

ANALIZE URINA KOD PORFIRINURIJA I PORFIRIJA

D. DJURIĆ

*Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti,
Zagreb*

(Primljeno 5. IX. 1956.)

Nakon definicije porfirinurija i porfirija navodi se klasifikacija porfirija prema *Watsonu* (tablica 1) uz najznačajnije simptome i laboratorijske nalaze. Na osnovu *Rimingtonove* hipoteze o enzimskim blokovima iznosi se uzrok pojedinih porfirija i porfirinurija. Dalje se diskutira nalaz u urinu kod porfirinurija i porfirija: karakteristična boja urina kod porfirija, dokazivanje porfobilinogena i pojedinih porfirina. Autor navodi detaljna uputstva za određivanje koproporfirina, cjelokupnih uroporfirina (I i III), uroporfirina III i indirektno određivanje uroporfirina I. Navodi kod svakog slučaja dvije metode: spektrofotometrijsko i fluorometrijsko određivanje, iznoseći svoja iskustva na osnovu uporednog određivanja koproporfirina (tablica 2), cjelokupnih uroporfirina (tablica 3) i uroporfirina III (tablica 4). Određivanja uroporfirina su vršena u dva slučaja *porphyria cutanea tarda*, dok se iskustva kod porfirinurija baziraju uglavnom na mnogobrojnim slučajevima otrovanja olovom.

Porfirini se izlučuju u urinu i fecesu svakoga zdravog čovjeka. U urinu zdravih ljudi se izlučuje oko 200 μg , a u fecesu do 1000 μg na dan. Gotovo sav taj porfirin se izlučuje u urinu u obliku izomera koproporfirina I i III, od kojih prevladava izomer III (1). Osim toga izlučuje se u urinu do 30 μg uroporfirina na dan (2) uz vrlo male količine porfirina sa 4–8 karboksilnih grupa. Porfirin u urinu je najvećim dijelom endogenog porijekla. U normalnom organizmu te kod nekih patoloških stanja dio porfirina se izlučuje u obliku nefluorescentnih prethodnika.

Porfirinurije i porfirije

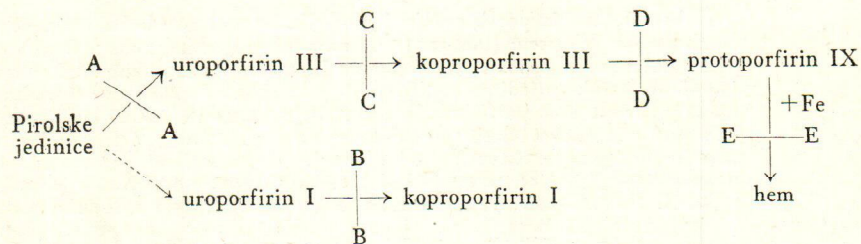
Izlučivanje pojedinih izomera porfirina, ili prethodnika porfirina, povišeno je kod čitavog niza patoloških stanja, koja nazivamo porfirinurije i porfirije. Treba oštro razlikovati porfirije od porfirinurija. Porfirinurije su sekundarni simptom i predstavljaju povišeno izlučivanje porfirina (koproporfirin I i III) u urinu, pa im otuda i naziv. To povišeno izlučivanje koproporfirina u urinu posljedica je obo-

ljenja ili oštećenja nekog organa ili sistema organa. Čitav niz oboljenja i otrovanja popraćen je porfirinurijom, koja se najčešće javlja kod bolesti s povišenom temperaturom, bolesti jetre i žuči, različitih oboljenja hemopoetskog aparata, hipovitaminoze, endokrinih oboljenja, otrovanja metalima (olovo, živa, mangan, arsen), otrovanja mnogim kemikalijama, otapalima, lijekovima (sulfonamidi, barbiturati).

Porfirije predstavljaju malu grupu mnogo rjeđih oboljenja karakteriziranih povišenim izlučivanjem uroporfirina I i III, uz eventualno povišenje koproporfirina i porfobilinogena u urinu. Povišeno izlučivanje porfirina u tim slučajevima nije sekundaran simptom, već vrlo značajna primarna pojava. Porfirije su, naime, bolesti, kod kojih je poremećen baš metabolizam porfirina. Te bolesti su većinom nasljedne ili postoji predispozicija nasljednog karaktera.

