií.
4. V závěru zmínit molekulárně-genetickou diagnostiku porfyrií.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

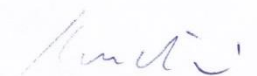
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



Ing. Petr Kalenda, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 7. 2019

.....
Klára Špácová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled. Děkuji také Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracování věnovala.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá laboratorní diagnostikou porfyrií. Porfyrie jsou způsobeny poruchou biosyntetické dráhy hemu. V první části bakalářské práce jsou popsány jednotlivé typy porfyrií a jejich projevy. Druhá část práce je zaměřena na laboratorní diagnostiku. V závěru je popsána molekulárně-genetická metoda pro diagnostiku porfyrií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Porfyrie, laboratorní diagnostika

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with laboratory diagnostics of porphyria. The porphyria are caused by a disorder of the heme biosynthetic pathway. In the first part of the bachelor thesis individual types of the porphyria and their manifestations are described. The second part is focused on laboratory diagnostics. In conclusion molecular-genetic method for porphyria diagnostics is described.

KEYWORDS

Porphyria, laboratory diagnostics

SEZNAM ILUSTRACÍ

OBRÁZEK 1: CHEMICKÁ STRUKTURA PORFYRINU	16
OBRÁZEK 2: STRUKTURA HEMU	16
OBRÁZEK 3: BIOSYNTETICKÁ DRÁHA HEMU	18
OBRÁZEK 4: PCT- PUCHÝŘE NA HŘBETU RUKY	23
OBRÁZEK 5: EPP	24
OBRÁZEK 6: CEP	26
OBRÁZEK 7: VYŠETŘOVACÍ ALGORITMUS	28
OBRÁZEK 8: CHROMATOGRAM PORFYRINŮ PRO PCT	35
OBRÁZEK 9: PŘEHLED HLAVNÍCH PORFYRIÍ A JEJICH ENZYMŮ	36
OBRÁZEK 10: STRUKTURA HMBS GENU	37
OBRÁZEK 11: DNA SEKVENOVÁNÍ HMBS	43

SEZNAM ZKRATEK

ADP	porfyrie z deficitu 5-aminolevulátdehydratázy (5-aminolevulinic acid dehydratase porphyria)
AIP	akutní intermitentní porfyrie (acute intermittent porphyria)
ALA	kyselina 5-aminolevulová (5-aminolevulinic acid)
ALAD	kyselina 5-aminolevulátdehydratáza (5-aminolevulinic acid dehydratase)
ALAS	kyselina 5-aminolevulová syntáza (5-aminolevulinic acid synthase)
ALAS2	erytroidní specifická kyselina 5-aminolevulová syntáza (erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase)
CEP	kongenitální erythropoetická porfyrie (congenital erythropoietic porphyria)
CPO	koproporfyriinogen oxidáza (coproporphyrinogen oxidase)
dATP	deoxyadenosintrifosfát (deoxyadenosine triphosphate)
dCTP	deoxycytosintrifosfát (deoxycytidine triphosphate)
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát (dideoxynucleotides triphosphate) dehydratase porphyria)
dGTP	deoxyguanosintrifosfát (deoxyguanosine triphosphate)
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát (deoxyribonucleotide triphosphate)
dTTP	deoxythymidintrifosfát (deoxythymidine triphosphate)
EPP	erythropoetická protoporfyrie (erythropoietic protoporphyria)
FECH	ferrochelátáza (ferrochelatase)
HCP	hereditární koproporfyrie (hereditary coproporphyria)
HEP	hepatoerythropoetická porfyrie (hepatoerythropoietic porphyria)
HMBS	hydroxymethylbilan syntáza (hydroxymethylbilan synthase)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBG	porfobilinogen (porphobilinogen)
PBGD	porfobilinogendeamináza (porphobilinogen deaminase)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PCT	porfyrie cutanea tarda (porphyria cutanea tarda)
PPOX	protoporfyriinogenoxidáza (protoporphyrinogen oxidase)
UROD	uroporfyriinogendekarboxyláza (uroporphyrinogen decarboxylase)
UROS	uroporfyriinogen III syntáza (uroporphyrinogen III synthase)
VP	porfyria variegata (variegata porphyria)
XLDPP	X-vázáná dominantní protoporfyrie (X-linked dominant protoporphyria)

OBSAH

Úvod.....	14
1 Porfyrie	15
1.1 Porfyriny	15
1.1.1 Hem.....	16
1.1.2 Biosyntéza hemu.....	17
1.2 Akutní porfyrie	18
1.2.1 Akutní intermitentní porfyrie.....	18
1.2.2 Porfyrina variegata.....	19
1.2.3 Hereditární koproporfyrie	19
1.2.4 Porfyrie s defektem ALA-dehydratázy.....	20
1.3 Akutní porfyrický záchvat	20
1.4 Léčba.....	21
1.5 Chronická porfyrie	22
1.5.1 Porfyrie cutanea tarda	22
1.5.2 Hepatoerytropoetická porfyrie	23
1.5.3 Erytropoetická protoporfyrie	23
1.5.4 X-vázaná dominantní protoporfyrie.....	24
1.5.5 Güntherova choroba.....	25
2 Laboratorní diagnostika.....	27
2.1 Vyšetřovací algoritmus	27
2.2 Stanovení prekurzorů porfyrinů.....	28
2.2.1 Stanovení kyseliny 5-aminolevulové.....	28
2.2.2 Stanovení porfobilinogenu.....	29
2.2.3 Celkové stanovení porfyrinů v moči a stolici	29
2.2.4 Stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů	30
2.2.5 Stanovení zinek–protoporfyrinu a volného protoporfyrinu	30

2.3	Speciální vyšetření	30
2.3.1	Stanovení aktivity enzymu kyseliny 5-aminolevulátdehydratázy ..	30
2.3.2	Stanovení aktivity enzymu porfobilinogendeaminázy	30
2.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	31
2.4.1	HPLC frakcionace porfyrinů v moči a ve stolici	31
2.5	Jednotlivá diagnostika.....	32
2.5.1	Diagnostika porfyrie s defektem kyseliny 5-aminolevulátdehydratázy.....	32
2.5.2	Diagnostika akutní intermitentní porfyrie.....	32
2.5.3	Diagnostika porfyrie variegata.....	32
2.5.4	Diagnostika erythropoetická protoporfyrie a X-vázaná dominantní protoporfyrie	33
2.5.5	Diagnostika kongenitální erythropoetická porfyrie	33
2.5.6	Diagnostika porfyrie cutanea tarda	34
2.5.7	Diagnostika hepatoerythropoetická porfyrie	35
2.5.8	Diagnostika hereditární koproporfyrie.....	35
3	Metody molekulárně-genetické	36
3.1	Geny.....	37
3.2	Izolace DNA	38
3.3	PCR.....	39
3.4	Elektroforéza.....	40
3.5	Purifikace	41
3.6	Sekvenování.....	41
3.6.1	Případ nově nalezené mutace.....	42
4	Závěr	44
	Použitá literatura	45

Úvod

Cílem této práce je přiblížit vzácnou dědičnou porfyrickou nemoc, která není příliš známá a popsat metody, které se využívají k její diagnostice.

V krvi je transportován kyslík pomocí hemoglobinu, který se skládá z bílkovinné části, globinu. Dále se skládá z nebílkovinné části, hemu, který je tvořený molekulou porfyrinu a atomem železa. Syntéza hemu probíhá v osmi krocích a je katalyzována různými enzymy. Defekt prvního enzymu, specifické kyseliny 5-aminolevulové syntázy (ALAS), vyvolává X-chromozomálně vázanou sideroblastickou anémii a poruchy zbylých sedmi enzymů způsobují specifické porfyrie. V důsledku těchto defektů dochází k nahromadění porfyrinů a jejich prekurzorů, kterými jsou jednodušší sloučeniny.

Porfyrie se rozděluje podle toho, jaké příznaky vyvolávají. Každá porfyrie je způsobena defektem specifického enzymu. Porfyrie lze také rozdělit podle toho, kde probíhá maximální akumulace porfyrinů, tedy na porfyrie jaterní a erytropoetické. Jednotlivé porfyrie lze rozeznat podle zvýšené hladiny porfyrinů v plazmě, moči a stolici.

Porfyriny mají dvojně vazby v pyrrolových jádrech, které jsou odpovědné za jejich charakteristickou absorpci a fluorescenci. Absorpční maximum je při 400-408 nm, této vlastnosti se využívá při spektrofotometrickém stanovení celkového množství porfyrinů v moči a stolici. Porfyriny při excitaci světlem červeně fluoreskují. V laboratorní diagnostice se k identifikaci jednotlivých porfyrií, také stanovuje enzymatická aktivita, nebo stanovení prekurzorů porfyrinu v moči nebo ve stolici.

V části molekulárně-genetické diagnostiky tato práce popisuje metody, které se využívají pro identifikaci jednotlivých mutací.

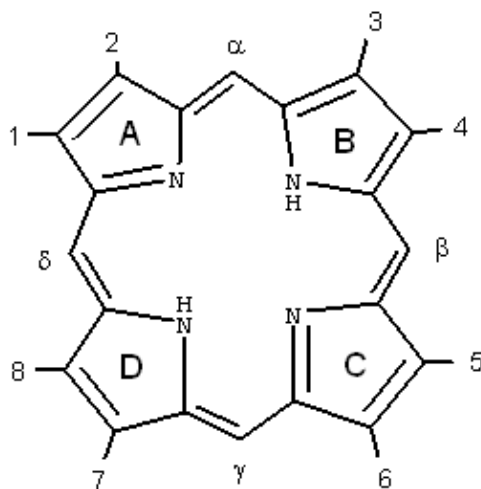
1 Porfyrie

Porfyrie jsou dědičná onemocnění způsobená metabolickými poruchami biosyntézy hemu. Jedná se převážně o vrozenou, vzácněji však získanou poruchu jednoho z osmi enzymů, které se účastní syntézy hemu. Každá porfyrie je způsobená abnormální funkcí samostatného enzymatického kroku, což má za následek specifickou akumulaci prekurzorů hemu. Dochází tak k zvýšené produkci a hromadění porfyrinů. Pro každou porfyrii je charakteristické typické spektrum akumulovaných a vylučovaných porfyrinů a jejich prekurzorů, kyseliny 5-aminolevulové (ALA) a porfobilinogenu (PBG). [1]

Porfyrie můžeme dělit do dvou hlavních skupin podle tkání, ve kterých probíhá maximální akumulace porfyrinů a prekurzorů. Můžeme je dělit na porfyrie jaterní a porfyrie erythropoetické. Využívá se také dělení na akutní neboli indukovatelné porfyrie a chronické porfyrie. [2]

1.1 Porfyriny

Porfyriny jsou cyklické tetrapyrroly, ve kterých jsou spojeny čtyři pyrrolové kruhy methinovými můstky (obr. 1). Porfyriny jsou vysoce stabilní sloučeniny, které silně absorbují světlo kolem vlnové délky 400 nm. Jsou také silně fluorescenční a vyzařují intenzivní červené světlo, když jsou excitovány světlem vlnové délky 400 nm. V oblasti Soretova pásu, jedná se o oblast s vlnovou délkou 390-450 nm, leží nejdůležitější absorpční pásmo porfyrinů. Tyto vlastnosti jsou způsobeny vysokým stupněm rezonance systému konjugovaných dvojných vazeb. Tyto optické vlastnosti usnadňují detekci porfyrinů, dokonce i při velmi nízkých koncentracích. Porfyriny vykazují v kyselém prostředí dva silné emisní pruhy o vlnové délce 600-610 nm a 640-660 nm. Této vlastnosti se využívá při spektrofluorometrických metodách k velmi citlivé detekci porfyrinů. [3]

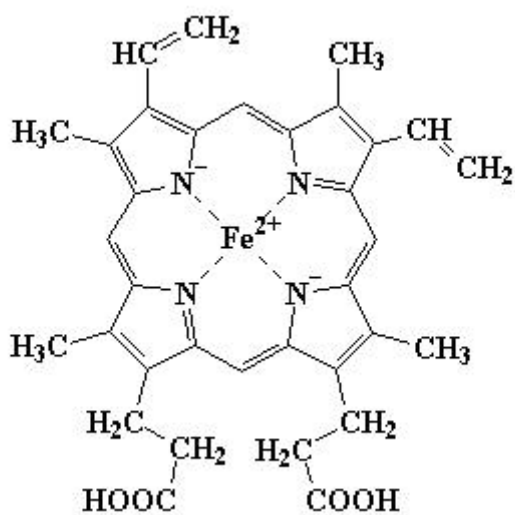


Obrázek 1: Chemická struktura porfyrinu [4]

