

Overzichten

Laboratoriumdiagnostiek bij porfyrieën: stoornissen in de heemsynthese

G. J. J. BEUKEVELD¹ en B. G. WOLTERS²

Klinisch-chemische laboratoria spelen een belangrijke rol bij het stellen van de diagnose porfyrie, een groep van erfelijke ziekten, die gepaard kunnen gaan met lichtgevoeligheid en/of levensbedreigende aanvallen van buikpijn, perifere neuropathie, psychosen, verlammingen en coma. De klachten van een porfyriepatiënt zijn niet altijd direct herkenbaar, doch in sommige gevallen moet snel en adequaat de diagnose worden gesteld om levensbedreigende situaties een halt toe te roepen bijvoorbeeld door heem-arginaat toe te dienen. Het benodigd materiaal voor porfyrienonderzoek is afhankelijk van het type porfyrie en het onderzoek varieert van het meten van porfyrienen en eventueel hun voorlopers in urine, tot het meten van porfyrienes in faeces, bloed of andere materialen, waaronder gal. In dit artikel dat een uitgebreide samenvatting is van het proefschrift met de titel "Clinical relevance of porphyrin determinations in porphyria" (8) zal dieper in worden gegaan op de voor- en nadelen van de verschillende methoden om porfyrienes aan te tonen en welk materiaal in geval van een vermeende porfyrie het best onderzocht kan worden. Aan deze beschrijving gaat een algemene inleiding van de heemsynthese en van primaire en secundaire porfyrieën vooraf.

Trefwoorden: Porfyrie; porfyrienes; porfyrine-precursors; heem; HPLC

Heemsynthese

Heem, een prosthatische groep in veel eiwitten, is betrokken bij een groot aantal biologische functies, zoals zuurstof- en elektronentransport, H₂O₂ (de-)generatie, verschillende oxydaties en de synthese van cyclisch guanosine monofosfaat en stikstofoxide (NO). Daarnaast is heem betrokken bij de regulatie van de eiwitsynthese en celdifferentiatie. Belangrijke heembevattende eiwitten zijn hemoglobine, myoglobine, cytochromen aa₃, b en c₃, cytochroom P450 oxydasen, peroxydasen, peroxyde synthase, catalase, tryptofaan pyrrolase, NO oxydase en indolamine dioxygenase

Laboratoria¹ van: APZ-Drenthe te Assen, Psychiatrisch Centrum Willibrord te Heiloo en Psychiatrisch Ziekenhuis Duin en Bosch te Castricum en Laboratoriumcentrum CMC-IV, Academisch Ziekenhuis Groningen².

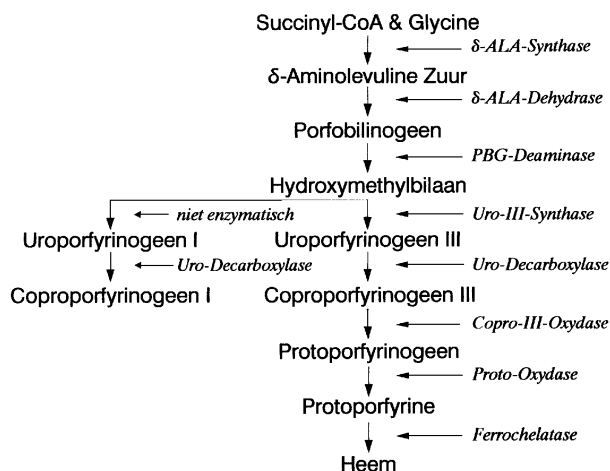
Correspondentie: Dr. B. G. Wolthers, Laboratorium CMC-IV, Academisch Ziekenhuis Groningen, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen.

Ingekomen: 03.10.96

(9-12). De cytochroom P450 oxydasen zijn enzymen, die onder anderen steroiden, galzure zouten, vetzuren, aminozuren, prostaglandinen, leukotriënen, biogene aminen, medicijnen, carcinogene- en mutagene stoffen en contaminanten uit het milieu oxydatief metaboliseren (13,14).

Heem wordt gevormd uit acht glycine en acht succinyl moleculen en acht enzymen nemen deel aan de synthese. De eerste en laatste drie zijn in de mitochondria gelokaliseerd, terwijl de tussenliggende enzymen in het cytoplasma aanwezig zijn. Het eerste enzym in de synthese van heem is delta-aminolevulinezuur synthase (EC 2.3.1.37) dat de condensatie van glycine en succinyl-coenzym-A katalyseert en delta-aminolevulinezuur oplevert. Dit product diffundeert naar het cytoplasma en gekatalyseerd door delta-aminolevulinezuur dehydrase (EC 4.2.1.24) condenserend twee delta-aminolevulinezuur moleculen tot de pyrrol porfobilinogeen onder uittreding van twee watermoleculen. De enzymen porfobilinogeen deaminase (EC 4.3.1.8) en uroporfyrinogeen-III synthase (EC 4.2.1.75) opereren tezamen om vier porfobilinogeen moleculen, via de lineaire tetrapyrrol hydroxymethylbilaan, te polymeriseren tot de cyclische tetrapyrrol uroporfyrinogeen III. In afwezigheid van uroporfyrinogeen-III synthase cycliseert hydroxymethylbilaan tot uroporfyrinogeen I. Het laatste cytosolisch enzym in de heemsynthese, het uroporfyrinogeen decarboxylase (EC 4.1.1.37), decarboxyleert successievelijk alle vier de acetaat zijgroepen van uroporfyrinogeen I en III om coproporfyrinogeen I en III op te leveren. Het zesde enzym, coproporfyrinogeen oxydase (EC 1.3.3.3), gelokaliseerd in de tussenruimte van de mitochondriële membranen, zet coproporfyrinogeen III en niet zijn I isomeer om in protoporfyrinogeen, waarbij de propionaat zijgroepen van de eerste twee pyrrolringen worden geoxydeerd en gedecarboxyleerd tot vinylgroepen. Protoporfyrinogeen diffundeert naar de matrix van de mitochondria, waar het door het enzym protoporfyrinogeen oxydase (EC 1.3.3.4) tot protoporfyrine wordt geoxydeerd door verwijdering van zes waterstofatomen. De laatste stap, chelatering van protoporfyrine met tweewaardig ijzer resulterend in de vorming van heem onder het vrijkomen van twee protonen, wordt gekatalyseerd door ferrochelatase (EC 4.99.1.1) (1). Een overzicht van de heemsynthese wordt in figuur 1 weergegeven.

Alle menselijke cellen maken heem, echter de twee belangrijkste bronnen zijn het beenmerg, dat 85% van het totaal produceert voor de aanmaak van hemoglo-



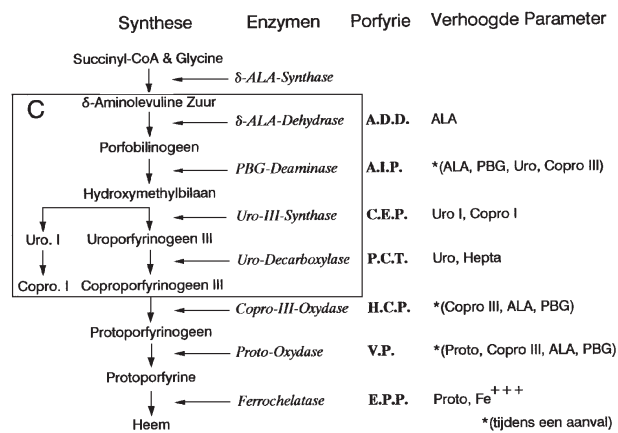
Figuur 1. Overzicht van de heemsynthese met de enzymen die er achtereenvolgend aan deelnemen. δ -ALA-synthase: δ -aminolevulinezuur synthase, δ -ALA-Dehydrase: δ -aminolevulinezuur dehydrase, PBG-Deaminase: porfobilinogeen-deaminase, Uro-III-Synthase: uroporphyrinogeen-III-synthase, Uro-Decarboxylase: uroporphyrinogeen decarboxylase, Copro-III-Oxydase: coproporphyrinogeen-III-oxydase, Proto-Oxydase: protoporphyrinogeen oxydase. Uroporphyrinogeen I wordt niet enzymatisch uit hydroxymethylbilaan gevormd.

bine, en de lever die ongeveer de rest maakt, hoofdzakelijk voor de cytochroom P450 oxydases, betrokken bij de hydroxylering en ontgiftiging van lipofiele endogene en exogene stoffen. De concentratie cytochroom P450 oxydases varieert gedurende de levenscyclus van de cel en is induceerbaar in te stellen naar gelang de concentratie van de te oxyderen stoffen. Vanwege hun specifieke vraag naar heem regelen beenmerg en levercel de heemsynthese op verschillende manieren. Hierbij speelt vrij heem een cruciale rol (9-14).

Porfyrieën

Porfyrieën zijn erfelijke of verkregen aandoeningen in de synthese van heem, waarbij één van de enzymen (partieel) deficiënt is. De resterende enzymactiviteit, in de regel ongeveer 50% van normaal, komt overeen met de heterozygote status van de betrokkenen. In de meeste gevallen is deze enzymactiviteit voldoende voor een normale heemproductie. In de praktijk komt het er op neer dat meer dan 90% van de betrokken individuen nooit klachten en problemen van een gestoorde heemsynthese ondervindt. Echter alle betrokkenen staan bloot aan levensbedreigende aanvallen, die o.a. uitgelokt kunnen worden door porfyrinogene medicijnen, vomeren, hongeren, stress, alcohol en infecties (15-17). Daarnaast zijn zeldzame homozygote vormen van porfyrieën bekend, die permanent tot problemen leiden (1). Vanwege hun zeldzaamheid worden deze porfyrieën summier besproken.