U toku vremena stvoreno je nekoliko klasifikacija porfirija. Na tablici 1 prikazana je *Watsonova* klasifikacija, kako je citira *Schwartz* (3), a nadopunjena je podacima iz literature (3, 4, 5, 6, 7). *Watsonova* se klasifikacija osniva na etiologiji, pregledna je i jednostavna. Ostale klasifikacije osnivaju se na kliničkim simptomima, pa kliničarima više odgovaraju nego ova pojednostavljena.

Etiologija porfirija nije sasvim razjašnjena. Za princip nastajanja poremećaja metabolizma porfirina *Rimington* pruža iduću hipotezu (4) prikazanu na sl. 1.



Slika 1. - Shema *Rimingtonove* hipoteze o nastajanju poremećaja sinteze porfirina kod porfirinurija i porfirija

Ta shema prikazuje mehanizam biosinteze porfirina u organizmu, koju kontrolira niz vrlo kompliciranih enzimskih sistema. Enzimski sistemi favoriziraju sintezu izomera tipa III potrebnih za stvaranje hema, odnosno hemoglobina. *Rimington* pretpostavlja, da u enzimskim sistemima, koje kontrolira jedan ili više gena, može doći do insuficijencije. Pojava ovih enzimskih blokova dovodi do povišenog izlučivanja jednoga ili više porfirina, odnosno pojedinog izomera. Tako nastaje porfirija. I kod mnogih oboljenja i otrovanja može nastati takav blok, koji dovodi do porfirinurije.

Na shemi je prikazano nekoliko mogućnosti. Enzimski blok A-A uz slabi blok B-B dovodi do povišenog izlučivanja porfirina tipa I, koji su normalno popratni produkti pri sintezi korisnih porfirina tipa III. Tako se može protumačiti povišenje izlučivanja porfirina tipa I kod eritropoetske (kongenitalne) porfirije. Čini se, da je u tom slučaju defektan enzimski sistem u eritrocitima u toku njihova sazrijevanja.

Blok C-C dovodi do povećanog izlučivanja uroporfirina III, a blok D-D do izlučivanja koproporfirina III (rijetki slučajevi koproporfirije). Kod hepatičkih porfirija neke činjenice ukazuju na to, da su genetički poremećaji ili kemijski agensi (otrovanja) uzrok patološkog metabolizma porfirina u jetri. *Porphyria cutanea tarda* često je povezana s hepatičkim insuficijencijama, alkoholizmom, dijabetesom i sifilisom. Blok E-E, čini se, da je odgovoran za porfirinuriju kod otrovanja olovom,

Tablica 1.

Klasifikacija i najznačajniji podaci o porfirijama

	Eritropoetska porfirinija	Hepatička porfirinija	
		Akutna intermitentna	Cutanea tarda
sinonimi	kongenitalna, fotosenzibilna	akutna toksična, idiopatska	kronična
učestalost	2-4 ^o /o	60-70 ^o /o	30-40 ^o /o
pojavljivanje	u djetinstvu, 75% muškarci	između 20-40 god., 60% žene	nakon 20 g., češće kod muškaraca
nasljednost	recesivno Mendelovog karakt.	dominantnim Mendelovim genom	nije utvrđen nasljedni faktor već osjetljivost na neke supstancije
klinički nalazi	fotosenzibilnost, splenomegalija i hemolitička anemija, eritrodontia, hipertrihoza	abdominalne kolike, pareze, paralize, psihički poremećaji, hipertenzija, oligurija, konstipacije	fotosenzibilnost, pigmentacija kože, hepatičke distinkcije
nalazi se u urinu	boja	crvena	crvena
	porfirini i prethodnici ...	uroporfirin I koproporfirin I	uroporfirin I uroporfirin III koproporfirin I koproporfirin III
porfirini u koštanoj srži	značajno povišeni	normalni	značajno povišeni
porfirini u jetri ...	slabo povišeni	znatno povišeni, vjerojatno u obliku prethodnika	značajno povišeni
terapija	zaštita od sunca, davati ekstrakt jetre i askorbinsku kiselinu, splenektomija	simptomatska	visoko proteinska dijeta, vitamin B ₁₂ , apstinencija od alkohola i barbiturata

Analize urina

U Odjelu za higijenu rada Instituta za medicinska istraživanja vrši se već godinama kvantitativno određivanje koproporfirina u urinu u slučajevima porfirinurija. Gotovo svi mnogobrojni slučajevi porfirinurija bili su posljedica otrovanja olovom (8, 9).

