

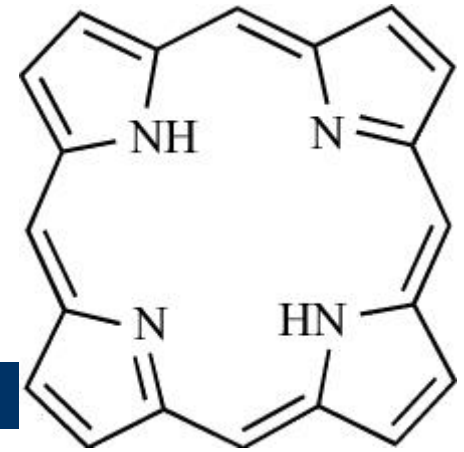
# **Krevní barviva – porfyriny, hemoglobin, bilirubin**

Mgr. Zuzana Stražilová

A decorative graphic on the left side of the slide, consisting of a light green vertical bar and a white rounded rectangle with a green border. A thick dark blue horizontal bar is positioned above the text.

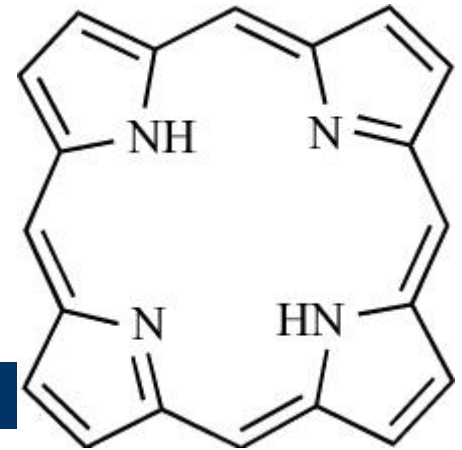
# Porfyriny

# Porfyriny



- prekurzory hemu
- tetrapyrrolové jádro (porfin)
- substiuenty (methyl, vinyl, acetyl, propionyl aj.)
  
- metaloporfyriny (Fe, Mg, Co, Pb)
- Podle počtu karboxylových skupin rozlišujeme okta (8, uroporfyrin), hepta (7), hexa (6), penta (5), tetra (4, koproporfyrin) porfyrin

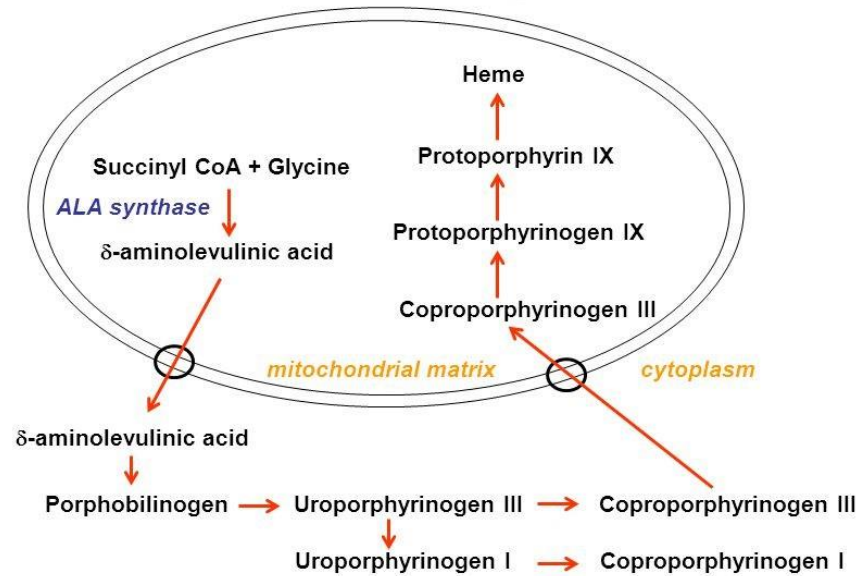
# Porfyriny



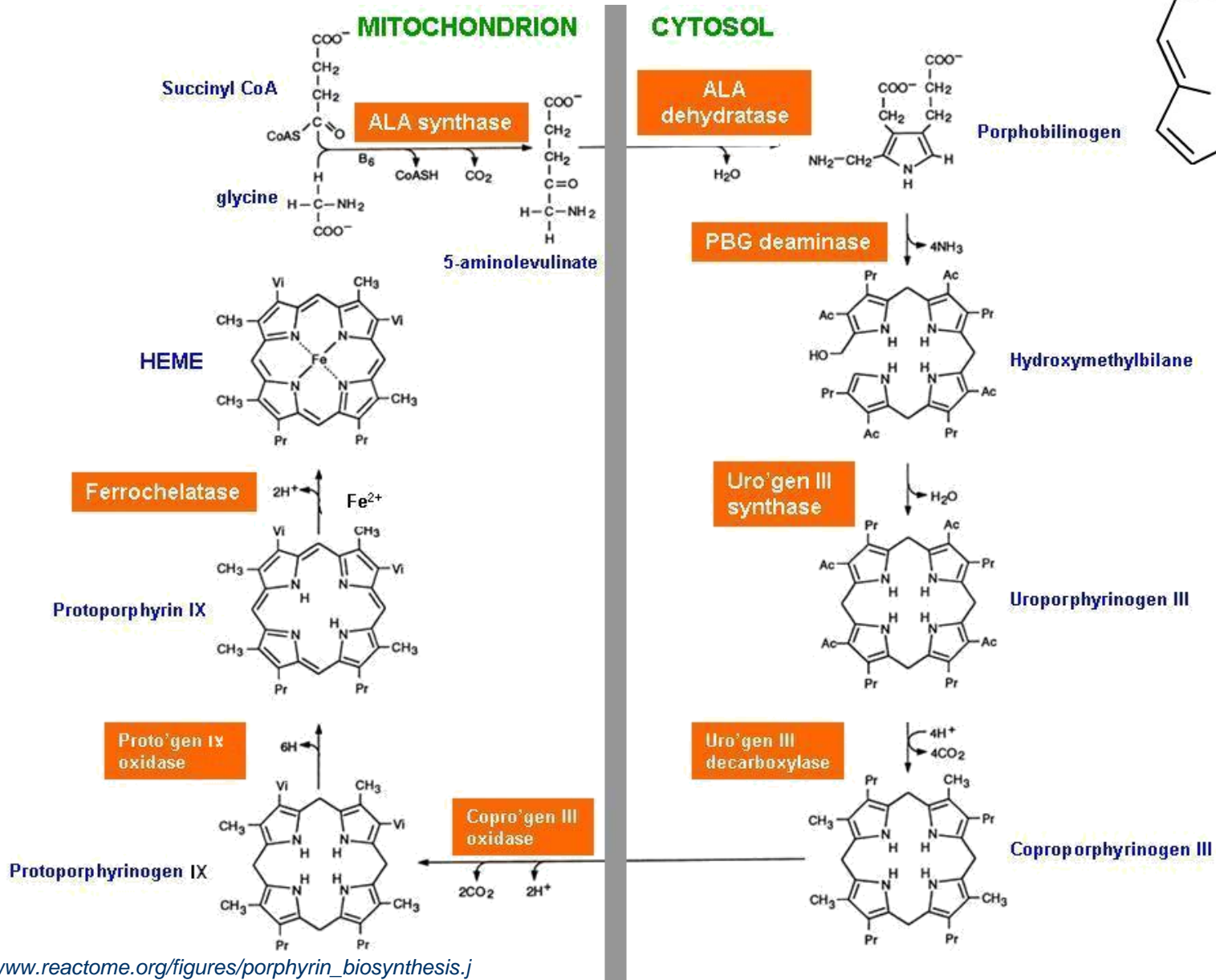
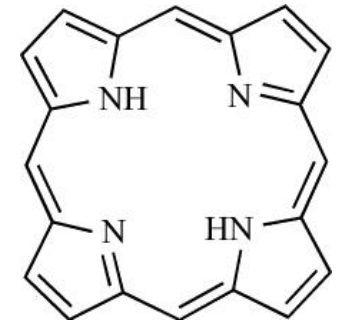
- Porfyriny - tetrapyroly, prekurzory hemu
- Vznikají řadou na sebe navazujících reakcí
- Důležité 2 enzymy:
  - **syntáza kyseliny 5 – aminolevulové**  
tvorba kyseliny 5 - aminolevulové (ALA) z glycinu a sukcinátu
  - **porfobilinogensyntáza**  
vznik porfobilinogenu z 2 molekul ALA
- *Glycin + sukcinylkoenzym A → kyselina 5.aminolevulová (ALA) → porfobilinogen (ze 2 ALA) → uroporfyrinogeny → po oxidaci uroporfyriny → koproporfyrinogeny → po oxidaci koproporfyriny → protoporfyrin IX → po přijetí atomu Fe vzniká červený hem*