1.1.1 Hem

Hem je molekula nezbytná k aerobnímu životu na Zemi. Je to základní kofaktor pro nesčetné množství hemoproteinů, jako jsou hemoglobin, myoglobin, cytochromy P-450. [5]

Skládá se z makrocyklu protoporfyrinu IX s centrálně zabudovaným iontem železa Fe^{2+} (obr. 2). Hem se využívá v celé řadě buněčných procesů, jako jsou detoxikace léčiv, řízení reaktivních forem kyslíku, a také regulace transkripce a translace pro různé geny. [6]

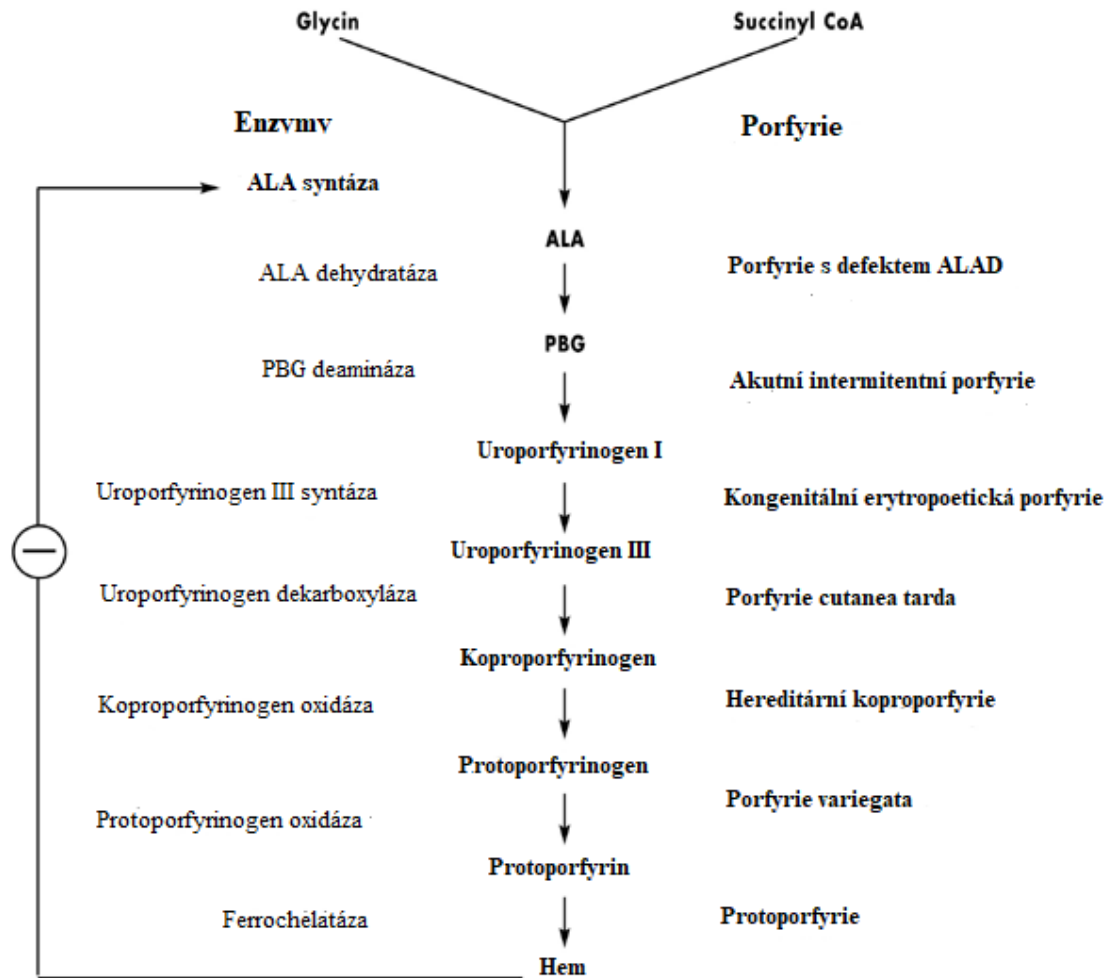


Obrázek 2: Struktura hemu [7]

1.1.2 Biosyntéza hemu

V lidském těle probíhá biosyntéza ve všech buňkách, nejvýrazněji se projevuje v erytroidních buňkách kostní dřeně kde se využívá k tvorbě hemoglobinu a také v jaterních buňkách, je využíván k vytvoření cytochromů P450. [8]

Syntéza hemu (obr. 3) začíná v mitochondriích konjugací sukcinyl-CoA s glycinem za vzniku kyseliny 5-aminolevulové (ALA). Tento děj je katalyzován enzymem ALAS, který reguluje rychlost celé syntézy hemu a nachází se v mitochondriální matrix. Poté ALA přechází z mitochondrií do cytoplazmy. U ALAS jsou známy dvě izoformy, ALAS1 je přítomna ve všech buňkách a ALAS2 je specifická pro erytroidní buňky. Následně dochází k vzniku PBG a to díky kondenzaci a následné dehydrataci dvou molekul ALA. Reakce je katalyzována enzymem 5-aminolevulátdehydratázou (ALAD). Poté dochází ke vzniku lineárního tetrapyrrolu hydroxymethylbilanu, tato reakce je katalyzována hydroxymethylbilansyntázou, známou také jako porfobilinogendeamináza (PBGD). Podstatou reakce je postupná kondenzace čtyř PBG, následně se deaminací odštěpí jejich aminoskupiny a dochází k uvolnění čtyř molekul amoniaku. V dalším kroku syntézy hemu probíhá cyklizace lineárního hydroxymethylbilanu pomocí uroporfyrinogen III syntázy (UROS) za tvorby velké makrocyclické struktury zvané uroporfyrinogen III. Následně dochází k postupné dekarboxylaci uroporfyrinogenu III na koproporfyrinogen III. Tato reakce je katalyzována enzymem uroporfyrinogendekarboxylázou (UROD), který katalyzuje čtyři následující dekarboxylace karboxymetylových skupin na postranních řetězcích. Tento enzym také katalyzuje přeměnu uroporfyrinogenu I na koproporfyrinogen I. Vzniklý koproporfyrinogen III se vrací zpět do mitochondrií, a to z důvodu, že všechny následující reakce jsou katalyzovány enzymy, které se nachází uvnitř nebo na mitochondriální membráně. V mitochondriích probíhá přeměna koproporfyrinogenu III na protoporfyrinogen IX, celá reakce je katalyzována enzymem koproporfyrinogenem oxidázou (CPO), který se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií. V následném kroku dochází k oxidaci protoporfyrinogenu IX na protoporfyrin IX. Reakce je katalyzována enzymem protoporfyrinogenoxidázou (PPOX). V posledním stupni syntézy hemu dochází k navázání Fe^{2+} do protoporfyrinu IX působením enzymu ferrochelátázy (FECH) a následného vzniku hemu. [6,7,8,5]



Obrázek 3: Biosyntetická dráha hemu [12]

1.2 Akutní porfyrie

Vždy se jedná o porfyrie jaterní, tedy hlavním místem pro akumulaci porfyrinů a jejich prekurzorů se stávají játra. Jsou známé čtyři druhy akutních jaterních porfyrií, jedná se o akutní intermitentní porfyrii (AIP), porfyrii variegata (VP), hereditární koproporfyrii (HCP) a porfyrii s poruchou ALAD (ADP). Označení jako „akutní“ se využívá z důvodu života ohrožujícími projevy a neidiovatelnou dobou trváním nemoci. Všechny akutní porfyrie vyvolávají podobně neuroviscerální projevy, bez ohledu na rozdílné enzymatické defekty.[2]

1.2.1 Akutní intermitentní porfyrie

AIP, známá také jako Švédská porfyrie nebo pyrroloporfyrie, je autozomálně dominantní porfyrie vyplývající z 50 % snížení aktivity PBGD, třetím enzymem biosyntézy hemu. Ve Skandinávských zemích se AIP vyskytuje u 1:1500. Jedná se

o vzácné onemocnění, které postihuje převážně ženy v reprodukčním období. Avšak u mužů se nemoc může projevit kolem třicátého roku. Jedná se o nejběžnější typ porfyrie, která se projevuje různými viscerálními, neurologickými a psychiatrickými projevy, které mohou být zaměňovány s jinými onemocněními. U tohoto typu se nikdy nevyskytují kožní projevy. A to z důvodu, že u AIP se akumulují prekurzory porfyrinů, které jsou fotodynamicky neaktivní, nikoliv porfyriny. AIP je způsobena deficitem enzymu porfobilinogendeaminázy, který má za následek akumulaci meziproductů, ALA a PBG, biosyntézy hemu v játrech a jejich zvýšenou exkreci do moči. [2,13,14,15,16]

Klinická exprese nemoci může být urychlena faktory, kterými jsou hormony, nutriční změny a také léky. Tyto faktory mají schopnost zvýšit syntézu cytochromu P-450 v játrech. [17]

1.2.2 Porfyria variegata

Jedná se o onemocnění autosomálně dominantně dědičné akutní jaterní porfyrie, způsobené PPOX, jedná se o předposlední enzym v syntéze hemu. Toto onemocnění se může projevit buď neurologickými projevy, kožní fotosenzitivitou, nebo se tyto příznaky mohou projevit zároveň. VP je velmi podobná AIP, pokud jde o klinické projevy. Ve většině populací je méně běžná než AIP, avšak v Jižní Africe je VP převládající. [17, 18]

Hlavními projevy jsou fotosenzitivita kůže, těžké záchvaty bolesti břicha, neuropatie a vzácně také psychiatrické problémy. Symptomy se téměř nevyskytují před pubertou. Kožní symptomy jsou způsobeny akumulací PPOX v kůži, projevují se křehkostí kůže a tvorbou puchýřů na oblastech těla vystavených slunečnímu záření. Kožní léze mohou být snadno zaměněny s porfyrií cutanea tarda (PCT). Neuroviscerální symptomy jsou nerozeznatelné od AIP. [17, 19]

1.2.3 Hereditární koproporfyrie

HCP je autozomálně dominantní jaterní porfyrie, způsobená poloviční aktivitou mitochondriálního enzymu koproporfyrinog oxidázou (CPO), tedy šestým enzymem v syntéze hemu. HCP je charakterizována velkým množstvím koproporfyrinu v moči a ve stolici, nárůst může být 10x až 200x větší oproti normálním hodnotám. V průběhu akutní ataky vysoce vzrostou hodnoty ALA a PBG v moči. [18, 20]

HCP je nejméně častá akutní porfyrie s autozomálně dominantní dědičností, která postihuje převážně ženy. Pravděpodobně to souvisí s tím, že ženy jsou častěji vystaveny rizikovým faktorům, kterými jsou hormony, např.: antikoncepce, léčba menopauzálních příznaků. Mezi další rizikové faktory se považují léky, zejména barbituráty. Pacienti s HCP mohou prožívat akutní neuroviscerální ataky a příležitostně se mohou objevit i kožní léze, které jsou podobné jako u PCT. [18, 21, 22]

1.2.4 Porfyrie s defektem ALA-dehydratázy

ADP je také nazývána jako Dossova porfyrie, nebo také plumboporfyrie, je velice vzácný typ porfyrie s autozomálně recesivní jaterní porucha v důsledku deficitu druhého enzymu, ALAD v syntéze hemu. Počet nahlášených případů s ADP bylo doposud pouze sedm. [23, 24]

ADP se vyznačuje zvýšeným množstvím ALA a koproporfyriu v moči. PBG je mírně zvýšený, avšak protoporfyriu v erytrocytech je trojnásobně zvýšený. Avšak pro správné stanovení ADP je důležité vyloučení jiných příčin deficitu ALAD a zvýšených hodnot ALA, tyto příznaky mohou být také vyvolány otravou olovem, nebo tyrosinemií. Tyto nemoci mají stejné příznaky, které jsou běžné u akutních porfyrií. K rozlišení otravy olovem se využívá stanovení úrovně olova v krvi a také aktivita ALAD, která se neobnoví po podání dithiotreitolu. [25]

1.3 Akutní porfyrický záchvat

Akutní porfyrický záchvat je nejzávažnější symptom, který je všem akutním jaterním porfyriím společný. Dědičná porucha u akutních porfyrií způsobuje snížení syntézy porfyriu a hemu v játrech a to způsobí zvýšení aktivity enzymu ALAS, jehož úkolem je kompenzovat danou poruchu. Nedostatek hemu a aktivace ALAS v přítomnosti specifické enzymatické poruchy, mají za následek akumulaci porfyriu a jejich prekurzorů v játrech, a tím se spustí kaskáda projevů typických pro porfyrický záchvat. [26]