U toku 1955. i 1956. god. imao sam prilike da vršim analize porfirina u dva slučaja *porphyria cutanea tarda*, koji će biti detaljno opisani na drugom mjestu. Kako se iz tablice 1 vidi, u slučaju te porfirije i kod akutne intermitentne porfirije, u urinu se izlučuju svi porfirini, a katkada i porfobilinogen. Na osnovu stečenog iskustva htio bih ovdje iznijeti metode za određivanje porfirina u urinu te kritički ocijeniti vrijednost upotrebljenih metoda.

Boja urina. U slučajevima porfirinurija urin nema neku posebnu, karakterističnu boju. Kod porfirija urin je najčešće karakteristične crvene boje, koju nazivaju »boja porto vina«. Dokazano je, da ta boja samo djelomično potječe od velikih količina uroporfirina. Ekstrakcijom uroporfirina iz urina ta se boja malo mijenja. U urinu su otkriveni mnogi pigmenti (6), koji su različito nazvani: uroeritrin, urosein, skatol-crvena, nefrosein, urocin i t. d. *Waldenström* i *Vahlquist* (10) smatraju, da boja urina većim dijelom potječe od porfobilina, ali i drugi pigmenti utječu na boju urina, naročito pigmenti slični indolu, nazvani »rosein«. Priroda roseina nije dovoljno proučena, pa je moguće, da se pod tim nazivom krije niz nestabilnih spojeva, koji nisu među sobom u kemijskom odnosu.

Bez obzira na kemijski sastav tih boja činjenica je, da su mnoge porfirije otkrivene na osnovu karakteristične crvene boje urina. Prema tome, boja može biti putokaz, ali se dijagnoza postavlja tek na osnovu analize porfirina u urinu, kliničke slike i drugih podataka i pretraga.

Kod oba bolesnika, koji su bolovali od kutane porfirije, urin je gotovo uvijek imao karakterističnu crvenu boju. Rijetko (u slučajevima jake diureze) urin je bio normalne, žute boje. Osim toga je urin fluorescirao crveno, kad je bio izložen ultraljubičastom svjetlu. Kod mnogobrojnih slučajeva porfirinurija nisam nikad primijetio tako karakterističnu boju urina, niti je ikad urin fluorescirao. Ta fluorescencija je posljedica prisustva velike količine uroporfirina u urinu, pa je karakteristična samo za porfirije.

Dokazivanje porfobilinogena. Porfobilinogen se redovno nalazi u urinu kod slučajeva akutne intermitentne porfirije, dok se kod kutane porfirije javlja samo u nekim slučajevima, a i to povremeno. Već odavno je poznato, da urin bolesnika, koji boluju od akutne intermitentne porfirije, reagira pozitivno s *Ehrlichovim* reagensom, ali se to pripisivalo urobilinogenu. Tek je 1931. g. *Paula Sachs* (11) utvrdila na osnovu razlike u topljivosti te po nedostatku fluorescencije s cink-

oksidom, da se tu radi o nekoj drugoj supstanci. Ona je za nju predložila naziv pseudourobilinogen. Kasnije je prihvaćen naziv porfobilinogen. *Westall* je 1952. g. kristalizirao porfobilinogen (12), a uskoro je utvrđena i njegova struktura (13, 14); zatim je i kemijski sintetiziran (15). Na osnovu niza studija utvrđeno je, da je porfobilinogen neposredni prethodnih koproporfirina, odnosno uroporfirina, pa je točno utvrđeno i njegovo mjesto u biosintezi porfirina (14, 15, 16, 17, 18).

Kod navedena dva slučaja kutane porfirije svakog sam dana vršio određivanje porfobilinogena pomoću Ehrlichova aldehid-reagensa (0,8 g p-dimetilaminobenzaldhida, 150 ml konc. IICl, 100 ml destilirane vode) prema ovom propisu (5):

U epruvetu treba staviti 3 ml urina i dodati 3 ml Ehrlichova aldehid-reagensa i 6 ml zasićene otopine natrijeva acetata i promućkati. Ako se pojavi mrko-crvena boja, to znači, da je prisutan porfobilinogen ili urobilinogen, a eventualno i oba. Ako se doda 3 ml kloroforma i boje nestane, to ukazuje na prisustvo urobilinogena. Ako boja ostane, to znači da je prisutan porfobilinogen. Kod bolesnika, koje sam promatrao nikad nisam dobio pozitivan test ni na porfobilinogen ni na urobilinogen.