Porfyrie - **defekt** tvorby kteréhokoliv **enzymu syntézy porfyrinů za stupněm ALA** (typická vysoká koncentrace ALA)

# Syntéza hemu



# Porfyriny – biosyntéza



# Porfyriny

Poruchy metabolismu porfyrinů:

- Získané (např. při otravě olovem)
- S dědičným podkladem – **porfyrie**

# Porfyrie:

- Metabolické poruchy
- Charakterizovány:
  - hromaděním porfyrinů nebo jejich prekurzorů v některých tkáních
  - zvýšenou hladinou v plasmě či v erytrocytech
  - zvýšeným vylučováním porfyrinů nebo jejich prekurzorů stolicí nebo močí



# Porfyrie - dělení

- ❖ Dle místa zvýšené koncentrace
  - Erytropoetické
  - Jaterní
- ❖ Dle průběhu
  - Akutní
  - Chronické
- ❖ Dle původu
  - Vrozené
  - Získané
- ❖ Dle projevu
  - Kožní
  - Jaterní

# Porfyrie – klinické příznaky

- Akutní bolest v břiše, neurologické příznaky
  - Vysoká koncentrace  $\delta$  – ALA a porfobilinogenu – neurotoxický účinek
- Fotosenzitivita
  - Intenzivní absorpce světla (400 nm) v kůži nemocných – aktivace porfyrinové molekuly – uvolnění volných radikálů – poškození kůže

# Porfyrie



# Klinické projevy porfyrií

## Pozdní kožní porfyrie (PCT)

- vysoká zranitelnost kůže, spontánní tvorba puchýřům hyperpigmentace
- klinická manifestace často iniciována současným jaterním postižením (nadměrná konzumace alkoholu, hepatitida C, vzácně estrogeny)
- neléčená může vést ke vzniku karcinomu jater

## Akutní ataky (AIP)

- křečovitě až agonizující bolesti břicha
- další příznaky: např. tachykardie, zvracení, křeče

### *Pozn.: Důležitá prevence*

- akutní ataka často vyvolaná použitím léků, kt. nemocní nesmějí dostat
- nutné, aby co nejširší okruh členů rodiny věděl, zda porfyrií trpí či nikoli
- pokud je ale jedinec nositel genu, ale neprodělal klinický záchvat, je dg. základě fluorescenčních a fotometrických metod obtížná -> zjišťování genové mutace

# Porfyrie

## **Symptomatická jaterní porfyrie** (Porphyria cutanea tarda)

- nejčastější, patří mezi jaterní porfyrie (poškození jater)
- při nedostatku uroporfirogen dekarboxylasy
- objevuje se v pozdějším věku

## Akutní intermitentní porfyrie

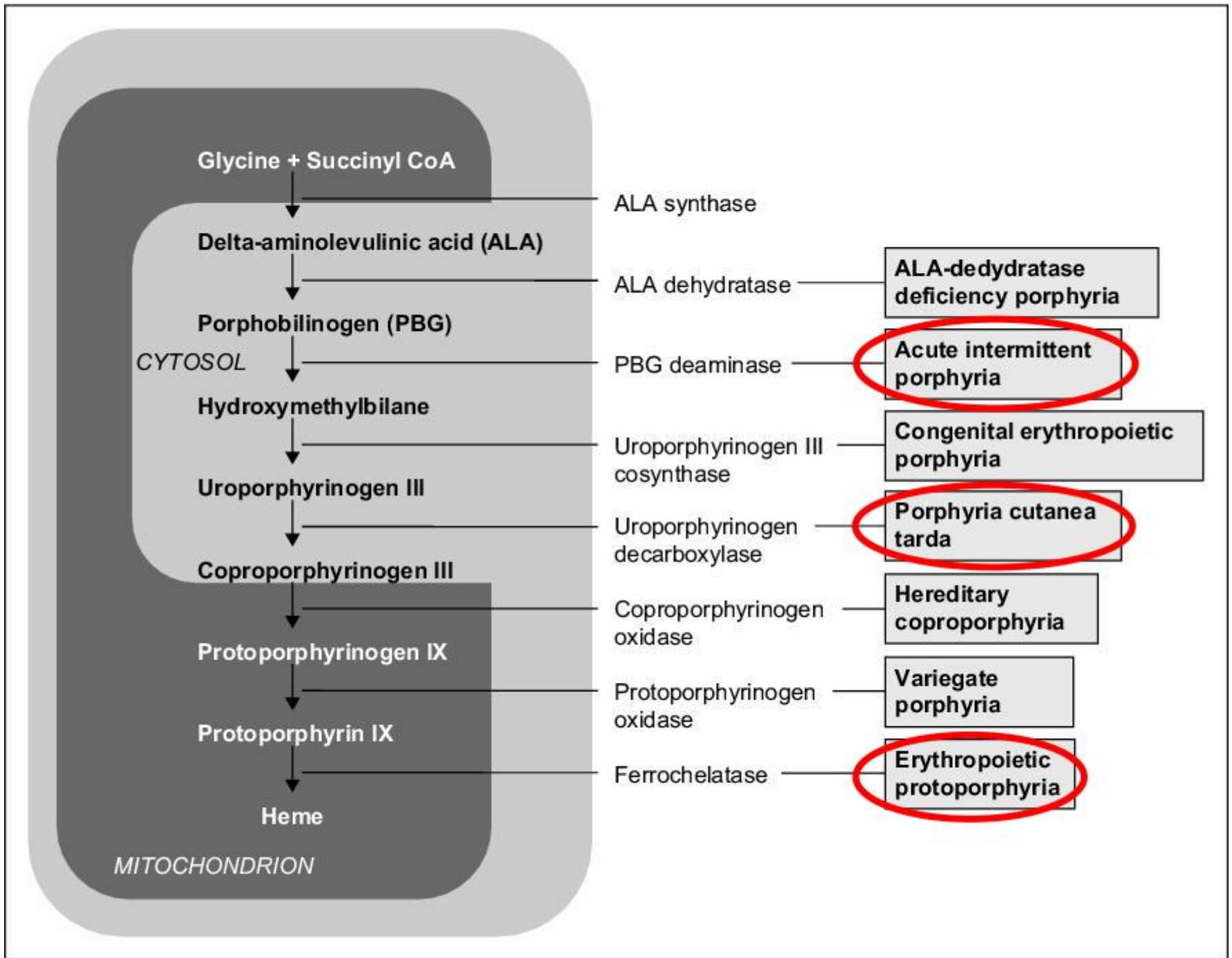
- porucha přeměny porfobilinogenu a porucha metabolismu steroidů v játrech (hromadí se a indukují tvorbu syntázy ALA)