Akutní atace často předchází kratší fáze, která je charakterizovaná nespavostí, úzkostí a neklidem. Akutní porfyrická ataka se může projevit velkým množstvím převážně nespecifických neuroviscerálních symptomů, včetně bolesti břicha, nevolnost, zvracení, tachykardie a svalové ochablosti. Hlavním indikátorem porfyrického záchvatu

je tmavě zbarvená moč, která se vyskytuje téměř bez výjimky. V polovině případů se také vyskytuje elektrolytová nerovnováha, hyponatrémie, která může být spouštěčem pro křeče. Méně časté příznaky jsou křeče a svalová ochablost. Ochrnutí dýchacích cest může vést až ke kómatu a smrti. Úmrtnost může dosáhnout až 5 %, pokud pacient není diagnostikován včas. Ataky mohou být urychleny i spouštěcími faktory jako jsou alkohol, infekce, léky, ale také snížený kalorický příjem. Psychické symptomy jsou různé a proměnlivé, mohou zahrnovat nespavost, zmatenost, halucinace a emocionální poruchy. Mezi neurologické příznaky se zahrnují neuropatie motorických nervů. Akutní porfyrický záchvat zpravidla netrvá déle než dva týdny, a návrat do normálního stavu je velice pomalý. [12, 27, 28]

1.4 Léčba

Pacienti často potřebují vysoké dávky opiátů v kombinaci s antiemetikem a fenothiazinem, jako je chlorpromazin, pro úzkost a neklid a pro snížení potřeby analgetik. K omezení rizika těžké hyponatrémie, je nutné pečlivé zvládnutí rovnováhy tekutin s vyloučením velkých objemů hypotonické dextrózy. Je třeba zajistit odpovídající příjem kalorií podávaných perorálně ve formě potravinových doplňků bohatých na sacharidy. [1]

Využívají se především dvě specifické terapie, glukóza a hematin. Glukózová léčba vede ke snížení vylučování prekurzorů do moči, avšak tento princip této léčby není zcela objasněn. Glukóza se využívá k udržení kalorií, protože při sníženém příjmu sacharidů se zhoršuje průběh akutního záchvatu. Léčebná dávka by měla být v rozmezí 300-400 g/den a měla by se podávat pomalu intravenózně. Ke snížení rizika vyvolání hyponatremie se s glukózou podávají i intravenózní tekutiny a každý den se měří míra elektrolytů. Při dostatečném podání glukózy, by se měla potlačit syntéza ALA. Avšak mnoho pacientů je vůči glukózové léčbě rezistentní. [25]

Při léčbě akutního porfyrického záchvatu se využívá hemin. Při intravenózním podání dochází k negativní zpětné vazbě ALAS, díky tomu dochází ke snížení hladin prekurzorů porfyriu ALA a PBG. [29]

1.5 Chronická porfyrie

Chronické porfyrie se vyznačují fotodermatitidou způsobenou nedostatkem UROD, pátého enzym v syntéze hemu. Chronické jaterní porfyrie zahrnují, porfyrii cutanea tarda, hepatoerythropoetická porfyrie a kongenitální erythropoetická porfyrie. [30]

1.5.1 Porfyrie cutanea tarda

PCT je nejčastější typ porfyrie na světě, a také se jedná o snadno léčitelný typ. Přibližně 60 % pacientů jsou muži ve věku 40 let. PCT je způsobena nedostatkem UROD. V poslední době byly rozlišeny dva druhy. Na PCT typu I, nazývanou také sporadická, u kterého se enzymatický nedostatek omezuje pouze na játra a je téměř nerozlišitelná od druhé formy. U PCT II typu se jedná o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, v němž dochází k poklesu enzymatické aktivity ve všech tkáních. [28,29]

Hlavním symptomem PCT jsou kožní léze, které jsou způsobeny interakcí mezi porfyrinem a viditelným světlem, k těmto reakcím dochází ve vyšší vrstvě kůže (obr. 4). Vzhledem ke své chemické struktuře jsou porfyriny fotoreaktivní a absorbují viditelné světlo o vlnových délkách 400-410 nm. Světlo o těchto vlnových délkách může pronikat hlouběji do kůže. Příznaky se projevují převážně na místech vystavených slunci, jako jsou hřbety rukou a obličej. Zahrnují fotosenzitivitu, která se projevuje citlivostí kůže a tvorbou puchýřů. Může se také objevit hypertrichóza, která se nejčastěji projevuje u žen, a to na spáncích a tvářích. [30,31]



Obrázek 4: PCT- puchýře na hřbetu ruky [35]

1.5.2 Hepatoerythropoetická porfyrie

Hepatoerythropoetická porfyrie (HEP) je vzácnou autozomálně recesivní formou kožních porfyrií. HEP je homozygotní forma familiárního typu PCT. Tento typ porfyrie je způsoben sníženou aktivitou UROD, stejným enzymem, který způsobuje PCT. Onemocnění je rozšířeno celosvětově a postihuje muže i ženy. [36]

Klinické projevy se obvykle vyvíjejí v útlém dětství, většinou již v prvním roce, a zahrnují extrémní fotosenzitivitu, hypertrichózu, křehkost kůže v oblastech vystavených slunečnímu záření a růžovou až červenou močí. V porovnání s PCT mají kožní projevy u HEP rychlejší nástup a mohou vést ke stejným deformacím jako u kongenitální erythropoetické porfyrie (CEP). [36]

1.5.3 Erythropoetická protoporfyrie

Erythropoetická protoporfyrie (EPP) je autosomálně recesivní fotodermatóza, která vyplývá z nedostatku ferrochelátázy, posledního enzymu v syntéze hemu. Následkem je akumulace protoporfyrinu v erythrocytech, který se uvolňuje v plazmě, játrech a cévním endotelu. Vystavení slunečnímu záření znamená fotoaktivaci akumulovaného protoporfyrinu, tato reakce vede k poškození tkáně a k silné bolesti, která se projevuje svěděním a pálením. Erythropoetická protoporfyrie se projevuje již v raném dětském věku při prvním vystavení slunečnímu záření. [32, 33]

Tyto symptomy mohou mít proměnlivou dobu trvání v závislosti na intenzitě a době trvání vystavení slunečnímu záření. Pokud byla expozice příliš dlouhá, může se objevit erytém a edém spolu s petechiemi. Postiženými oblastmi jsou nejčastěji hřbety rukou a obličej (obr. 5). Avšak na každé vystavené části těla se mohou objevit fotosenzitivní reakce. Reakce mohou přetrvávat po dobu hodin až dní. Opakované vystavení má za následek změnu vzhledu kůže. Tato změna se může projevit ztluštěním kůže s voskovým vzhledem. Dalším charakteristickým rysem jsou lineární rýhy a jizvy na rtech. Na rozdíl od jiných forem kožních porfyrií se u EPP neobjevují mílie, hypertrichóza nebo hyperpigmentace. [38, 39]

Důležitou prevencí kožních symptomů je ochrana před vystavením slunečnímu záření a také β -karoten, který snižuje produkci volných radikálů, čímž klesne citlivost kůže. Vzácně může dojít i na transplantaci jater, z důvodů vážných komplikací, které jsou spojeny s výrazným zvýšením protoporfyrinu v játrech. [17, 41]



Obrázek 5:EPP a) Akutní fotosenzitivní reakce a otok na obou rukou a zápěstí. b) Jemné zjizvení na nose. [12]

1.5.4 X-vázaná dominantní protoporfýrie

X-vázaná dominantní protoporfýrie (XLDPP) je způsobená mutacemi zesílení funkce ALAS2, erytroidní specifická izoforna prvního enzymu syntézy hemu. Tento typ porfyrie byl poprvé popsán v roce 2008. Klinický fenotyp je nerozeznatelný od EPP. Ve Velké Británii a Francii představuje XLDPP 2 % z rodin EPP, a v USA je to více

než 10 %. Od EPP se odlišuje vyšší koncentrací protoporfyrinu v erythrocytech, což způsobuje zvýšený výskyt onemocnění jater.[2, 42, 43, 44]

Pacienti s XLDPP jsou velice citliví na sluneční záření, stejně jako u EPP dochází k svědění a pálení kůže, které se popisuje jako sluneční kopřivka, avšak u tohoto typu jsou tyto projevy intenzivnější. U léčby se postupuje stejně jako u EPP, používáním ochranného oblečení a podávání β -karotenu. [45, 42]

1.5.5 Güntherova choroba

Třetím typem chronické porfyrie je Güntherova choroba známá také jako kongenitální erythropoetická porfyrie (CEP). Jedná se o vzácnou autozomálně recesivně dědičnou erythropoetickou porfyrii způsobenou výrazně sníženou aktivitou enzymu UROS. Pacienti mají zvýšenou hladinu uroporfyrinu I a koproporfyrinu I v erythrocytech. Tyto prekurzory porfyriu jsou uloženy v mnoha tkáních, kostech a také v zubech kde vytvářejí červené až hnědé zbarvení. Porfyriny jsou nejvíce akumulovány v kostní dřeni, erythrocytech, plazmě, stolici a moči, která má pak červenou barvu.

[7, 36, 37]

Závažnost kožních problémů se liší u každého pacienta s CEP, z důvodu rozlišného přebytku porfyriu. Fotosenzitivita kůže se nejčastěji projevuje již v prvních dnech života. Fotosenzitivita u kongenitální erythropoetické porfyrie je obvykle závažná a projevuje se popáleninami druhého až třetího stupně, společně s tvorbou puchýřů doprovázenými vředy nebo infekcí. V průběhu onemocnění dochází k zvýšené křehkosti a zranitelnosti kůže, také dochází k deformaci prstů, rukou a obličeje, zejména nosu, tváří, uší, rtů a čela (obr. 6). Příležitostně se však stává, že i kůže chráněná proti slunečnímu záření také vykazuje zvýšenou křehkost a snížené hojení ran. Nehty a prsty mohou být deformovány, ale pacient o ně může částečně přijít. Tyto kožní léze jsou srovnatelné, i když v menším měřítku, s PCT a HEP, ukazují na uroporfyrin jako patogenní fotosenzibilátor indikující, že stupeň kožního poškození závisí na porfyriu ve tkáních. [48]

K omezení poškození kůže se mohou využívat opalovací krémy s β -karotenem, hlavně zamezení vystavení kůže slunci. Další ochranné opatření, je včasná léčba sekundární bakteriální infekce, kterou lze podstatně snížit riziko zjizvení a deformace. Pro léčbu bakteriémie se využívají intravenózní antibiotika. Při léčbě CEP se také

využívají krevní transfúze, které mohou potlačit erythropoézu a tím snížit produkci porfyrinů, a díky tomu se také sníží fotosenzitivita. Ke snížení porfyrinu v kostní dřeni se využívá hydroxyurea. Avšak u všech výše uvedených se jedná o symptomatickou léčbu. Za dlouhodobou léčbu se považuje transplantace kostní dřene. [49, 50, 51]



Obrázek 6: CEP: Rozsáhlé zjizvení v obličeji s těžkou destrukcí chrupavky nosu, ztráta obočí a řas. Na pravém rameni hypertrychóza [11]

2 Laboratorní diagnostika

Bez důkladného pochopení biosyntézy hemu, správné klasifikace porfyrií je výběr vhodných diagnostických testů obzvláště obtížný. Nejjednodušší postup je rozdělit klinické projevy porfyrií do dvou obecných oblastí: kožní fotosenzitivitu a neurologické poruchy. Neurologické poruchy nebyly ještě plně vysvětleny, ale jsou spojeny s nadměrným množstvím vyloučených porfyrinových prekurzorů. Porfyrické poruchy, u kterých se vyskytuje pouze porfyrin v nadbytku, se vyznačují kožní fotosenzitivitou. Zatím co u porfyrií, které mají zvýšenou produkci prekurzorů porfyrinu, jsou charakteristické neurologické symptomy. A porfyrie, které mají zvýšenou produkci jak porfyrinů, ale také prekurzorů, jsou charakterizovány fotosenzitivou a neurologickými poruchami. Tyto úvahy umožňují vhodný výběr diagnostického testu. U symptomatických pacientů závisí diagnóza na identifikaci specifických vzorců akumulace porfyrinových prekurzorů a porfyrinů v moči, stolici a krvi, které charakterizují každý defekt enzymu. [52, 53]