Određivanje koproporfirina. Kod porfirinurija su povišeni izomeri koproporfirina u urinu. Kod porfirija nalazimo velike količine uroporfirina u urinu uz povišene količine koproporfirina (tablica 1). *Dobriner* (19) je još 1936. g. opisao slučaj porfirije, kod koje je bio povišen samo koproporfirin (koproporfirija). I u novijoj literaturi (20) opisan je jedan slučaj hereditarne koproporfirije.

Određivanje koproporfirina vrši se u praksi na dva načina: fluorometrijski i spektrofotometrijski. U našem se laboratoriju fluorometrijsko određivanje (kvantitativno) koproporfirina u slučajevima porfirinurija vrši već nekoliko godina. Ekstrakcija koproporfirina iz urina vrši se prema *Fisherovoj* metodi, koju su modificirali *K. Weber* i *Ruždić* (21).

Bolesnik sakuplja 24 sata urin u tamnoj boci, koja se čuva na tamnom i hladnom mjestu. Pošto se izmjeri količina izlučenog urina i urin dobro promućka, stavi se u lijevak za odjeljivanje 100 ml urina, koji se zakiseli dodatkom 1 ml ledenog octa, zatim se doda 100 ml etera. Ekstrakcija se vrši mućkanjem oko 5 minuta. Vodena faza se otpusti, a eterski ekstrakt se 3 puta pere sa po 2 ml destilirane vode uz otpuštanje. Iz eterskog ekstrakta se konačno porfirini ekstrahiraju na taj način, da se dva puta mućka sa po 10 ml 10% sumporne kiseline, a zatim se ekstrakt kiselinom nadopuni na 25 ml. Fluorometrijsko određivanje se vrši u fluorometru (fluorometar po *K. Weberu*), koji je baždaren otopinama koproporfirina. Budući da je teško dobiti koproporfirin potreban za baždarenje. *Weber* i *Ualić* (22) su razradili metodu baždarenja pomoću otopine rhodamina B.

Fluorescencija sumporno kiselog ekstrakta pod bilo kakvim ultraljubičastim izvorom, koji emitira zrake valne dužine 3660 Å, može poslužiti za kvalitativan dokaz povišene količine koproporfirina u urinu. Uz malo vježbe može se na taj jednostavan način vršiti i približno, semikvantitativno određivanje koproporfirina u urinu, što je prikladno za masovne i sistematske preglede po tvornicama. Takav jednostavni test može otkriti povišenu ekspoziciju ili otrovanje olovom. Dakako da može poslužiti i za otkrivanje drugih porfirinurija.

Laboratoriji, koji nemaju fluorometra, mogu koproporfirine kvantitativno određivati spektrofotometrijskom metodom prema *Rimingtonu* i *Sveinssonu* (23), koju ovdje prenosim prema detaljnijim uputama *Askevolda* (24):

Pošto se izmjeri količina mokraće, odmjeri se 15 ml urina u lijevak za odjeljivanje, zakiseli sa 1 ml ledenog octa i ekstrahira sa 30 ml etera. Urin se otpusti, a eterski ekstrakt se pere 3 puta sa po 2 ml destilirane vode. Zatim se ekstrakcija vrši pet puta sa po 1 ml 0,1 N HCl. Ekstinkcija se mjeri spektrofotometrom (F) u našem slučaju Beckman DU pri 380 $m\mu$, 401 $m\mu$, 430 $m\mu$. Mjerenje se vrši u kivetama dužine 1 cm, uz najužu pukotinu, a kao otopina za upoređivanje se uzima 0,1 N HCl. Računanje se vrši prema novijim podacima (25), a prema formuli 1.

$$\frac{2 e^{401} - e^{380} + e^{430}}{1.835} = D \text{ corr. (1)}$$

Dijeljenjem D corr. sa 0,667 dobivaju se μg koproporfirina u 1 ml otopine u kiveti. Sad se preračunava količina na 1 ml urina iz odnosa: ekstrahirani urin-solnokiseli ekstrakt, a množenjem s količinom izlučenog urina dobiva se količina u urinu izlučenog koproporfirina u 24 sata.

U našem laboratoriju vrši se određivanje koproporfirina u urinu navedenom fluorometrijskom metodom. U najvećem broju slučajeva radilo se o koproporfirinuriji kod otrovanja olovom. Tu su zapažene različite vrijednosti, čak do 5800 μg koproporfirina u 24 sata. U dva slučaja kutane porfirije kretala se količina koproporfirina u urinu kod jednog bolesnika od 908 μg do 4341 μg , a kod drugog od 585 μg do 2000 μg dnevno.