## Celá řada dalších typů porfyrií

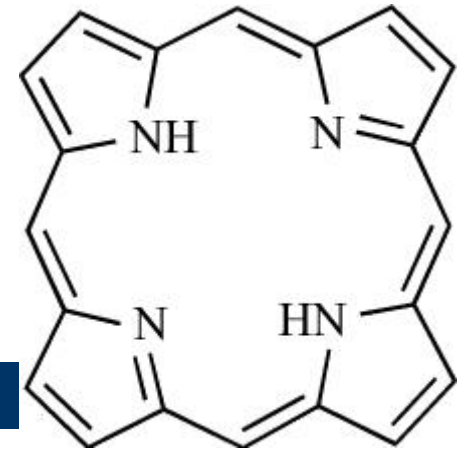
Rozlišení typů - analýza porfyrinů nejčastěji v moči

- zřídka v plasmě, erytrocytech a stolici

- analýza enzymů - výjimečně, v ČR se provádí ve VFN Praha (dehydratáza 5-aminolevulátu)



# Stanovení porfyrinů



- Konjugované dvojně vazby – barevnost hemu, porfyrinů
- Redukované formy porfyrinů – bezbarvé, po neenzymové oxidaci vzniklé porfyriny jsou barevné (absorbují záření s maximem 400nm, kyselé roztoky nebo roztoky v org. rozpouštědlech po excitaci UV záření fluoreskují)

# Stanovení celkových porfyrinů:

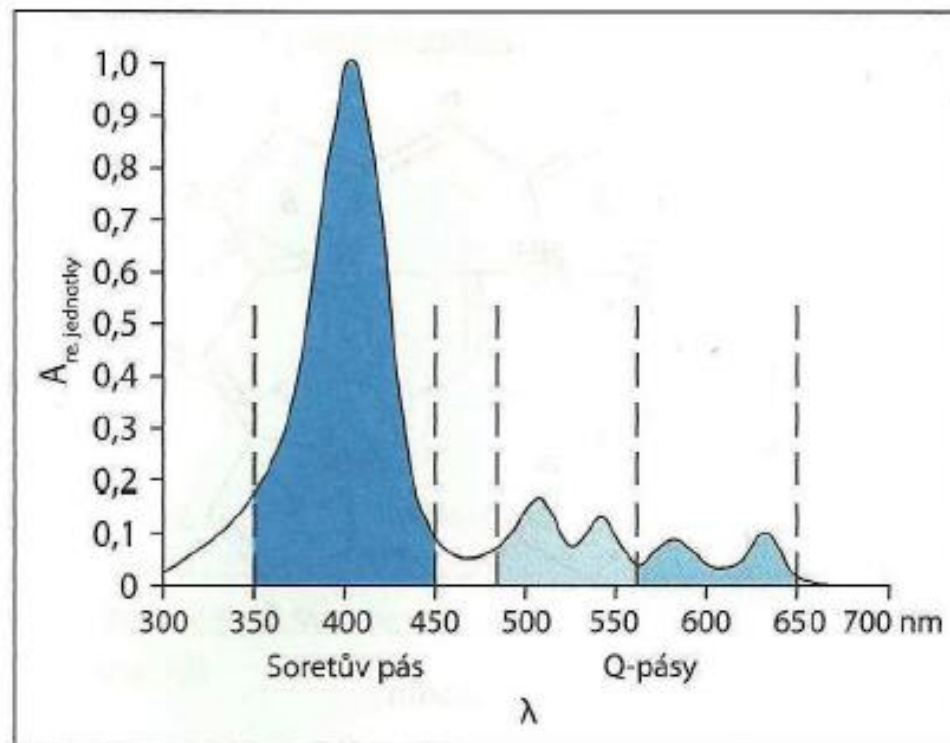
- **Spektrofotometrická křivka** v oblasti 350-450 nm  
Charakteristické absorbční spektrum – **Soretův pás**,  
s maximem okolo 400 nm
- Při větším podílu uroporfyriu – posun abs. maxima na 405 nm
- Materiál: okyselená jednorázová moč (kys. sírová)  
nutno **chránit před světlem**
- Fyziologické rozmezí je do **144 ug/l** (0,22  $\mu\text{mol/l}$ )
- V případě positivity následuje další vyšetření moče – stanovení jednotlivých porfyrinů, stanovení prekurzorů porfyrinů (ALA, PBG), a případně i enzymů v krvi podílejících se na tvorbě a přeměně porfyrinů (výjimečně).
- Méně často možnost stanovení porfyrinů ve stolici, erytrocytech či plazmě