Biochemisch zijn op basis van enzymdefecten zeven porfyrieën te onderscheiden. Deze defecten kunnen aanleiding geven tot ophoping van specifieke tussenproducten in de heemsynthese, waardoor zij van elkaar te onderscheiden zijn. In figuur 2 wordt een overzicht gegeven van de porfyrieën en defecte enzymen in de volgorde waarin zij in de synthesesroute



Figuur 2. Overzicht van de heemsynthese, de betrokken enzymen, de corresponderende porfyrieën wanneer partiële enzymactiviteit aanwezig is en de parameters, die verhoogd bij een porfyrie(aanval) kunnen worden gevonden. Voor verklaringen van de afkortingen in de heemsynthese zie figuur 1. A.D.D.: δ -aminolevulinezuur dehydrase deficiëntie porfyrie; A.I.P.: acute intermitterende porfyrie; C.E.P.: congenitale erythropoietische porfyrie; P.C.T.: porfyrie cutanea tarda; H.C.P.: hereditaire coproporfyrie; V.P.: variegate porfyrie en E.P.P.: erythropoietische protoporfyrie; ALA: δ -aminolevulinezuur; PBG: porfobilinogeen; uro: uroporphyrine; copro: coproporphyrine; proto: protoporphyrine; C: cytosolcompartiment.

voorkomen. In deze volgorde zijn de volgende porfyrieën te onderscheiden: delta-aminolevulinezuur dehydrase deficiëntie, acute intermitterende porfyrie, congenitale erythropoietische porfyrie, porfyria cutanea tarda, hereditaire coproporfyrie, variegate porfyrie en erythropoietische protoporfyrie.

Medisch kunnen de porfyrieën worden onderscheiden op basis van de klinische verschijnselen van cutane lichtgevoeligheid en acute aanvallen. De twee belangrijkste cutane (chronische) porfyrieën zijn porfyria cutanea tarda en erythropoietische protoporfyrie met overproductie van resp. uro- en protoporphyrine. Beide porfyrieën vertonen typische huidafwijkingen die terug te voeren zijn op het grote verschil in hydrofobiciteit van uro- en protoporphyrine.

Acute porfyrieën zijn delta-aminolevulinezuur dehydrase deficiëntie, acute intermitterende porfyrie, hereditaire coproporfyrie en variegate porfyrie. De laatste twee kunnen zich ook als cutane porfyrieën manifesteren. Acute klachten bestaan uit buikpijn, obstipatie, perifere neuropathie, psychoses, tachycardie, verlammingen en coma, vaak ernstig en levensbedreigend. Aanvallen van acute porfyrieën zijn klinisch niet van elkaar te onderscheiden. Met behulp van biochemische parameters in urine, faeces en gal kan tussen deze porfyrieën worden gedifferentieerd. Ernstige aanvallen van acute porfyrieën kunnen met succes worden behandeld met behulp van heemmarginatiefusen (4).

De diagnose porfyrie volgt uit een gecombineerde observatie met respect tot het klinisch beeld én de resultaten vanuit het laboratorium of alleen vanuit laboratoriumonderzoek (1-3,5-8,18-23).

In klinische gevallen waar de patiënt wordt verdacht van manifeste porfyrie is het belangrijk om te weten

of de patiënt symptomen van acute porfyrie, een geschiedenis van huidklachten, of een belaste familie-anamnese heeft, naast de leeftijd waarop voor het eerst de symptomen zijn waargenomen.

Lijden patiënten aan een aanval van acute porfyrie, dan is het bepalen van porfyrienen in urine de eerst logische stap om de diagnose te ondersteunen. Een cruciale volgende stap is het bepalen van delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen in urine met behulp van kolomchromatografie als voorzuiveringsstap.

In gevallen van een manifeste porfyrie moeten alle drie de parameters duidelijk verhoogd zijn. Hun onderlinge verhogingen en het porfyrienenpatroon geven enige informatie omtrent de ernst van het klinisch beeld en het type porfyrie. Een daarop volgende bepaling van porfyrienen in faeces differentieert tussen acute intermitterende porfyrie (faeces normaal), hereditaire coproporfyrie (coproporfyrene III sterk verhoogd) en variegate porfyrie (coproporfyrene III en protoporfyrene sterk verhoogd).

Zijn echter alle urine parameters normaal in de aanwezigheid van tekenen en symptomen, die een aanval van acute porfyrie suggereren, dan lijdt de patiënt niet aan een porfyrie.

Is alleen delta-aminolevulinezuur verhoogd dan moet aan loodvergiftiging of aan hereditaire tyrosinemie type I worden gedacht. In zeer zeldzame gevallen kan er ook sprake zijn van delta-aminolevulinezuur dehydrase deficiëntie.

Soms worden tijdens een remissiefase van een acute porfyrie alleen verhoogde porfobilinogeen en porfyrienenconcentraties in urine gevonden.

In gevallen waarbij porfyrienen in urine net boven normaal zijn, of de ratio coproporfyrene I/coproporfyrene I+III is toegenomen, dan moet een secundaire porfyrie niet worden uitgesloten.

Omdat met behulp van porfyrienen in urine en faeces de meeste latente gevallen niet met zekerheid kunnen worden aangetoond, hebben wij voor variegate porfyrie bewezen dat met behulp van de porfyrienenratio in gal, verkregen met de Enterotest (zie verderop) na kunstmatige galblaasstimulatie, de diagnose latente porfyrie wel kan worden gesteld (23).

Heeft de patiënt een geschiedenis van huidafwijkingen, zoals jeuk, chronische ulcusvorming en/of erytheem typisch voor erytropoietische protoporfyrie, of blaren, oedeem, pigmentatie, hypertrichosis en milia typisch voor congenitale porfyrie, porfyria cutanea tarda, hereditaire coproporfyrie of variegate porfyrie dan worden porfyrienenonderzoek in faeces, urine of bloed aanbevolen.

Een kenmerk voor erytropoietische protoporfyrie is de sterk verhoogde protoporfyrene concentratie in volbloed, meestal in samenhang met een vroege presentatie van de huidklachten. In faeces moeten verhoogde concentraties aan porfyrienen met dicarboxylgroepen worden gevonden (5,6). De porfyrienen en hun voorlopers in urine zijn en blijven normaal, totdat er sprake is van ernstig leverfalen tengevolge van protoporfyri-nestapeling in de lever. In dat geval stijgt de coproporfyrene I concentratie in urine het meest tengevolge van een verandering in de excretieroute.

Porfyria cutanea tarda kan gemakkelijk worden aangetoond op basis van verhoogde uro- en heptaporfyrienen in urine, meestal in samenhang met precipiterende factoren zoals alcoholgebruik, ijzerstapeling in de lever, virale infectie, of het gebruik van porfyri-nogene stoffen en anticonceptie pillen. Dezelfde porfyrienen zijn ook verhoogd in faeces aantoonbaar naast soms porfyrienen met vier carboxylgroepen (coproporfyrene isomeren en metabolieten) (5). Porphobilinogeen en delta aminolevulinezuur in urine zijn en blijven in alle gevallen van een porfyria cutanea tarda normaal.

Tussen hereditaire coproporfyrie en variegate porfyrie kan worden gedifferentieerd door het resp. vinden van enkel verhoogde coproporfyrene III versus verhoogde coproporfyrene III en protoporfyrene concentraties in faeces na eerst verhoogde coproporfyrene III concentraties in urine te hebben gevonden. Tijdens een aanval kunnen in urine verhoogde concentraties delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen worden aangetoond.

Congenitale erytropoietische porfyrie is een zeldzame porfyrie die wordt gediagnostiseerd door het klinisch beeld en het vinden van verhoogde concentraties porfyrienen van het type I isomeer in urine.

Klinische, biochemische en moleculaire aspecten van porfyrieën

Delta-aminolevulinezuur dehydrase deficiëntie porfyrie wordt autosomaal dominant overgeërfd en is gekarakteriseerd door een ernstige deficiëntie van het enzym delta-aminolevulinezuur dehydrase, hetgeen aanleiding geeft tot ophoping van delta-aminolevulinezuur in de urine. Tijdens aanvallen worden ook verhoogde concentraties aan coproporfyrienen in urine en protoporfyrene in bloed gevonden. De symptomen zijn neurologisch van aard zonder lichtgevoeligheid van de huid. Tot op heden zijn wereldwijd vijf gevallen met deze porfyrie beschreven (24-26).

Humaan delta-aminolevulinezuur dehydrogenase wordt gecodeerd door één gen dat is gelokaliseerd op chromosoom 9 in de q34 regio (27). Het gen bevat twee alternatieve niet coderende exonen, 1A en 1B en 11 coderende exonen. Het normale transcript bevat exon 1A, terwijl het transcript in de erythrocyt exon 1B bevat. De translatie begint in het tweede exon, waardoor beide transcripten dezelfde volgorde van 330 aminozuren opleveren. Mutaties in het gen coderend voor het enzym zijn geïdentificeerd.

Acute intermitterende porfyrie is een autosomaal dominante ziekte, die wordt veroorzaakt door een deficiëntie van het enzym porfobilinogeen deaminase. Slecht ongeveer 10% van de mensen, die dit enzymdefect erven, heeft last van porfyrie-aanvallen en heeft verhoogde concentraties van porfyrienen en hun voorlopers in urine, vooral tijdens en vlak na een aanval. Deze aanvallen worden meestal uitgelokt door endogene en exogene factoren zoals steroïd hormonen en medicijnen en worden gekarakteriseerd door hevige aanvallen van buikpijn en neurologische symptomen zonder lichtgevoeligheid van de huid. Acute intermitterende porfyrie is voor de puberteit

bijna altijd latent aanwezig, alhoewel meerdere gevallen van aanvallen in jonge kinderen zijn beschreven (28,29).