Kod niza slučajeva, počevši od normalnih količina koproporfirina do znatno povišenih (porfirinurija kod otrovanja olovom) radio sam uporedo fluorometrijsku i spektrofotometrijsku metodu. Rezulate tih uporednih određivanja iznosim u tablici 2, izražene u mikrogramima koproporfirina na 100 ml urina. Kako se vidi, kod malih količina koproporfirina (normalni urini) spektrofotometrijska metoda daje više rezultate, a kod većih se količina viši rezultati dobivaju fluorometrijskom metodom. No razlike su tako minimalne, da u praksi metodu treba birati prema tehničkim mogućnostima (aparatura, reagensije).

Tim metodama se ne može odvojeno određivati izomer I ili III koproporfirina. Za tu se svrhu može primijeniti posebna metoda adsorpcije i eluiranja acetonom (26), a postoje i kromatografske metode. Na za praksu to odvajanje nije značajno. Budući da se dio koproporfirina izlučuje u obliku nefluorescentnih prethodnika, to za obuhvaćanje i ovog dijela koproporfirina preporučujem metodu *Schwartz*a, *Zieve*a i *Watson*a (27), koji oksidiraju nefluorescentne prethodnike pomoću otopine joda, pa onda fluorometrijski određuju cjelokupni koproporfirin. Ta metoda je dala dobre rezultate i u našem laboratoriju.

Određivanje uroporfirina. Već sam istakao činjenicu, da su uroporfirini netopljivi u eteru. Uroporfirin III se dobro ekstrahira s etilacetatom iz urina zakiseljenog na pH 3-3,2. Isprva se mislilo, da se uroporfirin I ne ekstrahira s etilacetatom, ali su novija istraživanja utvrdila djelomičnu ekstrakciju (28). Ipak, uroporfirin I se vrlo teško ekstrahira iz nativnog urina (29), pa se mora određivati indirektno. Najprije se posebnom metodom odredi cjelokupna količina uroporfirina (izomer I i III), zatim se posebnom metodom odredi količina izomera III, a iz razlike se izračuna količina izomera I. I ovdje postoje dvije mogućnosti: fluorometrijsko i spektrofotometrijsko određivanje. Iznijet ću najprije fluorometrijsku metodu.

Tablica 2.

Uporedne vrijednosti koproporfirina u urinu izražene u mikrogramima na 100 ml urina

Redni broj	Određivanje spektrofotometrijskom metodom	Određivanje fluorometrijskom metodom
1	27,4 ug	22,6 µg
2	27,8 "	23 "
3	28,5 "	25 "
4	33,3 "	30 "
5	55,1 "	57 "
6	86,4 "	93 "
7	93,2 "	101 "
8	112 "	127 "
9	111,5 "	120,3 "
10	184,5 "	198 "
11	264 "	278 "
12	360 "	382 "
13	392 "	415 "
14	363 "	384 "

Cjelokupni uroporfirini određuju se metodom adsorpcije, koju su razradili *Sveinson, Rimington i Barnes* (30). Prema *Abelinu* (29) na svaki mililitar urina, koji je uzet kao uzorak za analizu, treba dodati po 1 ml 3% otopine CaCl_2 , po 2 ml otopine 1 N NaOH te kap 5% otopine Na_2HPO_4 . Tako nastaje precipitat kalcijeva fosfata, koji adsorbira porfirine. Nakon centrifugiranja urin se odlije, precipitat se opere sa nekoliko ml 0,1 N NaOH, a potom sa nekoliko ml destilirane vode. Zatim se precipitat otopi u 0,5 N HCl, pH se pomoću zasićene otopine natrijeva acetata podesi na 3-3,2 pa se vrši ekstrakcija pomoću etilacetata u lijevku za odjeljivanje. Vodena faza se otpusti, ekstrakt se pere destiliranom vodom, pa se konačna ekstrakcija vrši sa 0,5 N HCl. Kvantitativno određivanje vrši se u fluorometru baždarenom na uroporfirine.

Uroporfirin III se određuje tako, da se urin zakiseli na pH 3-3,2, pa se u lijevku za odjeljivanje vrši ekstrakcija s etilacetatom (ekvivalentna količina). Vodena faza se otpusti, ekstrakt se pere, pa se konačna ekstrakcija vrši sa 0,5 N HCl. Kvantitativno određivanje se vrši u fluorometru.