# Stanovení jednotlivých porfyrinů:

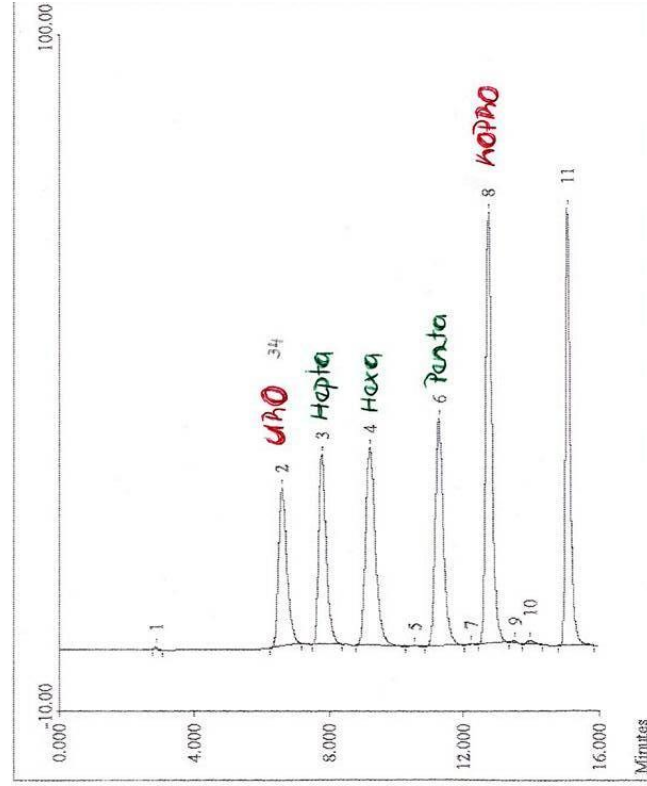
- V kyselém prostředí po ozáření UV světlem (400 nm) silně fluoreskují v červené oblasti (550-650 nm)
- Okyselená moč **metodou HPLC** na reverzní fázi s použitím fluorescenčního detektoru (fosf. pufr, metanol)
- Materiál – sbíraná moč za 24 hod, konzervovaná  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
Nutno **chránit před světlem**
- **Referenční rozmezí**
  - Uroporfyrin : do 0,050  $\mu\text{mol}$  / 24 hod
  - Koproporfyrin : do 0,280  $\mu\text{mol}$  / 24 hod
  - Heptaporfyrin : do 0,014  $\mu\text{mol}$  / 24 hod
  - Hexaporfyrin : do 0,006  $\mu\text{mol}$  / 24 hod
  - Pentaporfyrin : do 0,005  $\mu\text{mol}$  / 24 hod

# Stanovení celkových porfyrinů



Matouš B. a kol. Základy lék. chemie a biochemie. Galén Praha

# Chromatogram s píky jednotlivých porfyrinů



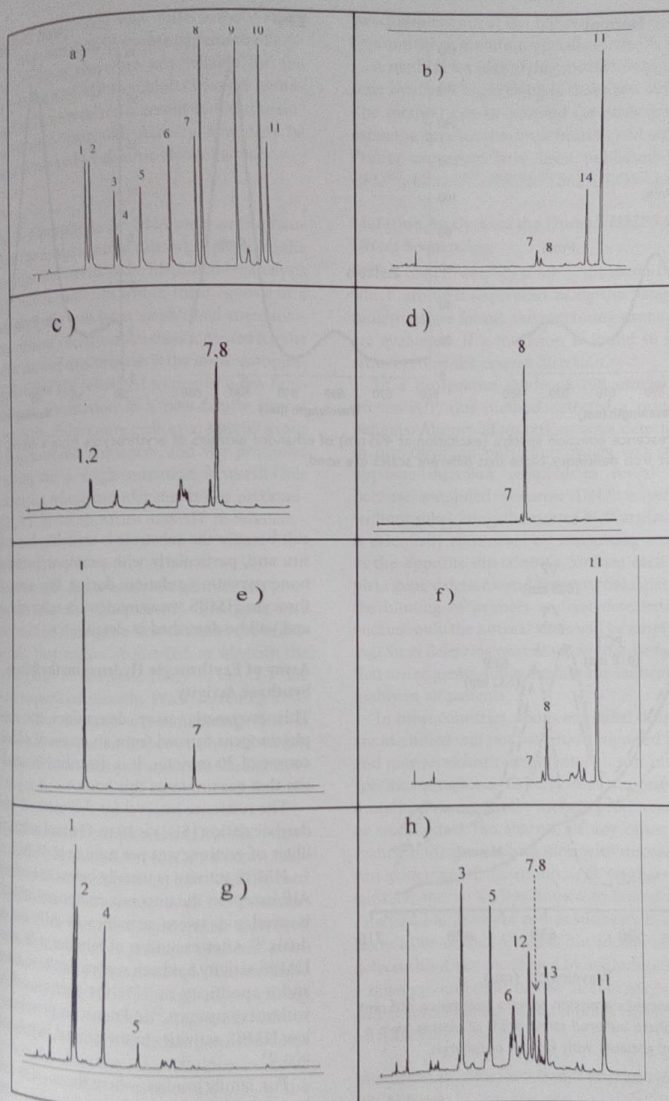


Figure 32-14 Representative HPLC chromatograms for (a) working standard; b, normal feces; c, normal urine; d, feces—hereditary erythropoietic porphyria; e, urine—congenital erythropoietic porphyria; f, feces—variegata porphyria; g, urine—porphyria cutanea tarda; h, urine—porphyria cutanea tarda chromatographic conditions as described in the appendix on the Evolve site that accompanies this text. Peaks are: 1, uroporphyrin-I; 2, uroporphyrin-III; 3, heptacarboxylate porphyrin-I; 4, heptacarboxylate porphyrin-III; 5, heptacarboxylate porphyrin; 6, pentacarboxylate porphyrin; 7, coproporphyrin-I; 8, coproporphyrin-III; 9, deuteroporphyrin-IX; 10, coproporphyrin-IX; 11, protoporphyrin-IX; 12, hydroxylisocoproporphyrin; 13, isocoproporphyrin; 14, penttoporphyrin-IX.

Zdroj: TIETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic, Washington, 2006

# Stanovení porfyrinů a jejich prekursorů - kvantitativně

## Stanovení porfobilinogenu (PBG) v moči - spektrofotometricky:

- Reakce porfobilinogenu v kyselém prostředí s p-dimethylaminobenzaldehydem
- Vznik červeného kondenzačního produktu
- Referenční rozmezí: do 36  $\mu\text{mol/l}$

## Stanovení 5-aminolevulátu v moči - HPLC:

- 5-aminolevulát se reakcí s acetylacetonem a formaldehydem převede na fluorescenční derivát
- Stanovení HPLC metodou s fluorescenčním detektorem
- Referenční rozmezí: do 20  $\mu\text{mol/l}$



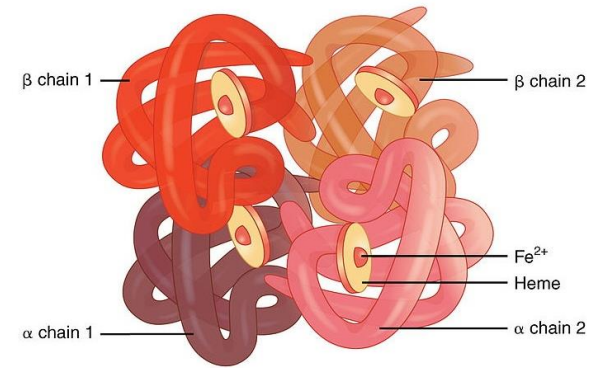
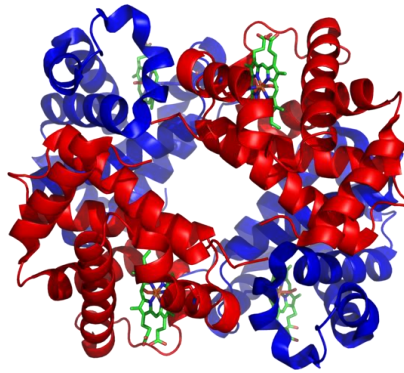
# Hemoglobin

# Hemoglobin

- Transportní metaloprotein, červeně zbarvená bílkovina v erythrocytech
- Přenos krevních plynů - především  $O_2$  z plic do periferních tkání, ale i části  $CO_2$  v opačném směru (reverzibilní vazba)
- Důležitý **pufrační systém krve** – vazba  $H^+$  na postranní řetězce His (především v periferní tkáni)
- Většina hemu se tvoří v kostní dřeni, při jeho odbourávání dochází k tvorbě žlučových barviv
- Degradací globinu vznikají aminokyseliny
- Volný Hb se váže na haptoglobin – ochrana ledvin
  
- Koncentrace Hb v krvi:

B	P	U
ženy: 120-165 g/l muži: 130-175 g/l	Do 50 mg/l >300mg/l intravaskulární hemolýza	0 arb.j.