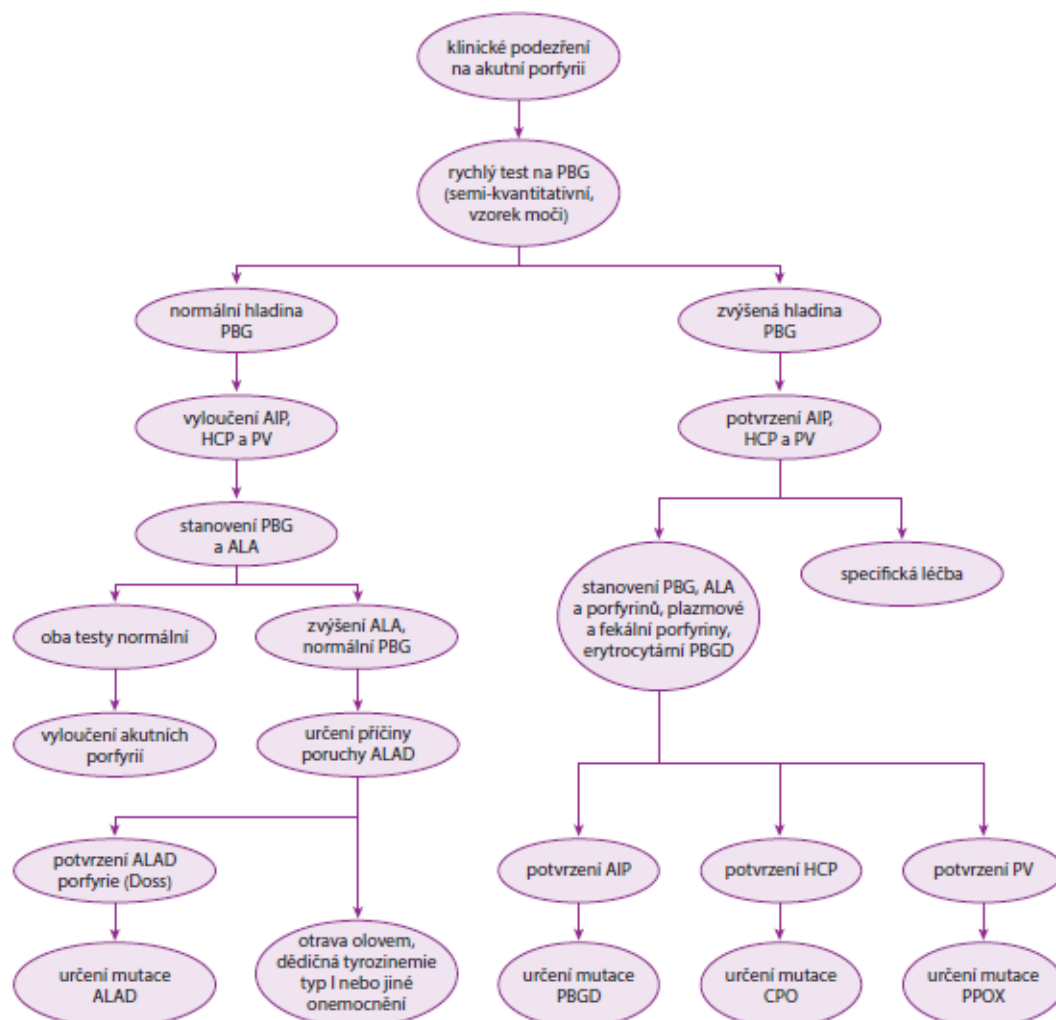
Enzymové testy jsou technicky obtížné a vyžadují tkáň, jako jsou kultivované fibroblasty, lymfocyty nebo jaterní biopsie, a proto jsou vzácně používány. Genetická analýza poskytuje přesnou diagnózu v některých porfyriích za předpokladu, že pacient má jednu z dříve popsanych mutací. Tato technika je v současné době omezena na několik výzkumných laboratoří. [54]

2.1 Vyšetřovací algoritmus

Při podezření na chronickou porfyrii u pacienta s kožními příznaky se stanovují celkové porfyriny z moči, sbírané 24 hodin, a stolice. U pacientů, kteří mají vyšší hodnoty odpadu močových porfyrinu nad 200 $\mu\text{g}/\text{den}$, či zvýšenými hodnotami obsahu porfyrinů ve stolici nad 200 nmol/g v sušině se vyšetřuje separace porfyrinů, v moči nebo ve stolici, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). [27]

U pacientů s akutní atakou lze odebrat vzorek moči během akutního záchvatu. Diagnóza se může potvrdit díky zvýšené hladině ALA a PBG, případně zvýšenou hodnotou celkových porfyrinů v moči. Při zvýšených hodnotách se také provádí separace porfyrinů metodou HPLC. K odlišení jednotlivých typů akutních porfyrií se využívá stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů. [27]

U pacientů v remisi, jsou zpravidla hodnoty porfyrinů a jejich prekurzorů v moči normální. Avšak při podezření je vhodné stanovit celkové porfyriny ve stolici. V případě zvýšeného množství se provádí separace porfyrinů HPLC metodou. [27] Schéma vyšetřovacího algoritmu je zobrazeno v obr. 7.



Obrázek 7: Vyšetřovací algoritmus [27]

2.2 Stanovení prekurzorů porfyrinů

2.2.1 Stanovení kyseliny 5-aminolevulové

Prvním krokem při diagnostice porfyrií je stanovení nadměrného množství ALA v moči. Jedná se o marker akutní ataky porfyrií. Stanovení ALA je taktéž důležité pro diagnostiku plumboporfyrie a otravu olovem. Referenční rozmezí pro ALA < 0,45 mg/dl. Ke stanovení se využívá čerstvá ranní moč. Principem rychlého stanovení ALA je přímá reakce moči s barevnými činidly. Využívá se zkumavkové metody, která je

velmi přesná. Moč se zahřívá s acetát-acetylacetonovým pufrům za vzniku pyrrolové struktury, která pak reaguje s modifikovaným Ehrlichovým činidlem za vzniku fialovo-růžového komplexu, který lze proměřit spektrofotometricky při 555 nm.

[27, 55]

2.2.2 Stanovení porfobilinogenu

PBG je marker akutních porfyrií a je citlivější než ALA. Referenční rozmezí pro PBG v ranní moči je < 0,25 mg/dl. PBG je méně stabilní, zejména v kyselém roztoku se rychle polymerizuje na uroporfyrin a hnědočervený pigment, porfobilin. [23,46]

Detekce a měření PBG je založeno na reakci s p-dimethylaminobenzaldehydem (Ehrlichovo činidlo) v kyselém prostředí (HCl) za vzniku červené produktu, který lze proměřit spektrofotometricky při 555 nm. [56]

Vzorky čerstvé moči, přibližně 25ml, jsou vhodnější než 24 hodinové odběry, i když je nepravděpodobné, že by se koncentrace výrazně změnily, aby se vytvořila nesprávná diagnóza. Avšak pH moči se musí udržovat v neutrálních hodnotách ve tmě při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje teplota -20 °C a případně upravit pH na hodnotu 7,0-7,5 pomocí hydrogenuhličitanu sodného. [56]

2.2.3 Celkové stanovení porfyrinů v moči a stolici

Stanovení celkových porfyrinů v moči je velice důležité pro chronické a akutní porfyrie. Pro toto stanovení se využívá 10 ml moči, která se sbírá po dobu 24 hodin. Porfyriny jsou vysoce konjugované makrocykly s charakteristickým elektronovým absorpčním spektrem, které mají intenzivní absorpční vrchol kolem 400 nm, Soretovo pásmo. Acidifikace moči zvyšuje absorbanci, usnadňuje přeměnu porfyrinogenu na porfyriny a disociuje cheláty zinku a porfyrinu. Tudiž celkový porfyrin lze detekovat spektrofotometricky okyselením moči. Porfyriny jsou citlivé na světlo a teplo, proto je tedy důležité moč sbírat do nádoby, která je zabalena do alobalu a uchovávat v chladu. [57]

Za fyziologických podmínek se ve stolici vyskytuje koproporfyrin, protoporfyrin a vzácně se také může vyskytovat uroporfyrin. Celkový obsah porfyrinů ve stolici může být měřen přímou spektrofotometrií kyselého extraktu stolice, za předpokladu, že červené fluorescenční pigmenty odvozené z chlorofylu, které také absorbují světlo

kolem 400 nm, jsou nejprve odstraněny extrakcí dietylétherem. Kvalitativní screeningové metody, které jsou závislé na postupech extrakce rozpouštědlem, jsou nespolehlivé a neměly by se používat. [57]

2.2.4 Stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů

Principem stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů je využití fluorescence porfyrinů. Porfyriny červeně fluoreskují po excitaci světlem o vlnové délce 400 nm. Pro jednotlivé typy porfyrinů je vlnová délka emitovaného světla částečně odlišná. Pro stanovení PCT, AIP, HK, CEP je vlnová délka v rozmezí 619-620 nm. Vlnová délka pro porfyrin variegata je 626-629 nm. EPP se stanovuje ve vlnové délce 633-635 nm, toto rozmezí se dá využít i pro otravu olovem. [58]

2.2.5 Stanovení zinek–protoporfyrinu a volného protoporfyrinu

Při stanovení zinek-protoporfyrinu a volného protoporfyrinu se využívá fluorescenční emisní spektrum v rozmezí 550 a 650 nm. Emisní píky pro zinek-protoporfyrin jsou 587 nm a pro volný protoporfyrin 630 nm. Pro zachování chelátu zinku je důležité použít neutrální činidlo pro extrakci. Vhodným činidlem je etanol, který extrahuje porfyriny bez disociování hemu z hemoglobinu. [57]

2.3 Speciální vyšetření

2.3.1 Stanovení aktivity enzymu kyseliny 5-aminolevolátdehydratázy

Princip metody stanovení ALAD je založen na inkubaci enzymu s přebytkem ALA. Porfobilinogen, který vznikne se smíchá s Erhlichovým činidlem. Vzniklé červené zbarvení se měří fotometricky proti blanku. Množství produkovaného PBG je měřením aktivity ALAD. [59]

2.3.2 Stanovení aktivity enzymu porfobilinogendeaminázy

Stanovení aktivity enzymu PBGD v erytrocytech může vést k identifikaci pacientů s podezřením na AIP. PBGD katalyzuje polymeraci čtyř molekul PBG na velice nestabilní hydroxymethylbilan, který je transformován na uroporfyrinogen III pomocí uroporfyrinogenu III syntázy. Za nepřítomnosti uroporfyrinogenu III syntázy se hydroxymethylbilan neenzymaticky cyklizuje na uroporfyrin I. Uroporfyrinogen I a III

jsou substráty pro uroporfyrinogendekarboxylázu, jejím působením se přemění na kopropofyrinogen I a III přes velké množství meziproductů. Skutečnost, že konverze PBG na hydroxymethylbilan pomocí PBGD vede k několika reakčním produktům, činí kvantifikaci PBGD aktivity obtížnou. Nicméně UPGS a UPGD mohou být inaktivovány. Za takových podmínek vznikne pouze jeden produkt uroporfyrinogenu I. Uroporfyrinogen I může být oxidován na uroporfyrin I, který může být stanoven spektrofotometrií, spektrofluorometrií nebo kombinací HPLC a fluorometrie. [60]

Spotřeba PBG a tvorba uroporfyrinu I jsou stechiometrické a aktivita PBGD může být tedy stanovena kvantifikací uroporfyrinu I za podmínek, kdy je jediným produktem.[60]

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejrozšířenější separační technikou využívanou v klinických i bioanalytických laboratořích. Tato metoda slouží i k stanovení velmi malých koncentrací. Tato metoda je založena na principu separace stanovovaných látek na základě rozdílné distribuce mezi mobilní a stacionární fází. [61]

Vzorek je pomocí dávkovače vpraven na začátek kolony do mobilní fáze. Kolona je tvořena stacionární fází. Nejčastěji využívanou stacionární fází je silikagel. Mobilní fáze odtékající z kolony obsahující eluát, rozdělené látky, je následně zaváděna do detektoru. Detektor na základě fyzikálně-chemických vlastností detekuje jednotlivé látky. Tyto vlastnosti mohou být založeny na měření optických vlastností nebo na elektrochemických vlastnostech. Důležitým požadavkem na detektor jsou vysoká citlivost detekce, vysoká rychlost odezvy a malý objem detekční cely. Často využívá spektrofotometrický detektor, který měří rozdíl absorpce UV/VIS mezi eluátem a čistou mobilní fází. Chromatogram je záznam z detektoru v závislosti signálu na čase. [61]