Spektrofotometrijsko određivanje cjelokupnih uroporfirina vršio sam prema metodi *Rimington, Sveinsson* (23), koju ovdje prenosim prema detaljnijim uputstvima *Askelvolda* (24):

5 ml urina se zakiseli na pH 5-5,5 pomoću 5 ml acetat pufera (1 ml ledenog octa + 4 ml 1 M otopine natrijema aceata); pH treba provjeriti pomoću indikator papira. Od te smjese otpipetira se 2 ml (1 ml urina) u kivetu za centrifugiranje. Zatim se u nju redom dodaje: 2 kapi 5% otopine Na_2HPO_4 , 2 ml 3% otopine CaCl_2 i 2 ml 1 N otopine NaOH. Ta se otopina dobro promućka i centrifugira. Nastali precipitat adsorbira porifirine. Tekućina se odlije, a precipitat se pere s nekoliko ml 0,1 NaOH i destilirane vode. Nakon toga se precipitat otopi u 10 ml 0,5 N HCl. Ta otopina se stavlja u kivetu spektrofotometra (u našem slučaju Beckman DU) dužine 1 cm, pa se očitava ekstinkcija uz najužu pukotinu pri ovim valnim dužinama: 380 $m\mu$, maksimum između 403-407 $m\mu$ i 430 $m\mu$. Računa se prema formuli 2. Diobom D corr. sa 0,5 dobiva se suma uroporfirina u μg (I i III) na 1 ml otopine u kivetu.

$$\frac{2 e_{\max} - e^{380} + e^{430}}{1.844} = D \text{ corr. (2).}$$

Daljim preračunavanjem na 1 ml urina te množenjem sa ukupnom količinom izlučenog urina dobiva se količina uroporfirina na 24 sata.

Rimington i *Sveinsson* (23) upozoravaju, da se taj dugi postupak može izbjeći. Korekcijska formula je, naime, tako usavršena, da se suma uroporfirina može dobiti direktnim očitavanjem ekstinkcije razrijeđenog urina u spektrofotometru. Urin treba razrijediti u odnosu 1 : 5 ili 1 : 10 (što ovisi o koncentraciji uroporfirina u urinu), pa se ekstinkcije određuje prema navedenim uputama uz identičan račun. Kako bih to provjerio, vršio sam određivanje sume uroporfirina adsorpcijskom metodom uporedo s direktnim očitavanjem razrijeđenog urina. Na tablici 3 dajem uporedne rezultate izražene u mikrogramima u 24 sata. Kako se iz tablice vidi, razlike u rezultatima su tako minimalne, da se suma uroporfirina u urinu može pouzdano odrediti direktnim očitavanjem ekstinkcije razrijeđenog urina. Na taj se način može izbjeći dugotrajnija i mukotrpnija adsorpciona metoda. Kod porfirija, gdje se izlučuje po nekoliko miligrama pa i desetaka miligrama uroporfirina na dan, te male pogreške od nekoliko desetina pa i stotina mikrograma u praksi ne igraju ulogu.

Pri spektrofotometrijskom određivanju uroporfirina III (24) postupa se ovako: 15 ml urina se zakiseli na pH 3-3,2 i ekstrahira sa 30 ml etilacetata. Urin se otpusti, ekstrakt opere vodom, pa se konačna ekstrakcija vrši sa 15 ml 1 N HCl. Ekstinkcija se očitava na isti način kao naprijed, a računa se prema formuli 2.

Tablica 3.

Uporedno spektrofotometrijsko određivanje sume uroporfirina (I i III) izraženo u mikrogramima na 24 sata

Bolesnik Š. I.			Bolesnik K. B.		
Datum	adsorpcijska metoda	direktno očitavanje razrijeđenog urina	Datum	adsorpcijska metoda	direktno očitavanje razrijeđenog urina
12. I. 56	12000 μg	13150 μg	11. I. 56	6800 μg	6560 μg
13. I.	13650 "	12900 "	13. I.	12060 "	12100 "
25. I.	11290 "	11290 "	16. I.	6450 "	6870 "
14. II.	12460 "	12000 "	17. I.	9100 "	9140 "
15. II.	12700 "	11750 "	18. I.	8810 "	8650 "
17. II.	15400 "	15250 "	21. I.	9450 "	9360 "
18. II.	11090 "	11068 "	23. I.	10500 "	10780 "
22. II.	11910 "	11800 "	25. I.	9100 "	9340 "
24. II.	9700 "	9500 "	27. I.	8800 "	9060 "
25. II.	9370 "	9450 "	28. I.	11800 "	12100 "
27. II.	7460 "	7530 "	31. I.	11600 "	11800 "
29. II.	11850 "	12000 "	13. II.	11600 "	11520 "

Tablica 4.