De biochemische diagnose van asymptomatische heterozygoten, die meestal normale concentraties aan porfyrienen en hun voorlopers in urine hebben, is moeilijk, zelfs wanneer deze gebaseerd is op het meten van de enzymactiviteit van porfobilinogeen deaminase in volbloed (30-32). Dit is hoofdzakelijk te wijten aan de grote overlap tussen hoge enzymactiviteiten bij sommige heterozygoten en lagere bij gezonde personen, aan de leeftijd en ontwikkelingsgraad van de rode bloedcellen en aan het voorkomen van zeldzame gevallen met normale enzymactiviteiten in de erythrocyten en afwijkende activiteiten in alle andere cellen. Daardoor zijn metingen van de enzymactiviteiten onbetrouwbaar bij personen met hoge reticulocyten en in pasgeborenen. Met het oog op deze moeilijkheden is de diagnose acute intermitterende porfyrie in personen zonder duidelijke symptomen alleen betrouwbaar te stellen met behulp van DNA onderzoek (33).

Het 10 kbasen grote gen, dat codeert voor porfobilinogeen deaminase, bezit 15 exonen variërend in grootte van 39 tot 438 basen en 14 intronen met lengten van 87 tot 2939 basen (34). Alle intron/exon overgangen voldoen aan de GT/AG consensus. Het 5' gebied met meerdere mogelijke regulatie-elementen voor de normale promotor leidt tot een transcript, waarbij exon 2 wordt overgeslagen. Intron 1, dat de specifieke erytrocyt-promoter bevat, heeft verschillende regulatie-elementen voor transcriptie van exon 2 tot 15. Mutaties aan het 3' terminale eind van exon 1 en het 5' begin van intron 1 leiden tot deficiënties van het normale enzym, terwijl het enzym in de erytrocyt niet deficiënt is (35). Op dit moment zijn er meer dan 100 verschillende mutaties van het gen beschreven, die allemaal een aanval van acute intermitterende porfyrie kunnen veroorzaken. In 1990 hebben wij in samenwerking met een Frans laboratorium de eerste casus van een dubbele heterozygote acute intermitterende porfyrie beschreven (36,37). Korte tijd later kwamen Llewellyn en medewerkers met een broer en zus die ook heterozygoot waren voor twee mutaties in exon 10 (38). Daarna hebben Solis en medewerkers een Spaans jongetje gevonden met wederom twee mutaties in exon 10 (39). Intrigerend is dat de vier casussen allen dezelfde mutatie op plaats 500 van het gen bezitten.

Congenitale erythropoïetische porfyrie, overgedragen als een autosomaal recessieve aandoening, ontstaat door deficiëntie van het enzym uroporfyrinogeen III cosynthase. Deze porfyrie is gekarakteriseerd door de aanwezigheid van hoge concentraties I isomeren in de urine, vooral van uroporfyrine I, die de ernstige lichtgevoeligheid veroorzaakt, resulterend in blaren, erosie, hirsutisme, pigmentatieveranderingen en fotomutilatie (40-42). Milde hemolyse, anemie en splenomegalie zijn meestal aanwezig naast ernstige disformatie van de botten. Tot op dit moment is voor deze ziekte geen goede therapie voorhanden. Orale toediening van actieve kool of cholestyramine om de

vermeende enterohepatische circulatie van porfyrienen te onderbreken heeft niet tot bevredigende resultaten geleid (43-46). Wij hebben aangetoond dat een enterohepatische circulatie van porfyrienen niet waarschijnlijk of verwaarloosbaar klein is en dat het cholestyramine effect, bestaande uit een verlaging van porfyrienen in bloed tijdens behandeling, berust op het Herbst-Volkheimer effect (zie verderop) (47). In de nabije toekomst wordt met behulp van gentherapie getracht de meeste ernstige vormen te kunnen behandelen (48).

Het gen dat codeert voor uroporfyrinogeen cosynthase is gelokaliseerd op chromosoom 10 in de regio q25.3-q26.3. Verschillende mutaties als wel partiële gendeleties en mRNA processingsproblematieken zijn geïdentificeerd, die tot milde en ernstige vormen van deze porfyrie hebben geleid (49-53).

Porfyria cutanea tarda komt tenminste in drie verschillende varianten voor (54-56). Deficiëntie van hepatisch uroporfyrinogeen decarboxylase, die gewoonlijk op volwassen leeftijd manifest wordt met blaren en verhoogde kwetsbaarheid van de aan zonlicht blootgestane huid, blijkt in alle drie de vormen aanwezig te zijn. Een aantal patiënten heeft een erfelijke variant, waarbij het defect alleen in de lever is gelokaliseerd. In een andere groep wordt de ziekte op een autosomaal dominante manier doorgegeven en is het enzymdefect in alle cellen aanwezig. Een derde groep lijdt aan de toxische variant, waarbij een exogene verbinding de ziekte veroorzaakt door het enzym uroporfyrinogeen decarboxylase te remmen. Leverziekten variërend van chronische hepatitis en cirrose tot hepatomen zijn vaak aanwezig. Ook verschijnen de laatste tijd meer en meer rapporten, waarbij porfyria cutanea tarda wordt beschreven bij patiënten, die met HIV-besmet zijn en al dan niet reeds AIDS-verschijnselen vertonen (136,137,138).

Alcohol, oestrogenen en stapeling van ijzer in de levercel zijn factoren die de ziekte verergeren. Porfyria cutanea tarda kan met succes worden behandeld door het vermijden van alcohol en oestrogenen en door frequent aderlaten om ijzerstapeling in de lever te reduceren.

Biochemisch wordt de ziekte gekarakteriseerd door verhoogde concentraties aan uro- en heptaporfyrienen in urine.

Het gen dat codeert voor uroporfyrinogeen decarboxylase is 3 kb lang, bevat 10 exonen en levert één polypeptide van 367 aminozuren op. Verschillende puntmutaties in de coderende regio's, inclusief een homozygote vorm, zijn gevonden, naast een splice-mutatie, waarbij exon 6 wordt overgeslagen (57-62). Deze mutatie levert een 54 aminozuren kortere polypeptide op zonder enzymactiviteit.

Hereditaire coproporfyrie vertoont dezelfde maar meestal mildere symptomen als acute intermitterende porfyrie (63-68). Tijdens een acute aanval komen meestal ook huidklachten voor. Het onderhavige genetisch defect is het autosomaal dominant erven van 50% deficiëntie van coproporfyrinogeen oxydase activiteit, die tijdens een aanval kan leiden tot over-

productie van coproporfyriogeen III, delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen.

Het humane coproporfyriogeen oxydase gen, aanwezig als een enkelvoudig gen, heeft een spanwijdte van 14 kbasen en bestaat uit 7 exonen. De zes intronen variëren in grootte van 269 tot 5 kbasen en hebben allemaal de intron/exon consensus aan hun uiteinden. Overslaan van exon 6, veroorzaakt door een G naar A mutaties op het laatste stuk van exon 6, geeft aanleiding tot manifeste coproporfyrie (68). Een andere puntmutatie, leidend tot substitutie van aminozuren, is bij een homozygote vorm van coproporfyrie gevonden (66).

Variegate porfyrie bezit dezelfde symptomen, als die bij acute intermitterende porfyrie worden gezien, met als extra de lichtovergevoeligheid (69-71). Ongeveer de helft van de mensen met variegate porfyrie hebben last van deze lichtovergevoeligheid die zich onafhankelijk van de aanvallen manifesteert. Protoporfyriogeen oxydase is het betrokken enzym hetgeen bij deficiëntie resulteert in verhoogde protoporfyriene concentraties in gal (24,72). Tijdens aanvallen kunnen verhoogde concentraties coproporfyrienen III, delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen in urine worden gevonden. Tussen aanvallen in zijn deze concentraties normaal. In serum is een porfyrieneiwitcomplex gevonden dat karakteristiek is voor de variegate porfyrie (73). De cDNA volgorde van het humaan protoporfyriogeen oxydase is vrij recent geanalyseerd, zodat in de nabije toekomst meerdere mutaties te verwachten zijn (74).

Erythropoietische protoporfyrie is een autosomaal dominante ziekte, die wordt veroorzaakt door deficiëntie van ferrochelatase, het laatste enzym in de heemsynthese. Het belangrijkste symptoom van erythropoietische protoporfyrie is de milde tot ernstige overgevoeligheid voor paars licht, die zich meestal op jeugdige leeftijd manifesteert en vervolgens het gehele sociale leven van de patiënt beïnvloedt. De ziekte gaat niet gepaard met neurologische afwijkingen. Biochemisch resulteert het enzymdefect in hoge stapeling van protoporfyriene in erythrocyten, faeces, lever en de huid. Omdat protoporfyriene praktisch onoplosbaar in water is, vindt zijn uitscheiding uit het lichaam uitsluitend plaats via de lever, gal en faeces. In dit proces speelt de lipidenuitscheiding in de canaliculus een zeer belangrijke rol (75). Wanneer de protoporfyriene synthese groter is dan zijn uitscheiding, leidt dit tot tijdelijke of permanente stapeling in de lever. Bij langdurige stapeling kan dit aanleiding geven tot leverbeschadiging of zelfs volledig leverfalen (76-80). Het voorkomen van protoporfyriestapeling in de lever is van cruciaal belang en kan eventueel fataal leverfalen uitstellen.

Het gen dat codeert voor het humaan ferrochelatase heeft een minimum lengte van 45 kbasen en bevat 11 exonen (81). De exon/intron overgangen zijn conform de GT/AG regels en de exonen coderen voor één eiwit zowel in erythroïde als niet-erythroïde cellen. Verschillende mutaties, inclusief een die gepaard is gegaan met fataal leverfalen, zijn beschreven (82).

Een recent beschreven pseudo-gen voor ferrochelatase, niet leidend tot de productie van een eiwit met enzymactiviteit maakt het screenen van mutaties voor ferrochelatase extra gecompliceerd (83). Het intacte gen is in meerdere bacteriën en virussen geïmplementeerd om grote hoeveelheden enzym voor onderzoek in handen te krijgen. Daarnaast zijn ver gevorderde proeven beschreven voor gentherapie (48,84,85).