2.4.1 HPLC frakcionace porfyrinů v moči a ve stolici

Zvýšení celkové koncentrace fekálního porfyrinu vyžaduje další zkoumání frakcionací, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých porfyrinů, za použití HPLC, která odděluje izomery koproporfyrin I a III. [57]

Principem tohoto stanovení je okyselení vzorku a esterifikace porfyrinů, neutralizace kyseliny sírové s následnou extrakcí do chloroformu. Tato směs esterů se

následně rozdělí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím fluorometrické detekce. [58]

Tato analýza by se neměla používat pro diagnostiku EPP. Koncentrace porfyrinu jsou normální nejméně u 40 % pacientů s touto nemocí a mohlo by docházet k falešně pozitivním výsledkům v důsledku jiných příčin. Nejběžnější příčinou zvýšené koncentrace porfyrinu ve stolici je zácpa, zejména pokud výsledky nejsou vyjádřeny na základě suché hmotnosti a bakteriální degradace zvýšeného množství hemu ve střevě na protoporfyrin a příbuzné dikarboxylové porfyriny. Ty mohou vyvolat výrazné zvýšení, avšak které lze odlišit od jiných příčin nepřítomností důkazu o porfyrii z analýzy erytrocytů, plazmy nebo moči. [57]

2.5 Jednotlivá diagnostika

2.5.1 Diagnostika porfyrie s defektem kyseliny 5-aminolevulátdehydratázy

Biochemická diagnóza ADP zahrnuje prokázání výrazně nedostatečné aktivity erytrocytární ALAD. Mezi další ukazatele ADP patří výrazné zvýšení ALA v moči a koproporfyrinu III a malé nebo žádné zvýšení PBG v moči. Ačkoli biochemická měření mohou silně naznačovat ADP, diagnóza musí být potvrzena geneticky. [45]

2.5.2 Diagnostika akutní intermitentní porfyrie

Hlavní metodou pro průkaz AIP je stanovení aktivity PBGD v erytrocytech a to z důvodu, že u pacientů s AIP I a III typu je aktivita erytrocytární PBGD poloviční. Avšak pacienti II typu vykazují normální aktivitu PBGD v erytrocytech, ale mají sníženou aktivitu PBGD v neerytrocytických buňkách, jako jsou fibroblasty nebo lymfocyty. Dále se také využívá stanovení zvýšené exkrece ALA a PBG v moči. Využívá se i stanovení porfyrinů ve stolici pro správné odlišení AIP. Tato diferenční analýza je důležitá pro latentní pacienty, kvůli prevenci akutních atak, které mohou být způsobeny vnějšími vlivy. [62]

2.5.3 Diagnostika porfyrie variegata

Při akutním záchvatu jsou značně zvýšené hodnoty fekálního protoporfyrinu, koproporfyrinu a hodnoty koproporfyrinu v moči jsou také zvýšeny. V moči ALA, PBG a uroporfyrin se také během akutní ataky zvyšují, ale v remisi mohou být tyto hodnoty

normální nebo mírně zvýšené. U VP se plazmatický porfyrin zvyšuje a jeho analýza je citlivější než analýza porfyrinů ve stolici. Zvýšený plazmatický porfyrin je snadno detekovatelný jako maximum fluorescenční emise při 626-628 nm. Jedná se o specifický nález pro VP, protože fluorescenční emisní píky v EPP a PCT jsou nalezeny při 636 nm a 618-622 nm. [62]

2.5.4 Diagnostika erythropoetická protoporfyrie a X-vázaná dominantní protoporfyrie

U EPP je koncentrace plazmatického porfyrinu téměř vždy mírně zvýšená, avšak často méně než u jiných kožních porfyrií a může být i v normálních hodnotách zejména v mírných případech. Plasmové porfyriny jsou zvláště u EPP vystaveny fotodegradaci během zpracování roztoku, vzorek je potřeba dobře ochránit před přirozeným nebo fluorescenčním světlem. Porfyriny v moči jsou v normálních hodnotách. Pouze u EPP a velmi vzácně u sideroplastické anémie je volný protoporfyrin zvýšen v mnohem větším rozsahu než zinek-protoporfyrin. U všech ostatních porfyrií převažuje zinek-protoporfyrin, nebo je významnou složkou směsi porfyrinů. Proto ve všech vzorcích se zvýšenou koncentrací porfyrinů by se měl odlišit volný protoporfyrin a zinek-porfyrin. [45, 57]

Koncentrace celkových plazmatických porfyrinů je u XLDPP zvýšena, je možné je stanovit pomocí fluorescenčního emisního spektra při 362-634 nm. Při oddělení těchto dvou porfyrií se doporučuje molekulárně-genetická analýza. [63]

2.5.5 Diagnostika kongenitální erythropoetická porfyrie

U kongenitální erythropoetické porfyrie bývá exkrece porfyrinů v moči výrazně zvýšena, v rozmezí 50-100 mg/den. Uroporfyrin I a koproporfyrin tvoří většinu tohoto zvýšení. Fekální porfyriny jsou také zvýšeny a jsou zastoupeny koproporfyrinem I. Další možnosti jak diagnostikovat CEP jsou plazmatické porfyriny, které jsou výrazně zvýšeny. Výrazně zvýšené jsou i porfyriny erytrocytů, které jsou převážně uroporfyrin I a koproporfyrin I, u mírnějších případů může převládat protoporfyrin IX. [45]

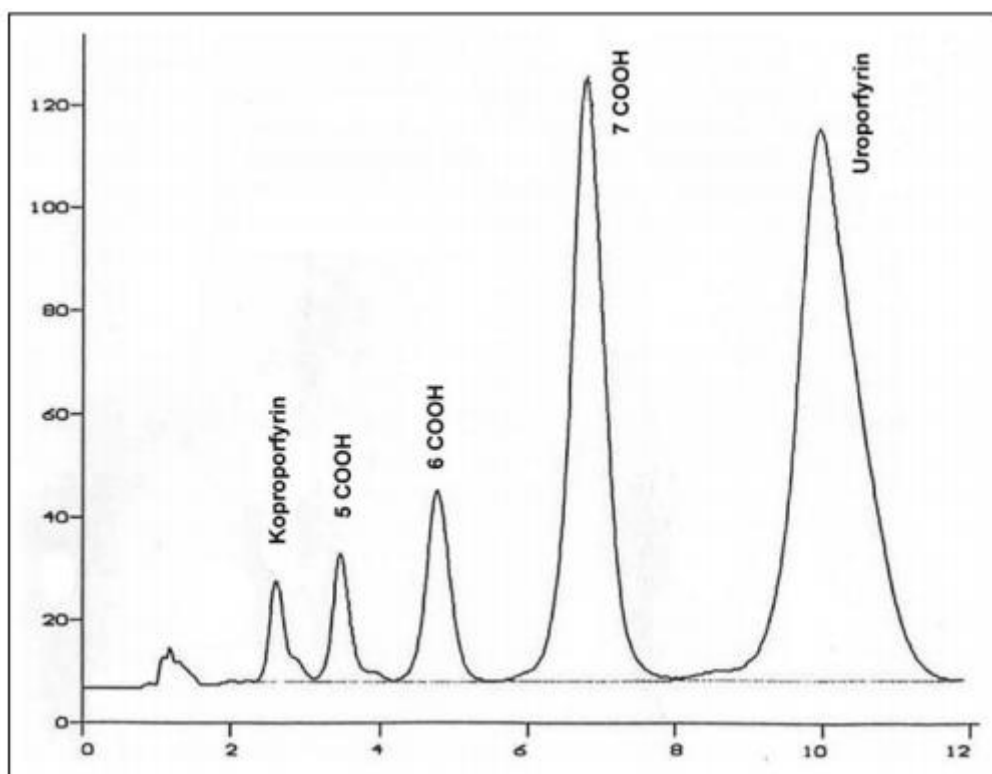
2.5.6 Diagnostika porfyrie cutanea tarda

Diagnóza u PCT se zpočátku stanovuje hodnocením porfyrinů v moči nebo v plazmě. Uroporfyrin a heptakarboxylporfyrin jsou významně zvýšeny. Hladina PBG je ve fyziologickém rozmezí a močová ALA je normální nebo mírně zvýšená. [45]

Stanovení porfyrinů v plazmě je nezbytné pro diagnostiku PCT u pacientů s pokročilým onemocněním ledvin, avšak je třeba zohlednit, že referenční rozmezí bude v tomto případě vyšší. Měření plazmových porfyrinů a stanovení fluorescenčního emisního píku při neutrálním pH je užitečnou screeningovou metodou při podezření na PCT. Podstatné je zvýšení píku při ~ 620 nm, ačkoli to není specifické zjištění, využívá se k vyloučení VP a pseudoporfyrií. [45]

Mírné případy CEP, nebo také HEP mohou napodobovat PCT. Z toho důvodu se také doporučuje měření porfyrinů erytrocytů, které jsou u PCT v referenčním rozmezí, popřípadě mírně zvýšené, avšak u CEP a HEP jsou výrazně zvýšeny. [45]

U PCT jsou celkové porfyriny ve stolici zvýšeny asi u 75 % pacientů s kožními lézemi, ale s remisí se vracejí do normálních hodnot. Frakcionace odhaluje specifický vzor abnormalit, které odlišují tento stav. Pro odlišení PCT od klinicky podobných bulózních dermatóz u pacientů s chronickým selháním je nutná analýza stolice nebo frakcionace plazmatických porfyrinů pomocí HPLC. [57] Na obr. 8 lze vidět typický chromatogram porfyrinů v moči.



Obrázek 8: Chromatogram porfyrynů pro PCT [58]

2.5.7 Diagnostika hepatoerythropoetická porfyrie

Klinická diagnóza HEP je především založena na zvýšených uro- a heptakarboxyl-porfyrynech v moči, převážně izomeru I. Koncentrace zinek-protoporfyriu v erythrocytech je zvýšený. Zvýšené koncentrace porfyrynů v plazmě, moči a stolici jsou podobné jako u PCT, a proto je důležitá molekulárně-genetická analýza. [3]

2.5.8 Diagnostika hereditární koproporfyrie

Nejvýznamnějším biochemickým znakem HCP je výrazný nárůst koproporfyriu, převážně izomeru III v moči a ve stolici. Během akutních záchvatů se také v moči zvyšuje koncentrace ALA, PBG a uroporfyryrín. Koncentrace plazmatických porfyrynů může být zvýšena, pokud jsou symptomy přítomny a jejich fluorescenční emisní vrchol je při 615-620 nm. HCP je jednoznačně stanovena analýzou DNA. [57,58]

3 Metody molekulárně-genetické

Každá, ze sedmi hlavních typů porfyrií je výsledkem částečného nedostatku jednoho z enzymu biosyntézy hemu. Tyto deficity daných enzymu jsou vrozené. Za posledních 11 let byly charakterizovány lidské geny pro dané enzymy a byla určena jejich chromozomální místa (obr. 9). Tyto objevy pomohly lépe porozumět patogenezi porfyrií a k lepší identifikaci pacientů a jejich rodin. [54]

Kongenitální erythropoetická porfyrie je jedinou porfyrií, u které byla úspěšně hlášena prenatální diagnostika. Ve všech případech byly koncentrace uroporfyrinu I v plodové vodě zvýšeny. Mutační analýza používající DNA z kultivovaných plodových buněk byla použita jako potvrzovací test a v budoucnu by měla umožnit prenatální diagnostiku. [54]

Metody molekulárně-genetické jsou nejpřesnější a nejspolehlivější metodou k určení porfyrické nemoci. DNA analýza zahrnuje sofistikované sekvenování DNA, které je náročné a drahé. Avšak detekuje více než 97 % známých mutací způsobující toto onemocnění. Testování DNA může být provedeno bez ohledu, zda je pacient symptomatický. [65]

Porfyrie	Enzym	Gen	Chromozom	Dědičnost
Porfyrie s defektem ALA dehydratázy	ALA dehydratáza	ALAD	9q34	AR
Akutní intermitentní porfyrie	Hydroximetylbilan syntáza	HMBS	11q24.1-24.2	AD
Kongenitální erythropoetická porfyrie	Uroporfyrinogen III syntáza	UROS	10q25.2-26.3	AR
Porfyrie cutanea tarda	Uroporfyrinogen dekarboxyláza	UROD	1q34	Vzácně
Hereditární koproporfyrie	Koproporfyrinogen oxidáza	CPO	3q12	AD
Porfyrie variegata	Protoporfyrinogen oxidáza	PPOX	1q21-23	AD
Erythropoetická protoporfyrie	Ferrochelátáza	FECH	18q21.3	AD

AR: autozomálně recesivní AD: autozomálně dominantní

Obrázek 9: Přehled hlavních porfyrií a jejich enzymů [86]