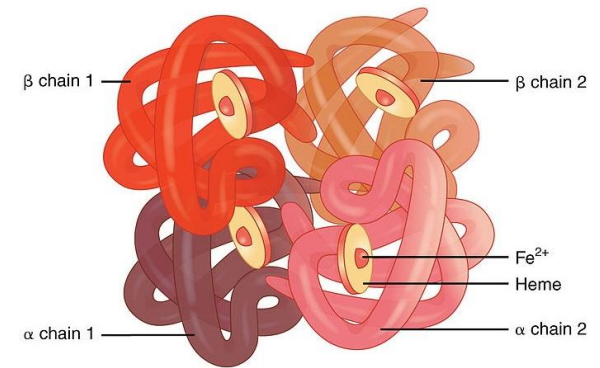
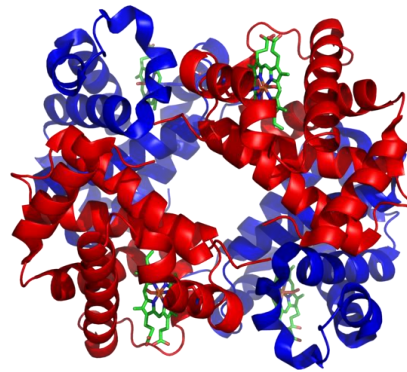
# Hemoglobin



- **Tetramer** – podjednotky spojeny H-můstky a iontovými vazbami
- Každá podjednotka složena z proteinové části – **globinu** a prostetické skupiny – **hemu** s centrálním kationtem  **$Fe^{2+}$**  (pevně vázán koordinálně kovalentními vazbami)
- Patří mezi konjugované bílkoviny - spojením bílkoviny s organickým komplexem obsahujícím kov
- Hemoglobin **tvořen z hemu** (protoporfyrin IX s navázaným  $Fe^{2+}$ ) a bílkoviny **globinu**
- Globin je tvořen 4 polypeptidickými řetězci: např. dvěma řetězci  $\alpha$  a dvěma řetězci  $\beta$
- Molekula ve tvaru čtyřstěnu
- Každý **globinový řetězec** je v jednom rohu, **porfyrinové řetězce** jsou umístěny v dutinách řetězců s **atomem Fe uprostřed**
- Hemoglobin: 4 polypeptidické řetězce (např.  $2\alpha$  a  $2\beta$ ), 4 hemy, 4 Fe



# Hemoglobin



- několik typů molekul Hb – rozlišujeme podle globinových řetězců ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$ ):

## Adultní Hb (HbA):

- **HbA1** ( $2\alpha 2\beta$ ): majoritní forma Hb u dospělých a dětí nad 7 měsíců
- **HbA2** ( $2\alpha 2\delta$ ): minoritní forma Hb dospělých

## Fetální Hb:

- **HbF** ( $2\alpha 2\gamma$ ): tvořen u plodu, po narození je odbouráván a nahrazován Hb A; u novorozenců až 70% celkového Hb

## Embryonální Hb

- tvořen u embryí buňkami krevních ostrůvků žloutkového vaku v prvních týdnech vývoje, později je nahrazen Hb F
- Gower I ( $2\zeta 2\epsilon$ ), Gower II ( $2\alpha 2\epsilon$ ), Portland ( $2\zeta 2\gamma$ )

Podíl Hb u dospělých:

96% **HbA1** ( $\alpha_2\beta_2$ )

2-3% **HbA2** ( $\alpha_2\delta_2$ )

1 % **HbF** ( $\alpha_2\gamma_2$ )

# Deriváty hemoglobinu

- **Oxy-/deoxyhemoglobin (oxy/deoxyHb)** – s navázaným  $O_2$  nebo bez navázaného  $O_2$  (železo ve formě  $Fe^{2+}$ , v oxidované i neoxidované formě)
- **Karbaminohemoglobin (HbCO<sub>2</sub>)** – fyziologický komplex s oxidem uhličitým ( $CO_2$  navázaný přes  $-NH_2$  konec  $\beta$  řetězce)
- **Karboxyl /Karboxyhemoglobin (COHb)** - vzniká při otravách s CO reversibilní vazba **CO**, který se na  $Fe^{2+}$  váže asi 200-300x pevněji než  $O_2$ ) - i když je vazba reverzibilní, za normálního tlaku jej  $O_2$  z vazby nevytlačí; snížená schopnost krve transportovat kyslík  $\Rightarrow$  **tkáňová hypoxie** (kuřáci, otrava CO), konc. v krvi  $< 0,5 \%$
- **Sulfhemoglobin** – směs oxidovaného a částečně denaturovaného Hb vzniklého během oxidativní hemolýzy, během oxidace Hb vazba atomu síry, nemůže vázat kyslík ale CO ano
- **Kyanhemoglobin (HbCN)** – otravy kyanidy

# Deriváty hemoglobinu

- **Methemoglobin (metHb)** – vzniká z hemoglobinu oxidací železa  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ 
  - neschopnost reverzibilně vázat kyslík, normálně konc. v krvi pod 1,5 %
  - hnědé zbarvení krve
  - zpětná redukce: **NADH methemoglobin reduktáza** (není plně vyvinutá u dětí do 1 roku, navíc: u dětí větší aktivita intestinální flóry (hlavně E.coli) = větší redukční schopnost – přeměna dusičnanů na dusitany)
    - = riziko methemoglobinemie u dětí při pití vody s obsahem dusičnanů
      - oxidaci  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  mohou způsobovat např. i anilíny (barviva) nebo sulfoamidy (léčiva)
    - Kongenitální methemoglobinémie - údržba  $Fe^{2+}$  narušena nedostatkem NADH methemoglobin reduktázy (riziko methemoglobinemie u dětí při pití vody s obsahem dusičnanů)
    - Metabolická acidóza nebo kóma - zvýšení konc. methemoglobinu
    - Hladiny nad 70% mohou být letální

# Deriváty hemoglobinu

- ***Glykovaný Hemoglobin (HbA1C)***
  - **neenzymatická vazba glukózy** na řetězce globinu udává se v mmol glykovaného/mol celkového hemoglobinu
  - za normálních podmínek asi 20 – 42 mmol/mol, u dobré kompenzace diabetu do 53 mmol/mol
  - parametr pro zpětné sledování compliance pacienta při léčbě diabetu
  - Vysoká hodnota (>60 mmol/mol] – vysoké riziko rozvoje dlouhodobých komplikací (retino-, nefro-, neuro-, kardiopatie)
  - Posouzení dlouhodobé kompenzace diabetu (6-8 týdnů zpětně)