Secundaire porfyrieën

Verhoogde concentraties tussenproducten van de heemsynthese kunnen naast de primaire erfelijke porfyrieën nog bij een groot aantal andere klinische condities voorkomen (86-89). Het is dan ook klinisch en therapeutisch van groot belang te differentiëren tussen primaire en secundaire porfyrieën. Secundaire porfyrieën worden gekarakteriseerd door het feit dat meestal slecht één heem voorloper verhoogd is en dat het porfyrienuitscheidingspatroon niet op de karakteristieke primaire patronen lijkt, die bij erfelijke porfyrieën worden waargenomen. Na eliminatie van vals negatieve en vals positieve resultaten kunnen zeven hoofdgroepen van verhogingen in de heemvoorlopers worden waargenomen (90,91):

1. Verhoogde delta-aminolevulinezuur concentraties ontstaan vaak bij loodvergiftiging of bij hereditaire tyrosinemie type I. Lood remt het enzym delta-aminolevulinezuur dehydrase, vandaar deze verhoging. Daarnaast zijn zink-protoporfyriene in bloed en coproporfyriene III in urine vaak mede verhoogd als reactie op andere enzyminhibities in de heemsynthese (92-94). Tyrosinemie veroorzaakt een porfyriene-achtig ziektebeeld doordat succinylaceton, een verhoogd metaboliet in deze ziekte, een zeer potente inhibitor is van delta-aminolevulinezuur dehydrase (96,97).
2. Uroporfyriene concentraties in urine en serum kunnen verhoogd zijn tijdens intoxicaties en chronische nierziekten. Uroporfyriene I in urine is verhoogd bij een verhoogde aanmaak van erythrocyten en/of leukocyten (98,99). De belangrijkste uitscheidingsroute voor uroporfyriene loopt via de urine. Wanneer in geval van nierlijden deze route verminderd is kunnen verhoogde porfyrienen met acht-, zeven- en vier carboxylgroepen in serum worden gevonden, die in sommige gevallen aanleiding geven tot lichtovergevoeligheid. Chronische intoxicatie geeft vaak porfyrienenpatronen die lijken op die van cutanea tarda. Soms is het bijzonder moeilijk om tussen deze primaire en secundaire porfyrieën te differentiëren (88). Verhoogde aanmaak van bloedcellen om welke reden dan ook veroorzaakt een ophoping van porfyrienen in de doodlopende I isomerentak van de heemsynthese, die zich weerspiegelt in verhoogde uroporfyriene I en coproporfyriene I concentraties in urine. Dit neemt men dan ook waar bij anemieën, leukemieën en polycythemie vera.
3. Coproporfyriene I concentraties in urine zijn verhoogd bij leverziekten, erfelijke hyperbilirubinemieën, zoals Dubin-Johnson-, Rotor- en Gilbert syndromen, infecties en hematologische ziekten

(100-102). Bij obstructieve geelzucht, cholestatische geelzucht, hepatitis en cirrose vindt een verhoogde urinaire uitscheiding van voornamelijk coproporfyrine I plaats, doordat deze leverziekten de hoofdroute van de coproporfyrine I, namelijk uitscheiding via gal, bemoeilijken. Normaal verloopt de excretieroute van coproporfyrine I grotendeels via de lever, gal en faeces tengevolge van een hogere affiniteit voor cMOAT (canaliculaire multi specifieke anion transporter) ten opzichte van coproporfyrine III. Deze cMOAT transporteert o.a. geconjugeerd bilirubine, bepaalde medicijnen en coproporfyrenen vanuit het cytoplasma van de hepatocyten naar de galgangen (75,103). Stoornissen in de conjugatie en transport van bilirubine beïnvloeden bijvoorbeeld de coproporfyrine I uitscheiding via gal het meest. Derhalve vindt men bij Rotor en Dubin Jonhson syndromen verhoogde concentraties coproporfyrine I in de urine. Verhoogde coproporfyrine I concentraties in urine duiden dus op leverproblematiek of op een snelle heemaanmaak. Door de hogere affiniteit van coproporfyrine I voor cMOAT is de constante coproporfyrenenratio in faeces omgekeerd van die in urine.

4. Coproporfyrine III concentraties zijn verhoogd bij chronische loodvergiftiging en bij acuut alcoholmisbruik. Bij chronisch alcoholmisbruik leidend tot leverlijden is een verschuiving van coproporfyrine I naar de urine waarneembaar.
5. De ratio coproporfyrine I/coproporfyrine III is afwijkend bij lever- en hematologische aandoeningen (zie de punten 2-4).
6. In bloed is de belangrijkste porfyryne zinkprotoporfyrine. Verhoogde (zink)protoporfyrine concentratie in bloed kunnen worden gevonden bij anemiën en loodvergiftigingen (88,92-95).
7. Dicarboxylporfyrenen in faeces zijn afkomstig van voedsel, hoge bloedingen in het maag-darmsysteem of van bacteriën (5,6,104-106). De dicarboxylfracties in faeces bevatten protoporfyrine en andere porfyrenen afgeleid van protoporfyrine, door bacteriële reductie of verwijdering van de vinylzijgroepen aan protoporfyrine. Daarnaast kan protoporfyrine de novo door bacteriën worden gesynthetiseerd of kan het afkomstig zijn van rood vlees of van hemoglobine na verwijdering van het ijzeratoom uit heem. Zelfs kleine bloedingen hoog in het gastro-intestinaal systeem die niet gepaard gaan met positieve occult bloed metingen kunnen de dicarboxylporfyrenen in faeces aanmerkelijk doen toenemen (105). Primaire porfyrieën kunnen worden uitgesloten wanneer geen gelijktijdige verhogingen van coproporfyrenen in urine en faeces of protoporfyrine in bloed worden gevonden.

Aspecten bij de analyses van porfyrenen en hun voorlopers

De bepalingen van delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen berusten op de methode van Mauzerall en Granick, waarbij een pyrrol in een zuur milieu reageert met p-dimethylbenzaldehyde onder vorming van oranje-rode producten met extinctie-maxima van

ongeveer 555 nm (107). Hiervoor moet delta-aminolevulinezuur eerst in een pyrrol worden omgezet, hetgeen gebeurt met behulp van acetylaceton. Nadelen van beide methoden zijn de ongevoeligheid en interferenties van storende componenten, die (na kleuring) eveneens bij 555 nm absorberen. De detectielimieten kunnen worden verbeterd en de interferenties worden geëlimineerd door beide stoffen voor te zuiveren met behulp van kolomchromatografie.

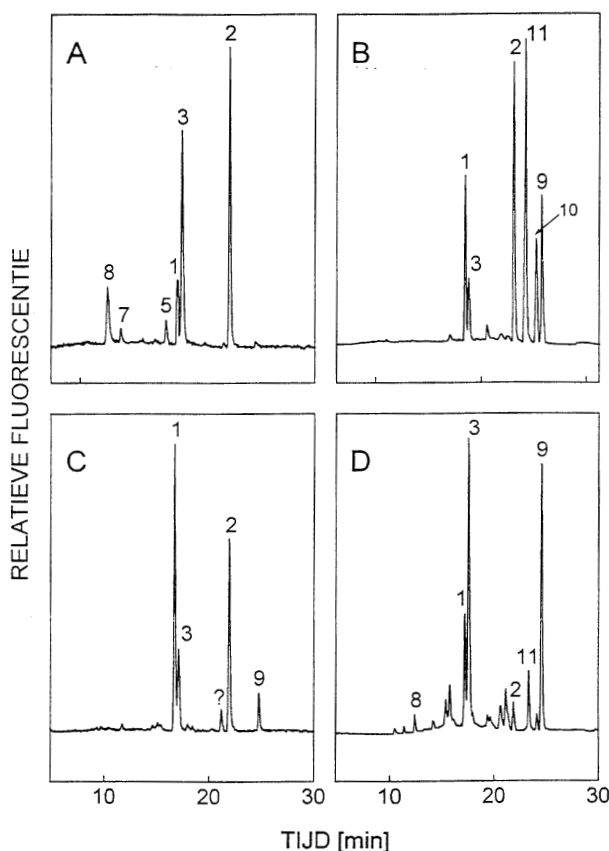
Rechtstreeks meten van porfobilinogeen in urine met behulp van Ehrlich reagens leidt tot foutieve interpretaties en het missen van acute porfyrieën met alle gevolgen van dien en is derhalve een zeer slechte screeningsmethode om latente en manifeste porfyrieën aan te tonen (108-111). Het meten van delta-aminolevulinezuur en porfobilinogeen in urine is alleen geïndiceerd bij acute porfyrieën.

Porfyrenen kunnen globaal op twee manieren adequaat worden gemeten. Ons inziens de beste maar meer bewerkelijke methode is die met behulp van hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC) en fluorescentie als detectie (5-7,112-116). Een snellere methode is die met behulp van spectrofotometrische of spectrofluorometrische detectie en tweede afgeleide van resp. het absorptie- of emissiespectrum, na verdunning van het monster in een zure oplossing (117-119). De HPLC-methode heeft als voordeel dat het gehele concentratiegebied van verlaagd tot sterk verhoogd kan worden bekeken in samenhang met het porfyrenenpatroon. Beide aspecten geven bij lage of licht verhoogde concentraties informatie over primaire en secundaire porfyrieën. De spectrofotometrische methoden hebben als voordeel dat snel een groot aantal monsters kan worden gescreend, maar mist de specificiteit om licht verhoogde primaire en secundaire porfyrieën aan te tonen. Daarom gaat onze voorkeur uit naar de HPLC-methode, die bijna geheel geautomatiseerd kan worden uitgevoerd (5,120).