Uporedna određivanja uroporfirina III (mikrogrami na 24 sata)

Bolesnik Š. I. datum	Određivanje spektrofotometrijskom metodom	Određivanje fluorometrijskom metodom
14. VII. 56	1970 μg	1470 μg
16. VII.	2060 "	1570 "
17. VII.	2070 "	1570 "
18. VII.	1250 "	1075 "
19. VII.	2480 "	1750 "
20. VII.	1990 "	1640 "
21. VII.	3660 "	2950 "
24. VII.	3110 "	2860 "
25. VII.	2410 "	1920 "
26. VII.	2300 "	1900 "
28. VII.	2820 "	2370 "

Vršio sam uporedo određivanja uroporfirina III spektrofotometrijskom i fluorometrijskom metodom. Kod fluorometrijske metode sam očitavanja vršio prema baždarnoj krivulji koproporfirina, jer nisam imao čistog uroporfirina III za baždarenje. Stoga je razumljivo, da sam očekivao veće razlike u rezultatima. No želio sam provjeriti, da li fluorometrijsko određivanje pomoću baždarne krivulje koproporfirina može

dati približne realne vrijednosti te tako bar orijentacijski poslužiti kliničarima za dijagnozu. Na tablici 4 sam prikazao te uporedne vrijednosti izražene u mikrogramima u 24 sata. Iz rezultata se vidi, da se fluorometrijskom metodom dobivaju prilično niži rezultati. Vjerojatno je to posljedica razlike u fluorescenciji između uroporfirina III i koproporfirina (koji je služio kao baždarna supstancija). Ipak fluorometrijsko određivanje provedeno na osnovu baždarne krivulje koproporfirina može dobro poslužiti za orijentaciju kliničarima, premda ne treba očekivati točne rezultate. Tek baždarnom krivuljom dobivenom pomoću uroporfirina III mogla bi se uporednim određivanjem ocijeniti vrijednost same fluorometrijske metode. Zato preporučujem spektrofotometrijsku metodu, ako to tehnički uvjeti dopuštaju.

Zaključak

Na kraju bih htio iznijeti postupak, koji se u našem laboratoriju primjenjuje u slučajevima analize urina na porfirinurije i porfirije. Kod slučajeva sumnjivih na porfirinuriju treba provesti preliminarno kvalitativno dokazivanje povišene količine koproporfirina u urinu. Nekoliko desetaka ml urina se zakiseli ledenim octom i ekstrahira istom količinom etera. Urin se otpusti, eterski ekstrakt opere i izvrši konačna ekstrakcija sa 10 ml 10% otopine sumporne kiseline. Ako taj ekstrakt pod ultraljubičastom svjetiljkom daje jasnu crvenu fluorescenciju, tada pristupamo kvantitativnom određivanju fluorometrijskom ili spektrofotometrijskom metodom.

U slučajevima sumnjivim na porfiriju crvena boja urina može pojačati sumnju. Ako nekoliko ml urina u epruveti pod ultraljubičastom svjetiljkom pokazuje slabu fluorescenciju, to treba smatrati kao dokaz, da je prisutan uroporfirin. Svakako treba urin testirati na porfobilinogen. No i u slučaju da su navedeni testovi negativni, treba provesti preliminarne testove na koproporfirin i uroporfirine s nekoliko desetina ml urina. Ako su oni pozitivni (crvena fluorescencija pod ultraljubičastim svjetlom), treba pristupiti kvantitativnom određivanju koproporfirina i uroporfirina, kako je naprijed navedeno. Pritom je najbolje prvo provesti određivanje koproporfirina, a otpušteni urin upotrebiti dalje za određivanje uroporfirina. Takav red je naročito važan kod fluorometrijskog određivanja, kako fluorescencija koproporfirina ne bi ometala određivanje uroporfirina. To, dakako, nije važno kod spektrofotometrijskog određivanja. Kod spektrofotometrijskog određivanja smjese uroporfirina (izomer I i III) može se dugotrajna adsorpcijska metoda zamijeniti pouzdanim spektrofotometrijskim razrijeđenog urina.