# Talasémie, Hemoglobinopatie

## Hemoglobinopatie:

- Strukturální abnormality jednoho nebo obou globinových řetězců (záměna aminokyseliny v řetězci)
- Více než 900 typů, většina se klinicky nemanifestuje
- Více než 100 druhů anemií má nestabilní  $\alpha$  či  $\beta$  globinové řetězce – nestabilní hemoglobinová hemolytická anémie
- Srpkovitá anémie - u homozygotů defekt tvaru erytrocytů, anémie, bolest kloubů, infarkt různých orgánů - S forma hemoglobinu (záměna kys. glutamové za valin)

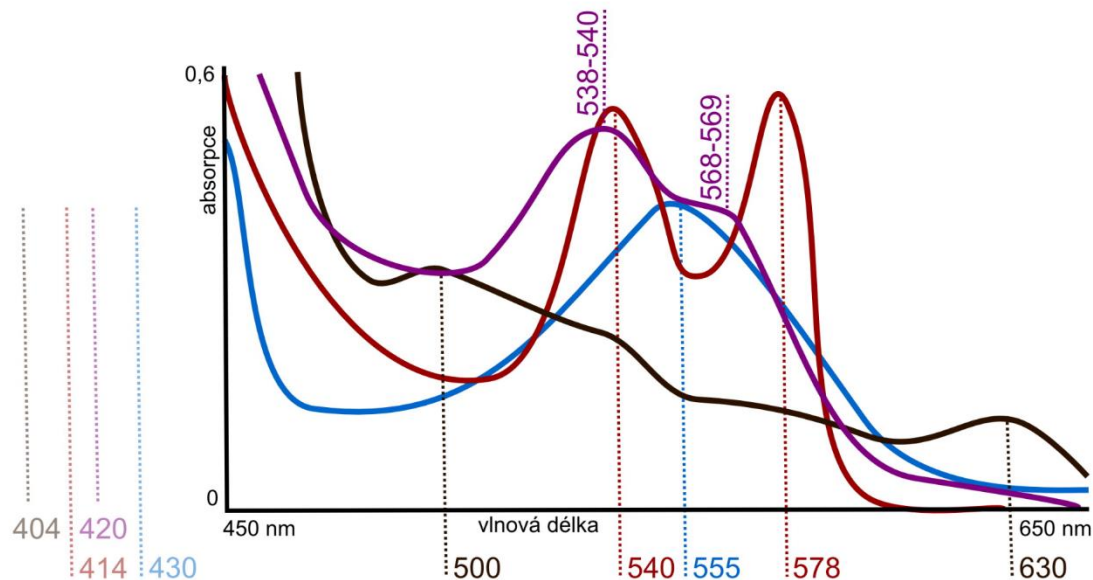
## Talasémie:

- Dědičné poruchy - změna poměru syntézy jednoho či druhého globinového řetězce
- $\alpha$  -talasémie (Afrika, jihovýchodní Asie) – redukce  $\alpha$  řetězců
- $\beta$  -talasémie (Středomoří, Indie, jižní Čína) – redukce  $\beta$  řetězců
- Množství variant, kombinace talasémií
- Někdy bez klinických příznaků, jindy s výraznou anémií

# Stanovení Hb a jeho derivátů

- **Spektrofotometrické měření** – tHb i jeho deriváty mají charakteristická absorpční spektra ve viditelné oblasti záření  
⇒ typická výrazná absorpční maxima v oblasti **400–430 nm** (Soretův pás), další absorpční vrcholy jsou podstatně nižší

oxyhemoglobin deoxyhemoglobin (redukováný Hb) methemoglobin karboxylhemoglobin



# Stanovení hemoglobinu

- Nejčastěji v plné krvi
- Stopy v séru, plasmě, moči a stolici - na základě pseudoperoxidázové aktivity - hem obsahující  $\text{Fe}^{2+}$  katalyzuje oxidaci některých barviv benzidinového typu peroxidem vodíku

**Stanovení Hb v plné krvi s hexakynoželezitanem (Drabkin) – referenční metoda** (dříve jako součást stanovení krevního obrazu, 1966 mezinárodní standard, pomalá a nesnadno se automatizuje, toxický odpad):

- Hb se lyzačním roztokem (hypotonický pufr) uvolní z erytrocytů
- $\text{Hb} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \rightarrow \text{MetHb} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$
- $\text{MetHb} + \text{CN}^- \rightarrow \text{MetHbCN}$
- Vznik kyanidového komplexu, měří se fotometricky při 540 nm

# Stanovení Hb v plné krvi

- **Součástí stanovení krevního obrazu** (na hematologických automatech ):
  - nejprve se **přídavkem speciálního roztoku zlyzují erytrocyty**
  - pak se přidá transformační roztok – vzniká **komplex lauryl sulfát sodný – Hb** (Sysmex) nebo **imidazol – Hb**.
  - vzniká opticky stálý komplex barevný komplex – stanoví se **fotometricky**
    - metoda rychlá, netoxická, snadno se automatizuje, přesně měří i vzorky s obsahem methemoglobinu a kontrolní krve
- **V biochemii jako součást ABR analyzátorů** - měření absorpce světla v plné krvi (využití rozptylu světla červenými krvinkami - světelným zdrojem je laser



# Stanovení derivátů hemoglobinu

(v plné krvi)

- Provádí se na oximetrech -samostatné přístroje
  - oximetrický modul součást přístrojů na ABR
- Deriváty hemoglobinu - měří se **spektrofotometricky** na základě Lambert-Beerova zákona
- Stanovuje se celkový hemoglobin, oxyhemoglobin, karboxylhemoglobin, methemoglobin a sulfhemoglobin
- K methemoglobinu i sulfhemoglobinu jsou rovněž popsány fotometrické metody

# Stanovení hemoglobinu

## Stanovení glykovaného hemoglobinu:

- Stanovení frakce HBA 1c zvýšené u diabetiků
- Metody HPLC, kapilární elfo

## Stanovení hemoglobinu ve stolici:

- Screening na OK

## Stanovení hemoglobinu v moči:

- Součást chemické analýzy moče s diagnostickými proužky

# Stanovení volného hemoglobinu v plasmě nebo séru

- < 50 mg/l
- Metoda pro zjištění intravaskulární hemolýzy (> 300 mg Hb/l)
- Šetrný odběr - nádobka s heparinátém litným, stáčet při 2000ot/min

Ruční metoda:

- Absorpční spektrum při 340 – 600 nm, derivuje se max. 403 – 405 nm

Metoda na automatickém analyzátoru:

- semikvantitativní stanovení
- využívá měření sérových indexů (hemoglobin, lipidy, bilirubin).
- proměřuje se absorbance při šesti vlnových délkách (480, 505, 570, 600, 660 a 700 nm)