Porfyrenen in urine kunnen zonder voorbereidingen rechtstreeks op de HPLC-kolom worden geïnjecteerd (5). Als voorzorg hebben wij een onteiwittingsstap met gelijktijdige additie van een interne standaard ingevoerd. Dit voorkomt precipitatie van eiwitten op de HPLC-kolom en verhoogt de reproduceerbaarheid van de methode.

Vanwege het grote verschil in hydrofobiciteit van de porfyrenen moet met een vloeistofgradient van methanol en/of acetonitril worden gewerkt, indien het gehele assortiment aan porfyrenen wordt gemeten. In onze methode bewerkstelligt methanol een goede resolutie tussen de dicarboxylisomeren (deutero-, pempto-, meso- en protoporfyrine) maar bemoeilijkt de scheiding tussen de I en III isomeren. Acetonitril doet min of meer het omgekeerde. Veelal moet een compromis tussen de concentraties methanol en acetonitril worden gevonden om goede resolutie tussen alle porfyrenen te kunnen bewerkstelligen (5).

Een typisch chromatogram van porfyrenen in urine is in figuur 3A te zien. Karakteristiek voor urine is de aanwezigheid van uro-, hepta-, penta-, copro- I en coproporfyrine III (resp 8, 7, 5, 4 en 4 carboxyl-



Figuur 3. Scheidingen van porfyrienen met behulp van HPLC. A : normale urine; B: normaal faeces monster; C: duodenaalgal verkregen met behulp van de Enterotest na galblaasstimulatie; D: duodenaalgal verkregen zonder de galblaas te stimuleren. 1: coproporfyriene I; 2: deuteroporfyriene; 3: coproporfyriene III; 5: pentaporfyriene; 7: heptaporfyriene; 8: uroporfyriene; 9: protoporfyriene; 10: mesoporfyriene; 11: pemptoporfyriene. Let vooral op de coproporfyriene ratio's die in de verschillende monsters zijn gevonden. Monster C bevat geen secundaire porfyrienen dit in tegenstelling tot monster D.

groepen). Onder normale omstandigheden is de coproporfyriene III concentratie groter dan de coproporfyrienen I concentratie. De coproporfyrienenratio geeft aan de porfyrienenbepaling met HPLC een extra dimensie, die met behulp van de spectrofoto(fluoro)-meter wordt gemist.

Een karakteristiek chromatogram van porfyrienen in faeces wordt in figuur 3B weergegeven. Hier is de coproporfyrienenratio omgekeerd ten opzichte van die in urine (figuur 3A) en bevat het monster meerdere porfyrienen met twee carboxylgroepen. Deze porfyrienen zijn hoofdzakelijk afkomstig van bacteriën in de darm, die ze enerzijds omvormen vanuit protoporfyriene of heem of anderzijds zelf synthetiseren (6). Heem kan via het nuttigen van rood vlees of door middel van inwendige bloedingen in faeces terecht komen. Derhalve kan de bepaling van dicarboxylporfyrienen in faeces goed gebruikt worden voor de diagnose van diffuse inwendige bloedingen in het eerste gedeelte van de tractus digestivus (6,104-106).

In een uitgebreid onderzoek hebben wij de bacteriële bijdrage aan porfyrienen in faeces bekeken en twee secundaire porfyrienen, deuteroporfyriene en pemptoporfyriene, herontdekt (5). Een Australische groep onder leiding van dr. I.S. Rose et al (104) heeft vervolgens de bij-

drage van rood vlees aan de secundaire porfyrienen nader uitgeplozen en een Delftse groep onder leiding van dr. P. de Waard (105) heeft veel onderzoek verricht naar de invloed van hoge intestinale bloedingen op deuteroporfyriene, pemptoporfyriene, mesoporfyriene en protoporfyriene in faeces.

De aanwezigheid van de dicarboxylporfyrienen maakt porfyrienenonderzoek in faeces gecompliceerd. De gevonden dicarboxylporfyrienen kunnen dus afkomstig zijn van een primaire porfyrie, bacteriën, voedsel en/of gastro-intestinale bloedingen. Hierdoor is het soms zeer moeilijk om met behulp van porfyrienenonderzoek in faeces een latente porfyrie te vinden.

Porfyrienenbepaling in gal omzeilt de bacteriële bijdrage (7). Echter, gal is een stuk moeilijker te verkrijgen dan faeces en urine. Met behulp van de Enterotest hebben wij een patiëntvriendelijke manier gevonden om periodiek galmonsters op porfyrienen te kunnen onderzoeken (23).

De Enterotest een eenvoudige non-invasieve methode om duodenaalvocht te verzamelen, bestaat uit het gebruik maken van een opgerold nylonkoordje, dat met behulp van water moet worden ingeslikt, terwijl één uiteinde aan de buitenkant van de wand wordt vast geplakt. Aan het ander uiteinde zit een klein stalen kogeltje. Om het opgerolde koordje bevindt zich een gelatine kapsel, dat in de maag oplost. Peristaltische bewegingen dirigeren het stalen kogeltje naar het duodenum. Vier uur na het inslikken is het koordje in het duodenum aangekomen. Aldaar neemt het nylonkoordje vloeistof op die in het duodenum aanwezig is. De galblaas wordt nu met behulp van cholecystokinine gestimuleerd en secerneert zijn inhoud in het duodenum. Vijftien minuten na galblaasstimulatie bestaat er evenwicht tussen de nieuwe vloeistof in het duodenum en het koordje en kan het koordje in één vloeiende beweging omhoog worden getrokken. Grote delen van het koordje moeten dan een gele gal-kleur bevatten.

Een karakteristiek chromatogram van porfyrienen in duodenaalgal is in figuur 3C te zien. De coproporfyrienenratio is hetzelfde als in faeces, echter de protoporfyriene concentratie is vele malen kleiner dan in faeces en de secundaire dicarboxylporfyrienen ontbreken.

Het volledig ontbreken van deze secundaire porfyrienen in gal en tevens in bloed bracht ons op het idee dat een enterohepatische circulatie van deze porfyrienen niet bestaat. Omdat deze porfyrienen van protoporfyriene zijn afgeleid en derhalve veel op protoporfyriene lijken, hebben wij de conclusie getrokken dat er ook geen enterohepatische circulatie voor protoporfyriene bestaat (23). Deze aanname is voor menig een moeilijk te accepteren, omdat algemeen aangenomen is dat porfyrienen wel circuleren. Berustend op deze vermeende enterohepatische circulatie zijn meerdere therapieën gebaseerd (geweest), die soms beperkte verbeteringen gaven te zien (44-46). Over het algemeen waren de resultaten teleurstellend en tegenstrijdig. Wij zaten toen met het probleem waarop deze gedeeltelijk succesvolle therapieën dan wel berusten, indien er geen sprake van circulatie van porfyrienen is. Serendipiteit bracht ons op het Herbst-Volkheimer-effect (121-123).

In 1848 beschrijft Herbst het verschijnsel dat harde deeltjes uit het voedsel tussen de darmcellen door in de bloedcirculatie en uiteindelijk in de urine terecht kunnen komen. Hierbij dringen de deeltjes als het ware tussen de cellen door om van het ene systeem in het andere te komen. Meer dan een eeuw later onderzocht Volkheimer dit verschijnsel systematisch en hij introduceert de term persorptie. Volkheimer toont aan dat persorptie binnen enkele minuten na inname van voedsel optreedt. Na orale toediening van kleine harde partikeltjes van bijv. cholestyramine (een hars om galzuren zouten en porfyrienen te binden in het maagdarmsysteem) leidt dit tot circulatie van enkele partikeltjes in de bloedbanen. Aldaar binden deze partikeltjes o.a. porfyrienen. Vervolgens worden deze complexen in de urine uitgescheiden. Via onderzoek hebben wij deze harde partikeltjes in de urine aangetoond, naast de aanwezigheid van protoporfyrine, dat onder normale omstandigheden niet in de urine voorkomt (47). De redelijk succesvolle therapieën met als tastbaar resultaat verlaging van porfyrienen in de bloedbaan berusten volgens ons op binding van porfyrienen in de bloedbaan en excretie via de urine in plaats van uitsluitend absorptie in de darmen en eliminatie via de faeces.

Een andere probleem, dat wij bij galonderzoek met behulp van de Enterotest tegen zijn gekomen, is dat het verblijf van het touwtje in het duodenum zonder meer geen porfyrienenpatroon oplevert, dat lijkt op dat van gal (zie figuur 3D) (23). Galblaasstimulatie met behulp van cholecystokinine levert wel representatieve patronen op, maar beperkt het gebruik van de test daar deze nu onder supervisie van een arts moet worden uitgevoerd.

De afwezigheid van een interne standaard bemoeilijkt het galonderzoek eveneens. Gal bevat namelijk geen component, die compenseert voor enerzijds indikking door verblijf in de galblaas en anderzijds verdunning door maag-, duodenum- en pancreassappen, die min of meer gelijktijdig in het duodenum terecht kunnen komen. Door uitsluitend porfyrienenratio's te nemen omzeilen wij het probleem van de interne standaard. Het blijkt dat deze ratio's bijzonder constant zijn (23). Neemt bijvoorbeeld de protoporfyrine concentratie in gal iets toe ten opzichte van de coproporfyrinen I en III, dan duidt dit op de aanwezigheid van een variegate porfyrie.

Met behulp van de Enterotest hebben wij eveneens bewezen, dat een enterohepatische circulatie van porfyrienen met twee carboxylgroepen vanuit het proximale gedeelte van het gastro-intestinale systeem eveneens verwaarloosbaar klein is of niet bestaat (23).