3.1 Geny

Mutace v genu HMBS, se nachází v chromozomální oblasti 11q24.1-24.2 (obr. 10) a obsahuje 15 exonů. Tento gen kóduje enzym PBGD, který je zapojen v třetím kroku biosyntézy hemu. V periferní krvi je enzym PBGD přítomen ve dvou izoformách, ubikvitních a erytroidních. Tyto izoformy vznikají ze dvou odlišných mRNA, které jsou transkribovány z ubikvitního promotoru a specifického erytroidního promotoru. [66, 67]

Většina pacientů vykazuje klasickou formu AIP, která vzniká v důsledku mutací společné oblasti genu HMBS, od exonu 3 po exon 15. U pacientů s neerytroidní variantou onemocnění, přibližně 5 % všech případů, jsou defekty hlášeny uvnitř nebo blízko kódující oblasti exonu 1, která je specifická pro ubikvitní izoformu PBGD. Dosud nejsou známy žádné mutace specifického erytroidního promotoru nebo exonu 2. Molekulární diagnostika AIP je komplikovaná, díky velké alelické heterogenitě, která vedla k 81 různým mutacím. [35, 66]



Obrázek 10: Struktura HMBS genu [35]

Gen PPOX se nachází na chromozomu 1q2.2-2.3, který obsahuje 13 exonů o rozsahu 8kb, jeden nekódující a 12 kódujících. Doposud bylo v genu PPOX identifikováno asi 130 různých mutací, které způsobily VP. Mutace v genu PPOX jsou heterogenní a většina z nich je jedinečná pro jednotlivé rodiny. Jedinou výjimkou je mutace R59W, která je přítomná asi u 96% všech pacientů z Jižní Afriky. Mutace 1329delTACAC byla hlášena jako zakladatelská mutace v chilské populaci. [17,60]

HCP je způsobena deficitem aktivity mitochondriálního enzymu CPOX. Enzymatický defekt je důsledkem dědičností mutací v genu CPO na chromozomu 3q12. Doposud bylo popsáno asi 36 mutací s vysokým podílem missense mutací, při kterých dochází k záměně aminokyselin. Většina pacientů jsou heterozygotní, avšak byly nahlášeny vzácné případy homozygotů. [69]

Dva typy porfyrií vyplývají ze snížené aktivity UROD: PCT a HEP. UROD gen byl zmapován na chromozomální oblasti 1q34. Gen obsahuje jeden promotor a 10 exonů, které kódují polypeptid s 367 aminokyselinami s molekulovou hmotností 41kDa. Doposud bylo identifikováno více než 100 mutací genu UROD u pacientu s PCT. U HEP bylo zatím zmapováno 10 mutací u 16 odlišných rodin. [30,48]

Gen UROS, byl přiřazen k úzké chromozomální oblasti 10q25.2-26.3. Doposud bylo hlášeno 49 různých mutací, avšak dvě missense mutace převládají. Jedná se o C73R a P248Q, tyto mutace způsobují ztrátu funkce, jejímž výsledkem je chybná syntéza proteinů. [46]

EPP je způsobená částečným nedostatkem FECH, posledního enzymu v biosyntéze dráze hemu. Gen FECH je na chromozomu 18q21.3 a obsahuje 11 exonů. Doposud bylo u pacientů s EPP identifikováno více než 88 různých mutací. [70]

ADP je velice vzácná porfyrie, která je výsledkem mutace v genu ALAD, který obsahuje dva nekódující exony a jedenáct kódujících exonů. Alternativní použití nekódujících exonů produkuje odlišné erytroidní a housekeeping mRNA. Missense mutace genu pro ALAD byla popsána u dvou nesouvisejících pacientů, kteří byli heterozygoti. [54]

XLDPP je způsobena mutací funkce v genu ALAS2, jedná se o 11. gen na chromozomu X. [42]

3.2 Izolace DNA

Výběr vhodné metody izolace DNA závisí na několika faktorech, ke kterým patří typ vybrané tkáně, čistota DNA a také finanční a časová náročnost. DNA nese genetický kód, který se nachází v jádru buněk. Jako materiál pro molekulárně genetické analýzy se využívá čistá DNA, proto je potřeba oddělit DNA od zbytku buňky. K lýze membrány se používají detergenty a enzymy, následně po uvolnění obsahu buňky je třeba mechanicky oddělit DNA z roztoku buněčného lyzátu a oddělit také proteiny, které jsou navázány na DNA. [71]

Metoda vsolování a vysolování patří mezi jedny z nejjednodušších metod pro izolaci DNA. Tato metoda je založena na principu změny rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentraci iontů v roztoku. S rostoucí koncentrací roste také

rozpuštěnost a DNA se do roztoku vsoluje. Po dosažení maxima začne klesat rozpuštěnost a DNA se z roztoku začne vysolovat. Nejčastější solí k vysolování je $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, který se vyznačuje velkou rozpuštěností a není závislá na teplotě. Tato metoda je rychlá, snadná, levná a také poskytuje kvalitní DNA. [72]

Další metoda k izolaci DNA je srážení organickými rozpouštědly. Tato metoda se v dnešní době příliš nepoužívá, protože je postupně nahrazovaná modernějšími separačními technikami. Principem metody je použití polárních, vodou mísitelných organických rozpouštědel, které snižují dielektrickou konstantu prostředí, díky tomu snižují rozpuštěnost a přispívají k vysrážení biopolymeru. K srážení nukleových kyselin se nejčastěji používá srážení koncentrovaným etanolem, etanolové srážení. Dále se může využívat aceton, metanol, propanol a isopropanol. Pro přesnější výsledky je zapotřebí, aby srážení probíhalo za nízkých teplot, kolem $0\text{ }^\circ\text{C}$, jinak hrozí denaturace vysrážených proteinů. [72]

3.3 PCR

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) a přímé sekvenování analyzovaných exonů a jejich sousedních oblastí je nejběžnější mutační analýzou. Tato metoda umožňuje získat požadovanou sekvenci genomové DNA. [73]

PCR je jednoduchý enzymatický test, který umožňuje amplifikaci specifického fragmentu DNA z komplexu DNA. PCR může být provedena pomocí zdrojové DNA z různých tkání, periferní krve, kůže, vlasů a slin. Každý PCR test vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů (oligonukleotidů), nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčovým enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR. Nukleotidy zahrnují čtyři báze – adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G). Tyto nukleotidy fungují jako stavební bloky, které DNA polymeráza využívá k vytvoření produktu PCR. Primery v reakci specifikují přesný úsek DNA, který má být amplifikován. Jedná se o krátké DNA fragmenty s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA, která má být detekovaná a amplifikovaná. [74]

Všechny uvedené složky se smíchají ve zkumavce nebo v jamkové destičce a následně se umístí do tepelného cyklu. V tomto přístroji se zvyšuje a snižuje teplota. Reakční roztok se nejprve zahřívá nad bodem tání dvou komplementárních řetězců DNA, v důsledku toho dochází k denaturaci. Následně se teplota sníží, aby se mohli

navázat specifické primery na cílové segmenty DNA. K navázání primerů a cílové DNA dochází pouze v případě, že jsou komplementární v sekvenci. Teplota se opět zvýší, a DNA polymeráza je schopna rozšířit primery přidáním nukleotidů do vyvíjejícího se řetězce DNA. S každým opakováním těchto tří kroků se počet zkopírovaných molekul DNA zdvojnásobí. [61,62]

Pro vizualizaci produktů PCR se využívají dva způsoby. Prvním metodou je barvení zmnoženého produktu DNA chemickým barvivem, jako je ethidiumbromid, který interkaluje neboli vmezeřuje mezi dvě vlákna DNA. Druhým typem je označení PCR primerů nebo nukleotidů fluorescenčním barvivem, fluoroforem, před PCR amplifikací. Tento způsob umožňuje, aby značky byly přímo začleněny do produktu PCR. Nejrozšířenější metodou analýzy produktu PCR je elektroforéza na agarózovém gelu, která odděluje produkty DNA na základě velikosti a náboje. [74]

3.4 Elektroforéza

Tento druh techniky pro izolaci a analýzu nukleových kyselin je jednou z nejpoužívanějších metod, protože se jedná o velice rychlou a levnou metodu, která umožňuje separovat velké množství nukleových kyselin, tak i velmi malé množství. Elektroforéza se také hojně využívá při analýz a dělení směsí bílkovin, může se také využít k určení povrchu mikroorganismů. [76]

Principem elektroforézy je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nositelem záporného náboje jsou fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny, v elektrickém poli, pohybují k opačně nabitě elektrodě, kterou je anoda. Kratší nukleové kyseliny jsou schopné migrovat matricí rychleji. [68, 69]

Gelová elektroforéza je běžná technika, která se využívá k vizualizaci proteinů a DNA. Gelová deska se připraví buď specifickou koncentrací agarózy nebo polyakrylamidu. Gel tvoří matici, skrz kterou vzorek prochází. Polyakrylamidový gel se využívá pro vizualizaci menších částí. [78]

Frakcionace proteinů, nukleových kyselin a dalších nabitých makromolekul obecně vyžaduje postupné použití několika kroků, z nichž jedna je citlivá primárně na molekulární velikost, jako u gelové filtrace, a druhá na bázi molekulárního náboje, jako se využívá u volné elektroforézy. Zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, označená jako polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE), současně využívá

rozdíly v molekulární velikosti a náboji pro účely frakcionace. PAGE poskytuje všestranný a šetrný způsob s vysokým rozlišením pro frakcionaci a fyzikálně chemickou charakterizaci molekul na základě jejich velikosti, konformace a náboje. [79]

3.5 Purifikace

Purifikace je přečištění nukleových kyselin. Jedná se o odstranění všech nežádoucích složek ze vzorku nukleové kyseliny. Pro čištění produktů PCR a následné sekvenování, které zahrnuje enzymatickou degradaci primerů a deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP). K degradaci primerů se používá exonukleáza I, která hydrolyzuje jednovláknovou DNA. Následně se používá alkalická fosfatáza (rSAP-Shrimp alkaline Phosphatase) pro defosforylaci zbývajících deoxynukleotidů. Tyto enzymy jsou velice silné a účinně degradují dNTP a primery v různých podmínkách. Další purifikační metody běžně používané k purifikaci produktů PCR jsou komerční filtrace nebo pomocí chromatografických sloupců. Metody chromatografických kolon je velice jednodušá a rychlé, avšak enzymatické čištění je také rychlou metodou. [80]

3.6 Sekvenování

Sekvenování DNA je proces, který se využívá k určení pořadí čtyř nukleotidů, kterými jsou adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T). Tyto nukleotidy tvoří molekulu DNA. V současné době existuje několik způsobů sekvenování DNA. Jsou vyvinuty dvě metody pro sekvenování DNA, Maxam-Gilbertova metoda a Sangerova metoda. V současnosti je více používanou metodou právě Sangerova metoda. [81]

Maxam-Gilbertova metoda využívá chemického štěpení jednotlivých typů bazí. Postup určuje nukleotidovou sekvenci terminálně značené molekuly DNA jejím rozbitím na jednotlivé nukleové báze pomocí chemických činidel. Jedno vláknová DNA se označí radioaktivním fosforem ^{32}P , a následně se rozdělí do čtyř zkumavek. V každé zkumavce DNA reaguje s jiným činidlem, které rozštěpí fragment v místě specifické báze. Vzniklé fragmenty se detekují pomocí PAGE podle velikosti. Autoradiograf gelu vytvořený ze čtyř různých chemických štěpení následně ukazuje vzor pásů, ze kterých lze sekvenci přečíst přímo. V současné době jsou elektroforeografy vyhodnocovány automaticky a zpracovány počítačem. [81]

Sangerova metoda využívá syntézy řetězců DNA s použitím specifických modifikovaných nukleotidů. Stanovovaná DNA je použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců s využitím DNA polymerázy. Syntéza DNA začíná od místa, kde je navázán specificky primer a končí v místě, na kterém je začleněn 2',3'didexyribonuklesidtrifosfát (ddNTP) místo deoxyribonukleosidtrifosfát (dNTP). ddNTP postrádá 3'-OH skupinu, která je potřebná k navázání dalšího dNTP. Funkcí ddNTP při syntéze DNA je koncový inhibitor. [82]