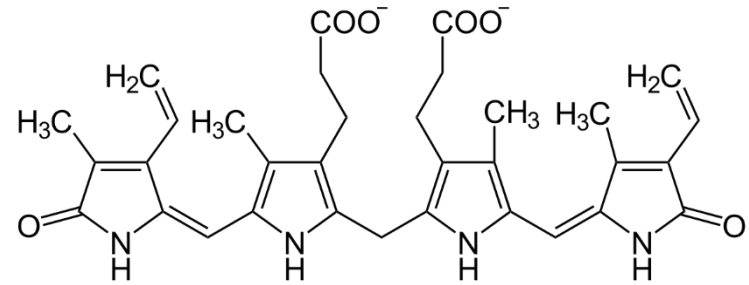
# Identifikace hemoglobinových variant

- Dříve se používala elektroforéza
- Dnes dominují molekulární techniky, imunometody, HPLC, kapilární elektroforéza a MS



# Bilirubin

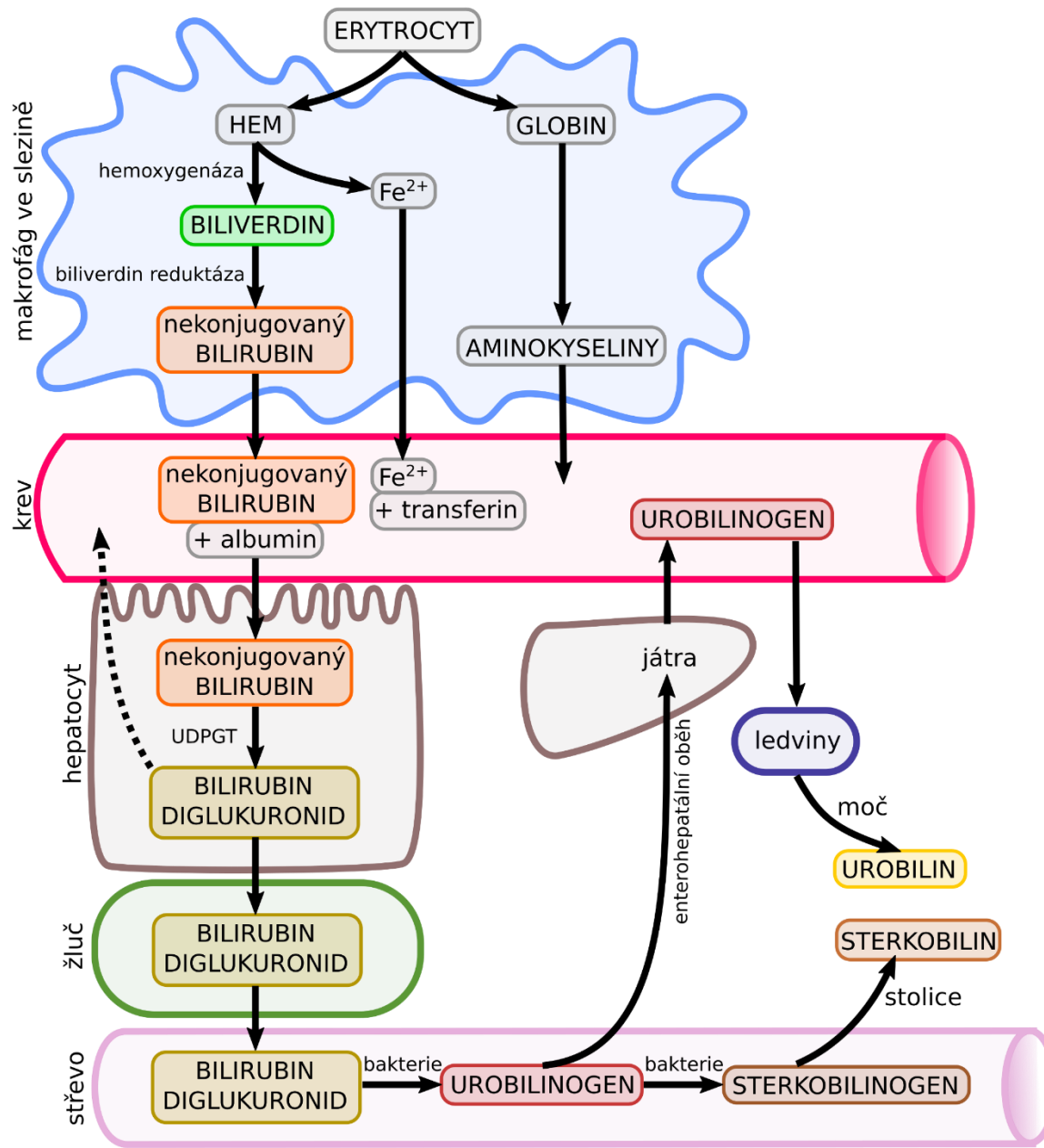
# Bilirubin



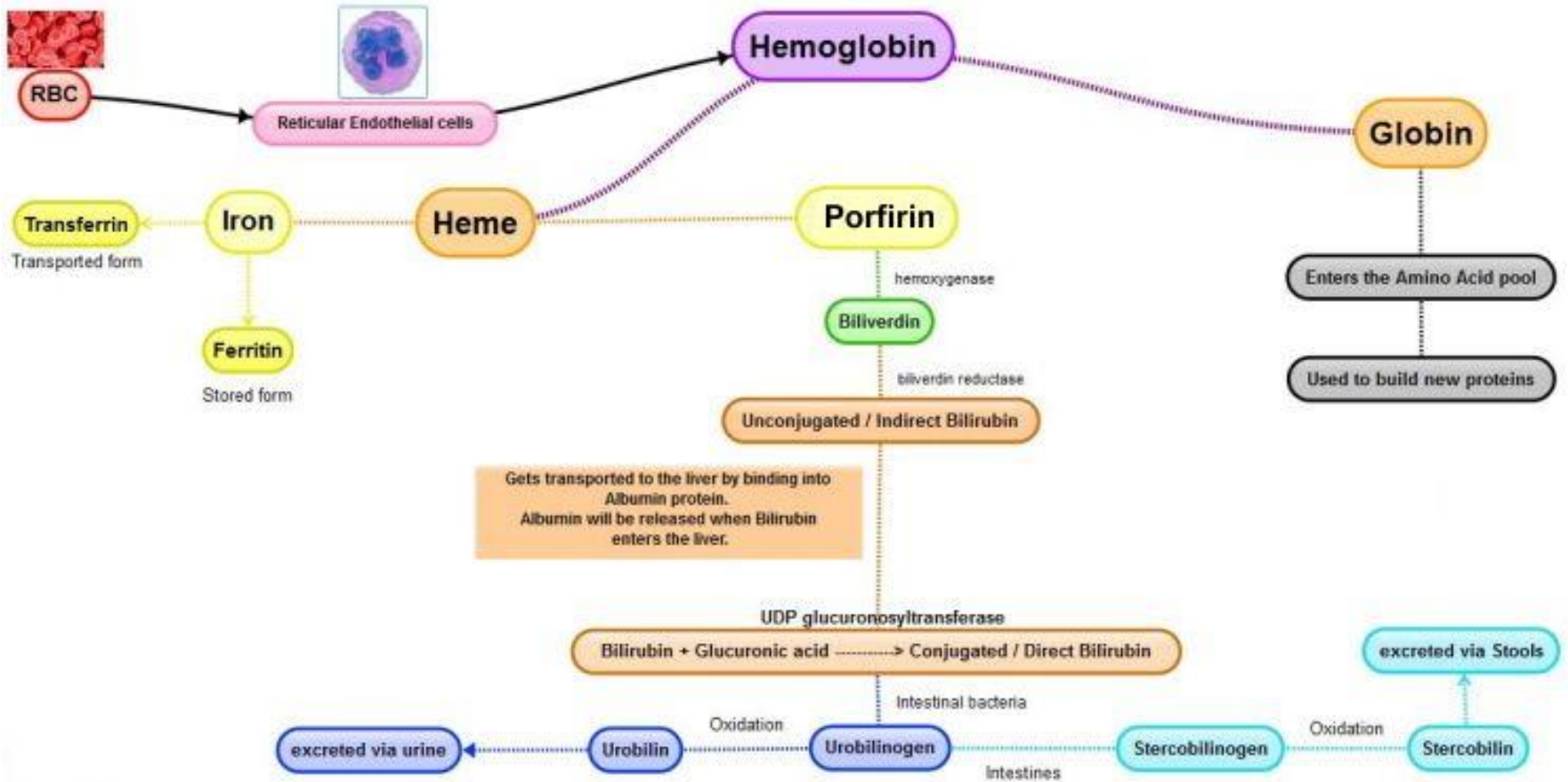
- Lineární tetrapyrrolové barvivo, hydrofobní charakter
- Přirozené žluté barvivo
- Není jednotná látka - řada tetrapyrrolů
- Žlučové barvivo, nadbytek → žluté zbarvení sliznic a kůže – žloutenka (ikterus)
- Produkt katabolismu hemoproteinů (hemoglobin, myoglobin, katalasa, cytochromy)
- Většina (85%) vzniká z uvolněného hemoglobinu při rozpadu erytrocytů
- V krvi většina bilirubinu vázána na albumin