Door ervaring op gedaan met een drietal erytropoëtische protoporfyrine patiënten, die tengevolge van protoporfyrinestapeling in de lever een nieuwe lever getransplanteerd hebben gekregen, zijn wij betrokken geraakt bij het uitscheidingsmechanisme van protoporfyrine in gal (124). In het verleden zijn bij proefdieren en de mens allerlei proeven verricht om met behulp van het toediening of juist het wegvangen van galzouten de protoporfyrine-uitscheiding naar het canaliculairstelsel te verhogen om zodoende stapeling

te voorkomen. Bij proefdieren blijken de therapieën met galzouten redelijk succesvol te zijn, bij de mens echter valt het beoogde effect tegen (125-133). Met behulp van muizen en ratten met specifieke erfelijke stoornissen in de uitscheiding van lipofiele componenten naar de gal en met behulp van stoffen, die de cholesterol- en fosfolipidenuitscheiding in de canaliculus ontkoppelen van de galzout uitscheiding hebben wij aangetoond, dat protoporfyrine met behulp van lipiden in de gal wordt uitgescheiden (75). Fractionering van de galcomponenten in lipied vesikels, micellen en galzout complexen heeft dit bevestigd, zodat wij onomstotelijk hebben aangetoond dat lipiden een grotere bijdrage leveren aan de uitscheiding van protoporfyrine via gal, dan de galzuren zouten. Dit verklaart tevens het gering effect van galzout therapieën bij personen met erytropoëtische protoporfyrine.

Niet gepubliceerde resultaten laten zien dat dieet-effecten invloed op de uitscheiding van protoporfyrine in gal hebben. Derhalve wordt aangeraden zich bij erytropoëtische protoporfyrine aan dezelfde dieetrichtlijnen en medicijngebruik te houden als die gelden voor acute porfyrieën. Voor een overzicht naar diëten bij een porfyrie wordt verwezen naar de American Porphyrin Federation, die te vinden is op het Internet (134). Goede overzichten voor (on)gepast medicijngebruik bij porfyrieën is te vinden in de referenties (15,16,135).

Resumerend kan worden gezegd dat wij een robuuste HPLC bepaling voor porfyrienen in urine, faeces, bloed, gal, Enterotest, leverbiopten en eluaten hebben ontwikkeld, waarmee veel nieuwe porfyrieën, waaronder een zeer zeldzame, zijn ontdekt en enkele tegenstrijdige bevindingen zijn ontrafeld. Niettemin blijven nog veel porfyrieproblemen onopgelost en is er nog veel werk te verrichten alvorens gehele families op porfyrieën zijn gescreend en de lichtovergevoeligheid, levensbedreigende aanvallen en fataal leverlijden bij porfyrieën zijn geëlimineerd.

Literatuur

1. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1989; 1305-1365.
2. Elder GH, Smith SG, Smyth SJ. Laboratory investigation of porphyrias. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 395-410.
3. Rimington C. Haem biosynthesis and porphyrias: 50 years in retrospect. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 473-486.
4. Mustajoki P, Nordmann Y. Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2004-2008.
5. Beukeveld, GJJ, Nagel GT, de Ruyter-Buitenhuis AW, Kwarts EW, Wolthers BG. Determination of porphyrins in blood, urine and faeces by means of HPLC and its application in establishing porphyrias. *Biochim Clinica* 1987; 11: 203-213.
6. Beukeveld GJJ, Wolthers BG, van Saene JJM, de Haan THJ, de Ruyter-Buitenhuis AW, van Saene RHF. Pattern of porphyrin excretion in feces as determined by liquid chromatography; reference values and the effect of flora suppression. *Clin Chem* 1987; 33: 2164-2170.

7. Beukeveld GJJ, Meerman L, Huizenga JR, Venekamp-Hoolsema EEA, Gips CH, Wolthers BG. Determination of porphyrins in bile using high performance liquid chromatography and some clinical applications. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 153-159.
8. Beukeveld GJJ. Clinical relevance of porphyrin determinations in porphyria. Thesis, University Groningen, The Netherlands 1995.
9. Battersly AR, McDonald E. Biosynthesis of porphyrins, chlorins and corrins. Porphyrins and metalloporphyrins, Smith KM (ed.). Elsevier Scientific Publ. Company, Amsterdam, 1975; 61-122.
10. Bottomley SS, Muller-Eberhard U. Pathophysiology of heme synthesis. *Sem Hematol* 1988; 25: 282-302.
11. Sassa S. Regulation of the genes for heme pathway enzymes in erythroid and in non-erythroid cells. *Int J Cell Cloning* 1990; 8: 10-26.
12. Sassa S. Heme stimulation of cellular growth and differentiation. *Sem Hematol* 1988; 25: 312-320.
13. Beri R, Chandra R. Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev* 1993; 25: 49-152.
14. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1989; 40: 243-288.
15. Dover SB, Plenderleith L, Moore MR, McColl, KEL. Safety of general anaesthesia and surgery in acute hepatic porphyria. *Gut* 1994; 35: 1112-1115.
16. Wilson JHP, te Velde K. Geneesmiddelen en acute porfyrie. *Geneesmiddelenbulletin* 1990; 24: 35-40.
17. Walsh CT. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Ann Rev Biochem* 1984; 53: 493-535.
18. Lip GY, McColl KE, Moore MR. The acute porphyrias (review). *Br J Clin Pract* 1993; 47: 38-43.
19. Hindmarsh JT. The porphyrias. *Clin Chem* 1986; 32: 1255-1263.
20. Lee GR. Porphyria. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. 9th ed. Lea and Febiger Co., Philadelphia. 1993; 47: 1272-1297.
21. May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhaker CR, Cox TC, Bottomley SS. The diagnosis and follow-up of porphyria. *Pathology* 1995; 27: 142-153.
22. Paslin DA. Porphyrias. *Int J Dermatol* 1992; 31: 527-539.
23. Beukeveld GJJ, Bijleveld CMA, Kuipers F, Kreeftenberg HG, Huizenga JR, te Velde K, Wolthers BG. The Enterotest for the determination of human biliary porphyrin composition. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 453-462.
24. Doss M, Tiepermann RV, Schneider J. Porphobilinogen-synthase (delta-aminolevulinic acid dehydratase) deficiency in bone marrow cells of two patients with porphobilinogen-synthase defect acute porphyria. *Klin Wochenschr* 1983; 61: 699-702.
25. Thunell S, Henrichson A, Floderus Y, Groth CG, Erikson BG, Barkholt L, Nemeth A, Strandvik B, Elberg L, Holmberg L, et al. Liver transplantation in a boy with acute porphyria due to aminolaevulinic acid dehydratase deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 599-606.
26. Muraoka A, Suehiro I, Fujii M, Murakami K. Delta-aminolevulinic acid dehydratase deficiency porphyria with syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in a 69-year-old woman. *Kobe J Medical Science* 1995; 41: 23-31.
27. Porluri VR, Astrin KH, Wetmur JG, Bishop DF, Desnick RJ. Human 5-aminolevulinic acid dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum Genet* 1987; 76: 236-239.
28. Kaplan PW, Lewis DV. Juvenile acute intermittent porphyria with hypercholesterolemia and epilepsy: a case report and review of the literature. *J Child Neurol* 1986; 1: 38-45.
29. Boon FFL, Ellis C. Acute intermittent porphyria in a children's psychiatric hospital. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1989; 28: 606-609.
30. Mustajoki P, Desnick RJ. Genetic heterogeneity in acute intermittent porphyria: characterisation and frequency of porphobilinogen deaminase mutations in Finland. *Br Med J* 1985; 291: 505-509.
31. Wilson JHP, de Rooy FWM, te Velde K. Acute intermittent porphyria in the Netherlands: Heterogeneity of the enzyme porphobilinogen deaminase. *Neth J Med* 1986; 29: 393-399.
32. Wassif WS, Deacon AC, Floderus Y, Thunnell S, Peters TJ. Acute intermittent porphyria: diagnostic conundrums. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 915-921.
33. Schreiber WE, Fong F, Jamani A. Molecular diagnosis of acute intermittent porphyria by analysis of DNA extracted from hair roots. *Clin Chem* 1994; 40: 1744-1748.
34. Yoo H-W, Warner CA, Chen C-H, Desnick RJ. Hydroxymethylbilane synthase: complete genomic sequence and amplifiable polymorphisms in the human gene. *Genomics* 1993; 15: 21-29.
35. Bourgois F, Gu X-F, Deybach JC, Te Velde MP, Nordmann Y, Grandchamp B. Denaturing gradient gel electrophoresis for rapid detection of latent carriers of a subtype of acute intermittent porphyria with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase activity. *Clin Chem* 1992; 38: 93-95.
36. Beukeveld GJJ, Wolthers BG, Nordmann Y, Deybach JC, Grandchamp B, Wadman SK. A retrospective study of a patient with homozygous form of acute intermittent porphyria. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 673-683.
37. Picat C, Delfau MJ, Rooij FWM de, Beukeveld GJJ, Wolthers BG, Wadman SK, Nordmann Y, Grandchamp B. Identification of the mutations in the parents of a patient with a putative compound heterozygosity for acute intermittent porphyria. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 684-686.
38. Llewellyn DH, Smyth SJ, Elder GH, Hutchesson AC, Rattenbury JM, Smith MF. Homozygous acute intermittent porphyria: compound heterozygosity for adjacent base transitions in the same codon of the porphobilinogen deaminase gene. *Hum Genet* 1992; 89: 97-98.
39. Solis C, Xu W-M, Bermejo AM, Smith MF, Astrin KH, Desnick RJ. Homozygous dominant acute intermittent porphyria (HD-AIP): clinical spectrum and biochemical/genotype correlations. Proceedings of the international symposium on porphyrias and heme related disorders. Helsinki, 1995, abstract 133.
40. Eriksen L, Eriksen N. Porphyrin distribution and porphyrin excretion in human congenital erythropoietic porphyria. *Scand J Clin Lab Invest* 1974; 33: 323-332.
41. Miyagi K, Petryka ZJ, Bossenmaier I, Cardinal R, Watson CJ. The activities of uroporphyrinogen synthase and cosynthase in congenital erythropoietic porphyria (CEP). *Am J Hematol* 1976; 1: 3-21.
42. Moore MR, Thompson, GG, Goldberg A, Ippen H, Seubert A, Seubert S. The biosynthesis of haem in congenital (erythropoietic) porphyria. *Int J Biochem* 1978; 9: 933-938.
43. Watson CJ, Bossenmaier I, Cardinal R, Petryka ZJ. Repression by hematin of porphyrin biosynthesis in erythrocyte precursors in congenital erythropoietic porphyria. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71: 278-282.
44. Pimstone NR, Gandhi SN, Mukerij SK. Therapeutic efficacy of oral charcoal in congenital erythropoietic porphyria. *N Engl J Med* 1987; 316: 390-393.
45. Tishler PV, Winston SH. Rapid improvement in the chemical pathology of congenital erythropoietic porphyria with treatment with superactivated charcoal. *Meth Find Exp Clin Pharm* 1990; 12: 645-648.