Princip metody spočívá v tom, že k templátové DNA nebo k produktu PCR se nejprve přidá značený primer, DNA polymeráza a dNTP. Od navázané DNA polymerázy probíhá syntéza DNA za přítomnosti dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) pro jednotlivé báze a jednoho ddNTP. Reakce probíhá ve čtyřech oddělených zkumavkách a v každé zkumavce je pouze jeden ddNTP. Do syntetizovaného řetězce se náhodně začlení ddNTP na místo příslušného dNTP. V důsledku chybějící OH- skupiny se po začlenění do syntetizovaného řetězce syntéza zastaví. Tak vznikají různé dlouhé fragmenty DNA, které lze analyzovat pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a po separaci fragmentů a díky radioaktivně značeným primerům se odečte délka jednotlivých fragmentů. [81]

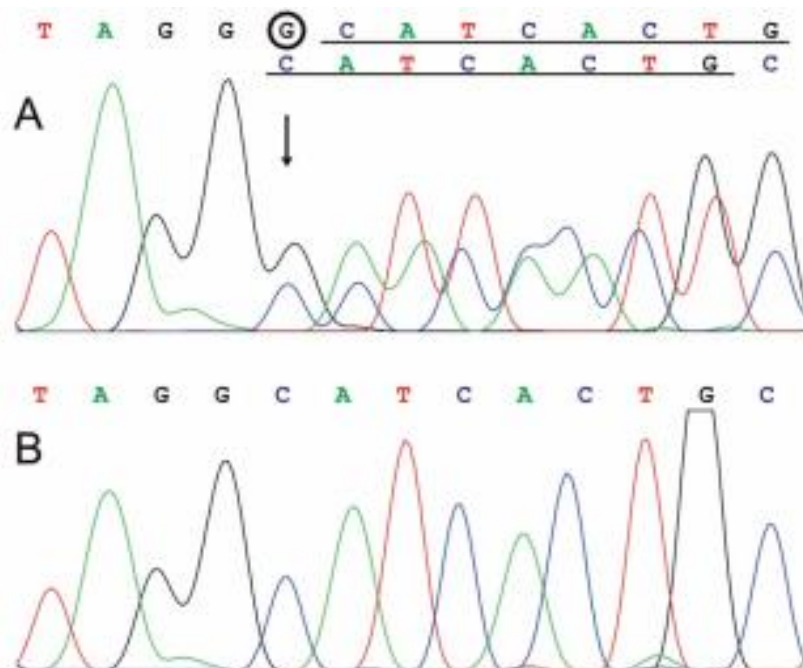
V současné době se již nevyužívají radioaktivní látky, ale používají se fluorescenční značky, kterými se značí primery nebo ddNTP. Při značení ddNTP se reakce může provádět pouze v jedné zkumavce. Produkty jsou následně analyzovány kapilární elektroforézou, ze které je získán sekvenogram. [67,68,69]

3.6.1 Případ nově nalezené mutace

Probandem byl muž z Nepálu, ve věku 50 let, který vyhledal odbornou pomoc z důvodu bolesti břicha a tmavou močí. Akutní jaterní porfyrie byla potvrzena pozitivním Watson-Schwartzovým testem. Pacient zaslal vzorky DNA od 18 členů jeho rodiny na analýzu DNA. [85]

Fragmenty amplifikované DNA byly pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy. Na exonu 15 byla nalezena mutace. Následná sekvenční analýza ukázala vložení jednoho G v poloze 9205, což vedlo k posunu čtecího rámce. Na obr. 11 je sekvenogram pacienta (A) a kontrola (B). Analýza bílkovinné sekvence ukázala, že čtyři aminokyseliny byly různé. To vedlo k předčasně zkrácenému proteinu v důsledku

stop kodonu, ve kterém bylo 44 aminokyselin C-konce PBGD chybělo. Tato mutace byla nalezena i u 12 členů rodiny. [85]



Obrázek 11: DNA sekvenování HMBS.[85]

4 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo popsat problematiku porfyrické nemoci. Porfyrie jsou heterogenní skupinou sedmi vrozených onemocnění způsobenou mutací genů, které ovlivňují enzymy působící při biosyntéze hemu. Následkem toho dochází k nahromadění porfyrinů a jejich prekurzorů, ALA a PBG. Porfyriny a jejich prekurzory se následně hromadí v játrech nebo kostní dřeni. Podle toho, kde se porfyriny hromadí lze porfyrie rozdělit na porfyrie jaterní a pokud se akumulují v kostní dřeni, jedná se o porfyrie erytropoetické.

Porfyrie lze také rozdělit podle toho, jaké příznaky vyvolávají. Porfyrie můžeme rozdělit na akutní a chronické. Akutní porfyrie neboli jaterní porfyrie, z důvodu maximální akumulace porfyrinů v játrech, kterými jsou akutní intermitentní porfyrie, hereditární koproporfyrie, porfyrie variegata a porfyrie z nedostatku enzymu ALAD. Chronické porfyrie se vyznačují kožními projevy a nedochází k atakám, jedná se o porfyrii cutanea tarda, erytropoetickou protoporfyrie a kongenitální erytropoetickou porfyrii.

Při akutní atace může dojít k poškození části nervové soustavy. Tato ataka bývá doprovázena silnými bolestmi břicha, nohou a zad, v závažných případech může dojít k obrně. Akutní ataku také doprovází psychické projevy, kterými jsou deprese, zmatenost či halucinace. K porfyrickému záchvatu může dojít i nezdravým životním stylem, nebo léky. Proto je důležité, aby lékaři a pacienti byli řádně obeznámeni s touto nemocí.

Laboratorní diagnostika porfyrií je důležitá pro včasnou indikaci konkrétní nemoci a zvolení správné léčby a k zabránění vážným důsledkům této nemoci. Biochemická diagnostika využívá zvýšených hodnot jednotlivých prekurzorů hemu nebo speciálních vyšetření aktivity enzymů.

V poslední části jsem popsala metody, které se využívají pro molekulárně-genetickou analýzu a jednotlivé kroky, kterými jsou izolace DNA, purifikace a sekvenování k určení jednotlivých defektů v molekule DNA. Molekulárně genetická diagnostika se využívá pro identifikaci všech členů rodiny, kteří by mohli být postiženi danou genetickou mutací. V závěru je popsán případ nově nalezené mutace.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] H. Puy, L. Gouya, a J.-C. Deybach, „Porphyrrias“, *Lancet*, roč. 375, č. 9718, s. 924–937, bře. 2010.
- [2] Z. Karim, S. Lyoumi, G. Nicolas, J.-C. Deybach, L. Gouya, a H. Puy, „Porphyrrias: A 2015 update“, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, roč. 39, č. 4, s. 412–425, zář. 2015.
- [3] A. T. Chemmanur a H. L. Bonkovsky, „Hepatic porphyrias: diagnosis and management“, *Clin. Liver Dis.*, roč. 8, č. 4, s. 807–838, lis. 2004.
- [4] B. Kristian, „Photosensitizers in medicine“, 2009. [Online]. Dostupné z: <http://photobiology.info/Berg.html>. [cit: 28-čer-2019].
- [5] B. Wang, S. Rudnick, B. Cengia, a H. L. Bonkovsky, „Acute Hepatic Porphyrrias: Review and Recent Progress“, *Hepatol. Commun.*, roč. 3, č. 2, s. 193–206, úno. 2019.
- [6] R. B. Piel, H. A. Dailey, a A. E. Medlock, „The mitochondrial heme metabolon: Insights into the complex(ity) of heme synthesis and distribution“, *Mol. Genet. Metab.*, led. 2019.
- [7] M. KODÍČEK, „Biochemické pojmy:výkladový slovník“, *Praha: VŠCHT Praha*, 2007. [Online]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=hem. [cit: 28-čer-2019].
- [8] G. Layer, J. Reichelt, D. Jahn, a D. W. Heinz, „Structure and function of enzymes in heme biosynthesis“, *Protein Sci.*, roč. 19, č. 6, s. 1137–1161, kvě. 2010.
- [9] N. Pallet, A. Karras, E. Thervet, L. Gouya, Z. Karim, a H. Puy, „Porphyria and kidney diseases“, *Clin. Kidney J.*, roč. 11, č. 2, s. 191–197, dub. 2018.
- [10] H. W. Lim a G. M. Murphy, „The porphyrias“, *Clin. Dermatol.*, roč. 14, č. 4, s. 375–387, čvc. 1996.
- [11] Thunell, P. Harper, A. Brock, N., „Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. II. Diagnosis and monitoring in the acute porphyrias“, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, roč. 60, č. 7, s. 541–560, led. 2000.

- [12] A.-M. van Tuyll van Serooskerken, P. Poblete-Gutiérrez, a J. Frank, „The Porphyrrias: Clinic, Diagnostics, Novel Investigative Tools and Evolving Molecular Therapeutic Strategies", *Skin Pharmacol. Physiol.*, roč. 23, č. 1, s. 18–28, 2010.
- [13] G. Elder, P. Harper, M. Badminton, S. Sandberg, a J.-C. Deybach, „The incidence of inherited porphyrias in Europe", *J. Inherit. Metab. Dis.*, roč. 36, č. 5, s. 849–857, zář. 2013.
- [14] G. H. New, P.-Y. Hsu, a M.-H. Wu, „Acute intermittent porphyria exacerbation following in vitro fertilization treatment", *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, roč. 55, č. 2, s. 281–284, dub. 2016.
- [15] S. Alshammary, R. A. Dulaijan, K. Saleh, H. Zakaria, A. Eldamati, N. Alwakeel, A. Al-Mulhim., „Acute intermittent porphyria after right hemi-colectomy", *Int. J. Surg. Case Rep.*, roč. 40, s. 116–119, led. 2017.
- [16] S. Sassa, „Diagnosis and therapy of acute intermittent porphyria.", *Blood Rev.*, roč. 10, č. 1, s. 53–8, bře. 1996.
- [17] S. Sassa a A. Kappas, „Molecular aspects of the inherited porphyrias", *J. Intern. Med.*, roč. 247, č. 2, s. 169–178, úno. 2000.
- [18] M. Siegesmund, A.-M. van Tuyll van Serooskerken, P. Poblete-Gutiérrez, a J. Frank, „The acute hepatic porphyrias: Current status and future challenges", *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, roč. 24, č. 5, s. 593–605, říj. 2010.
- [19] P. Meissner, P. Adams, a R. Kirsch, „Allosteric inhibition of human lymphoblast and purified porphobilinogen deaminase by protoporphyrinogen and coproporphyrinogen. A possible mechanism for the acute attack of variegate porphyria.", *J. Clin. Invest.*, roč. 91, č. 4, s. 1436–1444, dub. 1993.
- [20] A. Hasanoglu, M. Balwani, C. S. Kasapkara, F. S. Ezgu, I. Okur, L. Tumer, A. Cakamak, I. Nazarenko, C. Yu, S. Clavero., „Harderoporphyria due to homozygosity for coproporphyrinogen oxidase missense mutation H327R", *J. Inherit. Metab. Dis.*, roč. 34, č. 1, s. 225–231, úno. 2011.
- [21] G. H. Elder, „THE PRIMARY ENZYME DEFECT IN HEREDITARY COPROPORPHYRIA", *Lancet*, roč. 308, č. 7997, s. 1217–1219, pro. 1976.

- [22] K. Anderson, „Disorders of heme biosynthesis : X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias", *undefined*, 2001.
- [23] M. Doss, R. von Tiepermann, a J. Schneider, „Acute hepatic porphyria syndrome with porphobilinogen synthase defect.", *Int. J. Biochem.*, roč. 12, č. 5–6, s. 823–6, 1980.
- [24] M. Maruno, K. Furuyama, R. Akagi, Y. Horie, K. Meguro, L. garbaczewski, N. Chiorazzi, M. O. Doss, A. Hassoun, R. Marcelis, L. Varsraeten, P. Harper, Y. Floderus, S. Thunell, S. Sassa, „Highly heterogeneous nature of delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) deficiencies in ALAD porphyria.", *Blood*, roč. 97, č. 10, s. 2972–8, kvě. 2001.
- [25] Y. Nordmann a H. Puy, „Human hereditary hepatic porphyrias", *Clin. Chim. Acta*, roč. 325, č. 1–2, s. 17–37, lis. 2002.
- [26] S. Thunell, „The attack of acute porphyria.", *Lakartidningen*, roč. 113, 2016.
- [27] P. a P. U. Hůlek, *Hepatologie*, 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2018.
- [28] H. Bonkowsky a W. Schady, „Neurologic Manifestations of Acute Porphyria", *Semin. Liver Dis.*, roč. 2, č. 02, s. 108–124, kvě. 1982.
- [29] S. Arora, S. Young, S. Kodali, a A. K. Singal, „Hepatic porphyria: A narrative review", *Indian J. Gastroenterol.*, roč. 35, č. 6, s. 405–418, lis. 2016.
- [30] A. J. Thomas, „Chronic Porphyria", *BMJ*, roč. 1, č. 4648, s. 285–286, úno. 1950.
- [31] J. Frank a P. Poblete-Gutiérrez, „Porphyria cutanea tarda – When skin meets liver", *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, roč. 24, č. 5, s. 735–745, říj. 2010.
- [32] C. Fritsch, K. Lang, S. Schmiedeberg, K. Bolsen, H. Merk, P. Lehman, T. Ruzicka, „Porphyria cutanea tarda", *Skin Pharmacol. Physiol.*, roč. 11, č. 6, s. 321–335, 1998.
- [33] A. K. Singal, „Porphyria cutanea tarda: Recent update", *Mol. Genet. Metab.*, led. 2019.
- [34] D. Schulenburg-Brand, R. Katugampola, A. V. Anstey, a M. N. Badminton, „The Cutaneous Porphyrias", *Dermatol. Clin.*, roč. 32, č. 3, s. 369–384, čvc. 2014.