Za sve pretrage urin se sakuplja 24 sata u tamnoj boci na hladnom i tamnom mjestu.

Literatura

1. *Comfort, A., Moore, H., Weatherall, M.*: Biochem. J. 58 (1954) 177.
2. *Lockwood, W. H.*: Austral. J. Exp. Biol. Med. Sc. 31 (1953) 453.
3. *Schwartz, S.*: Vet. Adm. Techn. Bull. 10-94, Dec. 1953.
4. *Rimington, C.*: Acta Med. Scand. 143 (1952) 177.
5. *Sunderman, F. W. Jr., Sunderman, F. W.*: Am. J. Clin. Path. 25 (1955) 1231.
6. *Kark, M. R.*: Med. Clin. of North Am. 39 (1955) 11.
7. *Uanotti, A.*: Porphyrine und Porphyrinkrankheiten, Berlin, Springer 1937.
8. *Djurić, D.*: Medicinski pregled 9 (1956) 5.
9. *Weber, O. A., Ualić, F.*: Arh. hig. rada 4 (1953) 511.
10. *Waldenström, J.*: Studien über Porphyrie, Stockholm 1937.
11. *Sachs, P.*: Klin. Wschr. 10 (1931) 1123.
12. *Westall, R. G.*: Nature 170 (1952) 614.
13. *Cookson, G. H., Rimington, C.*: Nature 171 (1953) 875.
14. *Watson, C. J.*: Arch. Intern. Med. 93 (1954) 643.
15. *Prasad, K. S. N., Raper, R.*: Nature 175 (1955) 629.
16. *Falk, J. E., Dresel, E. J. B., Rimington, C.*: Nature 172 (1953) 292.
17. *Bogorad, L., Granick, S.*: Proc. Nat. Acad. Sc. 39 (1953) 1176.
18. *Cookson, G. H., Rimington, C.*: Biochem. J. 57 (1954) 476.
19. Dobriner cit. Berger i Goldberg (21).
20. *Berger, H., Goldberg, A.*: Brit. M. J. July 9 (1955) 85.
21. *Weber, K., Ruždić, I.*: Experientia 7 (1951) 354.
22. *Weber, K., Ualić, F.*: Rec. Trav. chim. (Amsterdam) 74 (1955) 556.
23. *Rimington, C., Sveinsson, S. L.*: Scand. J. Clin. & Lab. Investig. 2 (1950) 209.
24. *Askevold, R.*: Scand. J. Clin. & Lab. Investig. 3 (1951) 318.
25. *With., T. K.*: Scand. J. Clin. & Lab. Investig. 7 (1955) 193.
26. *Watson, C. J., Schwartz, S.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 44 (1940) 7.
27. *Schwartz, S., Zieve, L., Watson, C. J.*: J. Lab. & Clin. Med. 37 (1951) 843.
28. *Dresel, E. I. B., Tooth, B. E.*: Nature 174 (1954) 271.
29. *Abelin, I.*: Spezielle klinisch-chemische Methoden, H. Huber, Bern-Stuttgart 1952.
30. *Sveinsson, S. L., Rimington, C., Barnes, H. D.*: Scand. J. Clin. & Lab. Investig. 1 (1949) 2.

Summary

ANALYSIS OF URINE IN PORPHYRINURIA AND
PORPHYRIA

The definition of porphyrinuria and porphyria is given, as well as the classification of porphyria according to Watson. The causes of porphyria and porphyrinuria are presented on the basis of Rimington's hypothesis of enzymatic block. Most pronounced symptoms and laboratory findings are described, and the findings in urine, i. e. the characteristic colour of urine, porphobilinogen and other porphyrins are discussed more fully. Detailed instructions are given for the determination, both spectrophotometric and fluorometric, of coproporphyrin, total uroporphyrin (I and III), and uroporphyrin III, as well as of the indirect determination of uroporphyrin I. The results of comparative determination of coproporphyrin, total uroporphyrin and uroporphyrin III are also given. The determination of uroporphyrin have been carried out in two cases of *porphyria cutanea tarda*, while the experience concerning porphyrinuria is gained on the basis of the observation of numerous cases of lead poisoning.

*Institute for Medical Research,
Zagreb*

*Received for publication
September 5, 1956*