46. Hift RJ, Meissner PN, Kirsch RE. The effect of oral activated charcoal on the course of congenital erythropoietic porphyria. *Brit J Dermatol* 1993; 129: 14-17.
47. Beukeveld GJJ, Wolthers BG. Cholestyramine orally administered to patients with erythropoietic protoporphyria results in urinary excretion of protoporphyrin: to be explained by the Herbst-Volkheimer effect? *Clin Chim Acta* 1995; 233: 119-126.
48. Verneuil de H, Ged C, Boulechfar S, Moreau-Gaudry F. Porphyrins: animal models and prospects for cellular and gene therapy. *J Bioenergetics & Biomembranes* 1995; 27: 239-248.
49. Warner CA, Yoo H-W, Tsai S-F, Roberts AG, Desnick RJ. Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of exonic mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *J Clin Invest* 1992; 89: 697-700.
50. Deybach JC, Verneuil H, Boulechfar S, Grandchamp B, Nordmann Y. Point mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria (Günther's disease). *Blood* 1990; 75: 1763-1765.
51. Tsai SF, Bishop DF, Desnick RJ. Human uroporphyrinogen III synthase: molecular cloning, nucleotide sequences, and expression of a full length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7049-7053.
52. Warner CA, Poh-Fitzpatrick MB, Zaider EF, Tsai S-F, Desnick RJ. Congenital erythropoietic porphyria. A mild variant with low uroporphyrin I levels due to a missense mutation (A66V) encoding residual uroporphyrinogen III synthase activity. *Arch Dermatol* 1992; 128: 1243-1248.
53. Xu W, Warner CA, Desnick RJ. Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of 10 mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *J Clin Invest* 1995; 95: 905-912.
54. Kushner JP, Barbuto AJ, Lee GR. An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda. *J Clin Invest* 1976; 58: 1089-1097.
55. Alleman MA, Wilson JHP, van den Berg JWO, Edixhoven-Bosdijk A, van Gastel-Quist LMH. Familial porphyria cutanea tarda: the pattern of porphyrins formed from porphobilinogen by hemolysates. *Clin Chem* 1982; 28: 1144-1147.
56. D'Alessandro L, Griso D, Biolcati G, Macri A, Topi GC. Incidence of hereditary porphyria cutanea tarda (PCT) in a sample of the Italian population. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 212-214.
57. Romana M, Dubart A, Beaupain D, Chabret C, Goossens M, Romeo P-H. Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 7343-7356.
58. Verneuil de H, Grandchamp B, Romeo P-H, Raich N, Beaumont C, Goossens M, Nicolas H, Nordmann Y. Molecular analysis of uroporphyrinogen decarboxylase deficiency in a family with two cases of hepatoerythropoietic porphyria. *J Clin Invest* 1986; 77: 431-435.
59. Garey JR, Franklin KF, Brown DA, Harrison LM, Metcalf KM, Kushner JP. Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1993; 105: 165-169.
60. Romana M, Grandchamp B, Dubart A, Amselem S, Chabret C, Nordmann Y, Goossens M, Romeo PH. Identification of a new mutation responsible for hepatoerythropoietic porphyria. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 225-229.
61. Garey JR, Harrison LM, Franklin KF, Metcalf KM, Radisky ES, Kushner JP. Uroporphyrinogen decarboxylase: a splice mutation causes the deletion of exon 6 in multiple families with porphyria cutanea tarda. *J Clin Invest* 1990; 86: 1416-1422.
62. Meguro K, Fujita H, Ishida N, Akagi R, Kurihara T, Galbraith RA, Kappas A, Zabriskie JB, Toback AC, Harber LC, Sassa S. Molecular defects of uroporphyrinogen decarboxylase in a patient with mild hepatoerythropoietic porphyria. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 681-685.
63. Nordmann Y, Grandchamp B, De Verneuil H, Phung L. Harderoporphyria: A variant hereditary coproporphyria. *J Clin Invest* 1983; 72: 1139-1149.
64. Te Velde K, Noordhoek KHN. Hereditaire coproporfyrie in twee Nederlandse families. *Ned Tijdschr Geneesk* 1984; 892-896.
65. Grandchamp B, Phung N, Nordmann Y. Homozygous case of hereditary co-porphyria. *Lancet* 1977; ii: 1348-1349.
66. Martasek P, Nordmann Y, Grandchamp B. Homozygous hereditary coproporphyria caused by an arginine to tryptophan substitution in coproporphyrinogen oxidase and common intragenic polymorphisms. *Human Molecular Genetics* 1994; 3: 477-480.
67. Downey DC. Hereditary coproporphyria. *Br J Clin Pract* 1994; 48: 97-99.
68. Delfau-Larue M-H, Martasek P, Grandchamp B. Coproporphyrinogen oxidase: gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1325-1330.
69. Eales L, Day RS, Blekkenhorst GH. The clinical and biochemical features of variegate porphyria: an analysis of 300 cases studied at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Int J Biochem* 1980; 12: 837-853.
70. Westerhof W, Smit EM. Porphyria Variegata; een familie onderzoek. *Ned Tijdschr Geneesk* 1981; 125: 1235-1241.
71. Dean G. Porphyria Variegata. *Acta Dermatovener* 1982; 100: 81-85.
72. Logan GM, Weimer MK, Ellefson M, Pierach CA, Bloomer JR. Bile porphyrin analysis in the evaluation of variegate porphyria. *N Eng J Med* 1994; 324: 1408-1411.
73. Long CC, Smyth SJ, Woolf J, Murphy GM, Finlay AY, Newcombe RG, Elder GH. Detection of latent variegate porphyria by fluorescence emission spectroscopy of plasma. *Br J Dermatol* 1993; 129: 9-13.C
74. Dailey TA, Dialely HA, Meissner P. Cloning, sequence and expression of mammalian protoporphyrinogen oxidase. Proceedings of the international symposium on porphyrias and heme related disorders. Helsinki, 1995, abstract 29.
75. Beukeveld GJJ, In 't Veld G, Havinga R, Groen AK, Wolthers BG, Kuipers F. Relationship Between Biliary Lipid and Protoporphyrin Secretion; Potential Role of mdr2 P-Glycoprotein in Hepatobiliary Organic Anion Transport. *J Hepatology* 1996; 24: 343-352.
76. Frank M, Doss MO. Severe liver disease in protoporphyria. *Curr Probl Dermatol*. 1991; 20: 123-135.
77. Wagner S, Doss MO, Wittekind C, Bäcker U, Meessen D, Schmidt FW. Erythrohepatische Protoporphyrie mit rasch progredienter Leberzirrhose. *Dtsch Med Wochenschr* 1989; 114: 1837-1841.
78. Doss MO, Frank M. Hepatobiliary implications and complications in protoporphyria, a 20 year study. *Clin Biochem* 1989; 22: 223-229.
79. Bloomer JR, Philips MJ, Davidson DL, Klatskin G. Hepatic disease in erythropoietic protoporphyria. *Am J Med* 1975; 58: 869-882.
80. Rank JM, Straka JG, Bloomer JR. Liver in disorders of porphyrin metabolism. *J. Gastroenterology and Hepatology* 1990; 5: 573-585.
81. Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T, Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and the location of the gene to chromosome 18. *Eur J Biochem* 1992; 205: 217-222.
82. Lamoril J, Boulechfar S, de Verneuil H, Grandchamp B, Nordmann Y, Deybach JC. Human erythropoietic protoporphyria: two point mutations in the ferrochelatase gene. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 181: 594-599.
83. Whitecombe DM, Albertson DG, Cox TM. Molecular analysis of functional and nonfunctional genes for human ferrochelatase: isolation and characterization of a ferrochelatase pseudogen and its sublocalization on chromosome 3. *Genomics* 1994; 20: 482-486.