- [35] F. Granata, M. Mendez, V. Brancaleoni, F. J. Castelbon, G. Graziadei, P. Ventura, E. Di Pierro., „Molecular characterization, by digital PCR analysis of four HMBS gene mutations affecting the ubiquitous isoform of Porphobilinogen Deaminase (PBGD) in patients with Acute Intermittent Porphyria (AIP)", *Mol. Genet. Metab.*, roč. 125, č. 3, s. 295–301, lis. 2018.
- [36] V. M. S. Ramanujam a K. E. Anderson, „Porphyria diagnostics-part 1: A brief overview of the porphyrias", *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, roč. 2015, 2015.
- [37] S. M. Lala, H. Naik, a M. Balwani, „Diagnostic Delay in Erythropoietic Protoporphyrin", *J. Pediatr.*, roč. 202, s. 320-323.e2, lis. 2018.
- [38] H. Naik, S. Shenbagam, A. M. Go, a M. Balwani, „Psychosocial issues in erythropoietic protoporphyria - the perspective of parents, children, and young adults: A qualitative study", *Mol. Genet. Metab.*, led. 2019.
- [39] M. Lecha, H. Puy, a J.-C. Deybach, „Erythropoietic protoporphyria", *Orphanet J. Rare Dis.*, roč. 4, č. 1, s. 19, pro. 2009.
- [40] T. M. Cox, „Protoporphyrin", *Porphyr. Handb.*, s. 121–149, led. 2003.
- [41] M. M. MATHEWS-ROTH, „Carotenoids in Erythropoietic Protoporphyrin and Other Photosensitivity Diseases", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, roč. 691, č. 1 Carotenoids i, s. 127–138, pro. 1993.
- [42] M. J. Seager, S. D. Whatley, A. V. Anstey, a T. P. Millard, „X-linked dominant protoporphyria: a new porphyria", *Clin. Exp. Dermatol.*, roč. 39, č. 1, s. 35–37, led. 2014.
- [43] S. D. Whatley, N. G. Mason, S. A. Holme, A. V. Anstey, G. H. Elder, a M. N. Badminton, „Molecular epidemiology of erythropoietic protoporphyria in the U.K.", *Br. J. Dermatol.*, roč. 162, č. 3, s. 642–646, bře. 2010.
- [44] S. D. Whatley, S. Ducamp, P. Harvé, J. C. Deybach, G. Mieli-Vergani, Y. Ma, J. T. Marsden, R. J. Hift, L. Gouya, B. Grandchamp, C. Beaumont, M. N. Badminton, G.H. Elder, S. Alexandr., „C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload.", *Am. J. Hum. Genet.*, roč. 83, č. 3, s. 408–14, zář. 2008.

- [45] J. D. Phillips, „Heme biosynthesis and the porphyrias", *Mol. Genet. Metab.*, dub. 2019.
- [46] Y. Bhat, M. Sheikh, M. Sheikh, a A. Baba, „Günther disease in an infant", *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, roč. 2, č. 1, s. 308–309, led. 2009.
- [47] U. Gross, G. F. Hoffmann, a M. O. Doss, „Erythropoietic and hepatic porphyrias", *J. Inherit. Metab. Dis.*, roč. 23, č. 7, s. 641–661, 2000.
- [48] C. Fritsch, K. Lang, K. Bolsen, P. Lehmann, a T. Ruzicka, „Congenital Erythropoietic Porphyria", *Skin Pharmacol. Physiol.*, roč. 11, č. 6, s. 347–357, 1998.
- [49] M. M. Mathews-Roth, „Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases.", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, roč. 691, s. 127–38, pro. 1993.
- [50] S. Piomelli, M. B. Poh-Fitzpatrick, C. Seaman, L. M. Skolnick, a W. E. Berdon, „Complete Suppression of the Symptoms of Congenital Erythropoietic Porphyria by Long-Term Treatment with High-Level Transfusions", *N. Engl. J. Med.*, roč. 314, č. 16, s. 1029–1031, dub. 1986.
- [51] R. J. Dsnick a K. H. Astrin, „Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment", *Br. J. Haematol.*, roč. 117, č. 4, s. 779–795, čer. 2002.
- [52] J. P. Kushner, „Laboratory Diagnosis of the Porphyrins", *N. Engl. J. Med.*, roč. 324, č. 20, s. 1432–1434, kvě. 1991.
- [53] A. K. Aarsand, J. H. Villanger, E. Stole, J.C. Deybach, J. Marsden, J. To-Figueas, M. Badminton, G.H. Elder, S. Sandberg., „European Specialist Porphyria Laboratories: Diagnostic Strategies, Analytical Quality, Clinical Interpretation, and Reporting As Assessed by an External Quality Assurance Program", *Clin. Chem.*, roč. 57, č. 11, s. 1514–1523, lis. 2011.
- [54] G. H. Elder, „Genetic defects in the porphyrias: types and significance.", *Clin. Dermatol.*, roč. 16, č. 2, s. 225–33, bř. 1998.
- [55] N. Satgunasingam, E. S. C. Quek, a J. E. Buttery, „A simple method for the determination of urinary ALA", *Pathology*, roč. 7, č. 3, s. 250–251, led. 1975.

- [56] G. H. Elder, S. G. Smith, a S. J. Smyth, „Laboratory Investigation of the Porphyrrias", *Ann. Clin. Biochem. An Int. J. Biochem. Lab. Med.*, roč. 27, č. 5, s. 395–412, zář. 1990.
- [57] A. C. Deacon a G. H. Elder, „ACP Best Practice No 165: Front line tests for the investigation of suspected porphyria", *J. Clin. Pathol.*, roč. 54, č. 7, s. 500–507, čvc. 2001.
- [58] L. Vítek, „Diagnostika porfyrické nemoci - Část 2.", 2013. [Online]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/22008/klin1.pdf>. [Viděno: 10-čer-2019].
- [59] S. K. H. Berlin A., „European standardized method for the determination of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood.Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie", *Clin. Chem. Lab. Med.*, roč. 12, č. 8, 1974.
- [60] E. J. Erlandsen, P. E. Jørgensen, S. Markussen, a A. Brock, „Determination of porphobilinogen deaminase activity in human erythrocytes: pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements.", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, roč. 60, č. 7, s. 627–34, lis. 2000.
- [61] V. Pacáková, *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: Univerzita Karlova, 1986.
- [62] S. Sassa, „Modern diagnosis and management of the porphyrias", *Br. J. Haematol.*, roč. 135, č. 3, s. 281–292, lis. 2006.
- [63] M. Balwani, „Erythropoietic Protoporphyrria and X-Linked Protoporphyrria: pathophysiology, genetics, clinical manifestations, and management", *Mol. Genet. Metab.*, led. 2019.
- [64] K. R. Allen, S. D. Whatley, T. J. Degg, a J. H. Barth, „Hereditary coproporphyrria: Comparison of molecular and biochemical investigations in a large family", *J. Inherit. Metab. Dis.*, roč. 28, č. 5, s. 779–785, zář. 2005.
- [65] The Mount Sinai Genetic Testing Laboratory, „DNA testing for Porphyria | Porphyria Foundation". [Online]. Dostupné z: <https://porphyriafoundation.org/patients/about-porphyria/testing-porphyria/dna-testing-porphyria>. [cit: 30-čer-2019].

- [66] H. Puy, J. C. Deybach, J. Lamoril, A.M. Robreau, V. Da Silva, L. Gouya, B. Grandchamp, Y. Nordmann „Molecular Epidemiology and Diagnosis of PBG Deaminase Gene Defects in Acute Intermittent Porphyria", *Am. J. Hum. Genet.*, roč. 60, č. 6, s. 1373–1383, čer. 1997.
- [67] H. Namba, K. Narahara, K. Tsuji, Y. Yokoyama, a Y. Seino, „Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1&arr;q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies", *Cytogenet. Genome Res.*, roč. 57, č. 2–3, s. 105–108, 1991.
- [68] M. V Rossetti, B. X. Granata, J. Giudice, V. E. Parera, a A. Batlle, „Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with variegate porphyria", *BMC Med. Genet.*, roč. 9, č. 1, s. 54, pro. 2008.
- [69] J. To-Figueras, C. Badenas, M. T. Enríquez, S. Segura, C. Alvarez, M. Mila. M. Lecha, C. Herrero, „Biochemical and genetic characterization of four cases of hereditary coproporphyria in Spain", *Mol. Genet. Metab.*, roč. 85, č. 2, s. 160–163, čer. 2005.
- [70] S. Taketani, J. Inazawa, Y. Nakahashi, T. Abe, a R. Tokunaga, „Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18", *Eur. J. Biochem.*, roč. 205, č. 1, s. 217–222, dub. 1992.
- [71] J. A. Swenberg, A.-J. L. Ham, K. S. McDorman, E. J. Morinello, J. Nakamura, a R. Schoonhoven, „Methods for Measuring DNA Adducts and Abasic Sites I: Isolation, Purification, and Analysis of DNA Adducts in Intact DNA", in *Current Protocols in Toxicology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [72] J. Káš, M. Kodíček, a O. Valentová, *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, 2005.
- [73] U. Szlendak, K. Bykowska, a A. Lipniacka, „Clinical, Biochemical and Molecular Characteristics of the Main Types of Porphyria", *Adv. Clin. Exp. Med.*, roč. 25, č. 2, s. 361–368, 2016.
- [74] L. Garibyan a N. Avashia, „Polymerase Chain Reaction", *J. Invest. Dermatol.*, roč. 133, č. 3, s. 1–4, bře. 2013.

- [75] H. U. Weier a J. W. Gray, „A programmable system to perform the polymerase chain reaction.", *DNA*, roč. 7, č. 6, s. 441–7.
- [76] J. Šmarda, J. Doškař, R. Pantůček, V. Růžičková, a J. Koptíková, *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, 2005.
- [77] L. Koontz, „Agarose Gel Electrophoresis", *Methods Enzymol.*, roč. 529, s. 35–45, led. 2013.
- [78] J. Anderson, D. Wright, a K. Meksem, „Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Visualization of Simple Sequence Repeats", in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, roč. 1006, 2013, s. 167–177.
- [79] A. Chrambach a D. Rodbard, „Polyacrylamide Gel Electrophoresis", *Science (80- .)*, roč. 172, č. 3982, s. 440–451, dub. 1971.
- [80] J. Bum Kim a S. Blackshaw, „One-Step Enzymatic Purification of PCR Products for Direct Sequencing", in *Current Protocols in Human Genetics*, roč. Chapter 11, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, s. Unit 11.6.
- [81] A. M. Maxam a W. Gilbert, „A new method for sequencing DNA.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 74, č. 2, s. 560–564, úno. 1977.
- [82] F. Sanger a A. R. Coulson, „A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase", *J. Mol. Biol.*, roč. 94, č. 3, s. 441–448, kvě. 1975.
- [83] F. Sanger, S. Nicklen, a A. R. Coulson, „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 74, č. 12, s. 5463–5467, pro. 1977.
- [84] L. M. Smith *et al.*, „Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis", *Nature*, roč. 321, č. 6071, s. 674–679, čer. 1986.
- [85] E. Flachsová, I. C. Verma, D. Ulbrichová, R. Saxena, J. Zeman, V. Saudek, C.S. Raman, P. Martásek, „A new mutation within the porphobilinogen deaminase gene leading to a truncated protein as a cause of acute intermittent porphyria in an extended Indian family.", *Folia Biol. (Praha)*, roč. 53, č. 6, s. 194–201, 2007.

- [86] M. N. Badminton a G. H. Elder, „Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, roč. 28, č. 3, s. 277–286, kvě. 2005.