84. Okuda M, Kohno H, Furukawa T, Tokunaga R, Taketani S. Overexpression in *Escherichia coli*, and one-step purification of the human recombinant ferrochelatase. *Biochim Biophys Acta* 1994; 6: 123-128.
85. Miyamoto K, Kanaya S, Morikawa K, Inokuchi H. Overproduction, purification, and characterization of ferrochelatase from *Escherichia coli*. *J Biochem* 1994 115: 545-551.
86. Tefferi A, Solberg LA, Eleffson RD. Porphyrins: clinical evaluation and interpretation of laboratory test. *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 289-290.
87. Kushner PJ. Laboratory diagnosis of the porphyrias. *N Engl J Med* 1991; 324: 1432-1435.
88. McColl KEL, Goldberg A. Abnormal porphyrin metabolism in diseases other than porphyria. *Clinics in Haematology* 1980; 9: 427-445.
89. Doss MO. Porphyrinurias and occupational disease. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 514: 204-218.
90. Pelt van J, Verheesen PE, Oosterhout van AGM, Beukeveld GJJ, Brombacher PJ. Interference of dipyrromethole in the analysis of porphyrins by HPLC. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 347-348.
91. Lanf BA, Finlayson LA. Naproxen-induced pseudoporphyria in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1994; 124: 639-642.
92. Labbé RF. Clinical utility of zinc protoporphyrin. *Clin Chem* 1992; 28: 2167-2168.
93. Zwennis WCM, Franssen ACh, Wijnans MJ. Use of zinc protoporphyrin in screening individuals for exposure to lead. *Clin Chem* 1990; 36: 1446-1459.
94. Gatelli GR, Woll JH, Kabra PM, Marton LJ. Simultaneous liquid-chromatographic determination of zinc protoporphyrin IX, protoporphyrin IX and coproporphyrin in whole blood. *Clin Chem* 1980; 26: 205-208.
95. Kaul B, Slavin G, Davidow B. Free erythrocyte protoporphyrin and zinc protoporphyrin measurements compared as primary screening methods for lead poisoning. *Clin Chem* 1983; 29: 1467-1470.
96. Mitchell G, Larochle J, Lambert M, Michaud J, Grenier A, Ogier H, Gauthier M, Lacroix J, Vanasse M, Larbrisseau A, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. 1990; 322: 432-437.
97. Sassa S, Kappas A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway: profound inhibition of d-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. *J Clin Invest* 1983; 71: 625-634.
98. Doss M, Tiepermann von R, Jendrychowsky A, Leonhardt KF, Gonnewig H, Tharandt L, Ihlenfeld J, Henning H. Diagnosis significance of urinary coproporphyrin isomer analysis. Supplement to the proceedings of the First International porphyrin meeting on porphyrins in human diseases. Ed. Doss M. Nawrocki P. University of Marburg. 1975; 1: 257-263.
99. Anderson CD, Rossi E, Garcia-Webb P. Porphyrin studies in chronic renal failure patients on maintenance hemodialysis. *Photodermatol* 1987; 4: 14-22.
100. Rocchi E, Gibertini P, Santunione V, Balli F, Ventura E. Faecal and urinary coproporphyrin isomers in biliary atresia and neonatal hepatitis. *La Ricerca Clin Lab* 1980; 10: 510-509.
101. Wolkoff AW, Wolpert E, Pascasio FN, Arias JM. Rotor syndrome, a distinct inheritable pathophysiologic entity. *Am J Med* 1976; 60: 173-179.
102. Frank M, Doss M, de Carvalho DG. Diagnostic and pathogenetic implication of urinary coproporphyrin excretion in the Dubin-Johnson syndrome. *Hepato-gastroenterology* 1990; 37: 147-151.
103. Jansen PLM, Peters WH, Lamers WH. Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology* 1985; 5: 573-9.
104. Rose IS, Young GP, St. John DJ, Deacon MC, Blake D, Henderson RW. Effect of ingestion of hemoproteins on fecal excretion of hemes and porphyrins. *Clin Chem* 1989; 35: 2290-2296.
105. Cohen A, Boeijinga JK, van Haard PM, Schoemaker RC, van Vliet-Verbeek A. Gastrointestinal blood loss after non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 33: 33-38.
106. Muusze RG. Occult blood. *Analyse* 1989; 82-84.
107. Mauzerall D, Granick S. The occurrence and determination of d-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* 1956; 219: 435-446.
108. Schreiber WE, Jamani A, Pudek MR. Screening tests for porphobilinogen are insensitive. The problem and its solution. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 644-649.
109. Buttery JE, Carrera AM, Pannall PR. Reliability of the porphobilinogen screening assay. *Pathology* 1990; 22: 197-198.
110. Buttery JE, Chamberlain BR, Beng CG. A sensitive method of screening for urinary porphobilinogen. *Clin Chem* 1989; 35: 2311-2312.
111. Jamani A, Pudek M, Schreiber WE. Liquid-chromatographic assay of urinary porphobilinogen. *Clin Chem* 1989; 35: 471-475.
112. Gray CH, Lim CK, Nicholson DC. The differentiation of the porphyrins by means of high pressure liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1977; 77: 167-178.
113. Wilson JHP, Berg JWO van den, Edinshoven-Bosdijk A, Gastel-Quist LHM van. Preparation of methyl esters for high pressure liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1978; 89: 165-167.
114. Christensen NG, Romslo I. Stool porphyrins determined by high pressure liquid chromatography and by fractional hydrochloric acid-ether extraction. *Scand J Clin Lab Invest* 1979; 39: 223-227.
115. Ford RE, Ou CN, Ellefson RD. Liquid-chromatographic analysis for urinary porphyrins. *Clin Chem* 1981; 27: 397-401.
116. Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta* 1984; 139: 55-63.
117. Zuijderhoudt, FMJ, Dorresteyn-de Bok J, te Velde K. Evaluation of a first-line spectrophotometric screening test for increased urine porphyrin excretion. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 186-189.
118. Valcarcel M, Gomez-Hens A, Rubio S, Petidier A. Direct quantification of coproporphyrins and uroporphyrins in urine by derivative synchronous fluorescence spectroscopy. *Clin Chem* 1987; 33: 1826-1831.
119. Pudek MR, Schreiber WE, Jamani A. Quantitative fluorometric screening test for fecal porphyrins. *Clin Chem* 1991; 37: 826-831.
120. Minder EI, Vuilleumier JP, Vonderschmitt DJ. Prototype application of a robot in the clinical laboratory enabling fully automated quantification of faecal porphyrins. *Clin Chem* 1992; 38: 516-521.
121. Prokop O. Der Herbst-Volkheimer-effect. *Kitasato Arch Exp Med* 1990; 63: 1-6.
122. Volkheimer G. Advances in Pharmacology and Chemotherapy. Garattini S, Goldin A, Haawking F, Kopin IJ, Schnitzer RJ, eds. Academic Press, New York 1977; 14: 163-187.
123. Volkheimer G. Persorption von Mikropartikeln. *Pathologie* 1993; 14: 247-252.
124. Meerman L, Verwer R, Slooff MJH, van Hattum J, Beukeveld GJJ, Kleibeuker JH, Haagsma EB. Perioperative measures during liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *Transplantation* 1994; 57: 155-158.
125. Avner DL, Berenson MM. Effect of choleretics on canalicular transport of protoporphyrin in the rat liver. *Am J Physiol* 1982; 242: G347-53.

126. Berenson MM, Garcia-Marin JJ, Gunther C. Effect of bile acid hydroxylation on biliary protoporphyrin excretion in rat liver. *Am J Physiol* 1988; 255: G382-8.
127. Berenson MM, Garcia-Marin JJ, Larsen R, Avner D. Effect of bile acids on hepatic protoporphyrin metabolism in perfused rat liver. *Gastroenterology* 1987; 93: 1086-93.
128. Berenson MM, Von Welch, Garcia-Marin JJ. Importance of bile acid structure in amelioration of griseofulvin-induced murine protoporphyric hepatopathy. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 89-98.
129. Berenson MM, El-Mir MY. Mechanism of action of bile acids on biliary protoporphyrin excretion. *Hepatology* 1992; 16: 119A.
130. Todd DJ, Callender ME, Mayne EE, Walsh M, Burrows D. Erythropoietic protoporphyria, transfusion therapy and liver disease. *Br J Dermatol* 1992; 127: 534-7.
131. Rademakers LHPM, Cleton MI, Kooijman C, Baart de la Faille H, Hattum van J. Early involvement of hepatic parenchymal cells in erythrohepatic protoporphyria? An ultrastructural study of patients with and without overt liver disease and the effect of chenodeoxycholic acid treatment. *Hepatology* 1990; 11: 449-57.
132. McCullough AJ, Barron D, Mullen KD, Petrelli M, Chung Park M, Mukhtar H, Bickers DR. Fecal protoporphyrin excretion in erythropoietic protoporphyria: effect of cholestyramine and bile acid feeding. *Gastroenterology* 1988; 94: 177-81.
133. Van Hattum J, Baart de la Faille H, van der Berg JWO, Edixhoven-Bosdijk A, Wilson JHP. Chenodeoxycholic acid therapy in erythropoietic protoporphyria. *J Hepatol* 1986; 3: 407-12.
134. American Porphyria Foundation. Internet-adres <http://www.enterprise.net/apf>
135. Moore MR. International review of drugs in acute porphyria-1980. *Int J Biochem* 1980; 12: 1089-1097.
136. Conlan MG, Hoots WK. Porphyria cutanea tarda in association with human immunodeficiency virus infection in a hemophiliac. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 857-59.
137. Toback AC, Longley J, Cardullo AC, et al. Severe chronic photosensitivity in association with acquired immunodeficiency syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 1056-57.
138. Ash S, Woodley DT, Chan LS. Porphyria cutanea tarda preceding AIDS. *Lancet* 1996; 347: 190.

Summary

Diagnosis of porphyria by laboratory methods: disorders in haem synthesis. Beukeveld GJJ and Wolthers BG. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 3-14.

Clinical chemical laboratories play an important role in establishing the diagnosis of porphyria, a group of metabolic disorders, which are characterized by symptoms of light sensitivity and/or life threatening attacks of abdominal pain, peripheral neuropathy, psychoses and coma. The complaints of porphyria patients are not always correctly interpreted, but it is of great importance, that in some cases the diagnosis should be made very fast in order to avoid life threatening situations, for instance by means of administration of haemarginate as quickly as possible. The patient material needed for the investigation of porphyrias depends on the type of porphyria and may involve the assay of porphyrins and eventual precursors in urine, feces, blood or bile. In this paper, comprising an extensive review of the thesis entitled "Clinical relevance of porphyrin determinations in porphyria" (8), the advantages and disadvantages of the various methods to assay porphyrins will be discussed as well as which patient material should be investigated in case of suspected porphyria. The first part of this review includes a general introduction to haem synthesis and a survey of primary and secondary porphyrias.

Key-words: *Porphyria; porphyrins; porphyrin precursors; haem; HPLC*