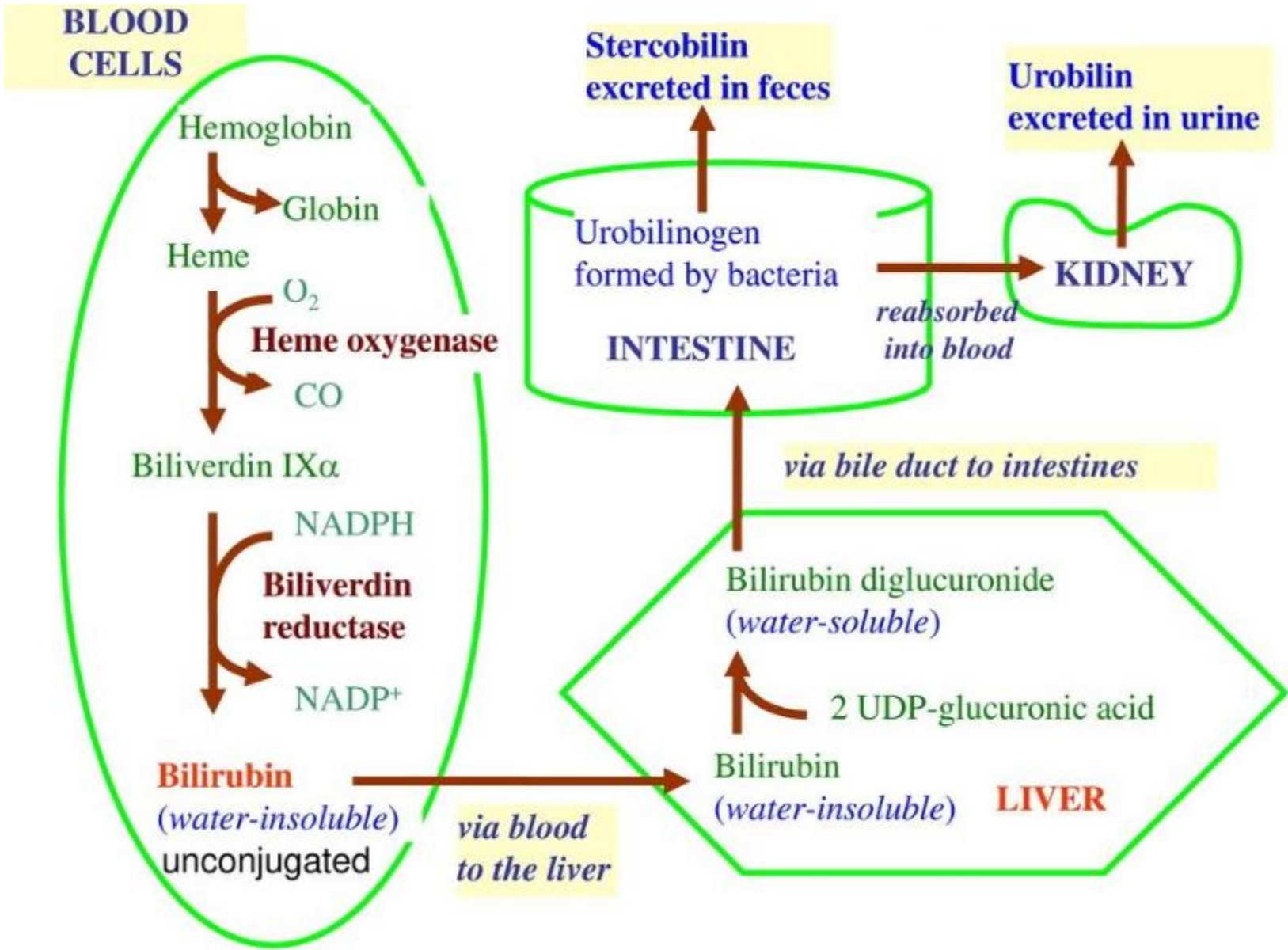
# Odbourávání Hb

- Retikuloendotelový systém (RES): játra, slezina, kostní dřeň
- Životnost erytrocytů 120 dní
- Rozpad ery → uvolnění Hb → hem → biliverdin → nekoj. bilirubin → konj. bilirubin (játra) → žluč → urobilinogen (střevo) → sterkobilin (stolice) / urobilin (moč)
  
- Degradace hemu:
- Biliverdin (zelený) → nepřímý bilirubin (žlutý), ve vodě nerozpustný
- Bilirubin vázaný na albumin transportován do jater
- V játrech extrahován hepatocyty, uvolnění vazby na albumin, vazba na kyselinu glukuronovou – stává se ve vodě rozpustným
- Konjugovaný bilirubin vylučován žlučovými cestami do tenkého střeva
- Ve střevě redukce na bezbarvé urobilinogeny, které se dále přeměňují na další barevné produkty urobiliny, sterkobiliny (oranžová barviva)
- **Část vstřebána zpět do jater (enterohepatální oběh), část vylučována močí a stolicí**
- **U zdravého člověka se močí žádný bilirubin nevylučuje**

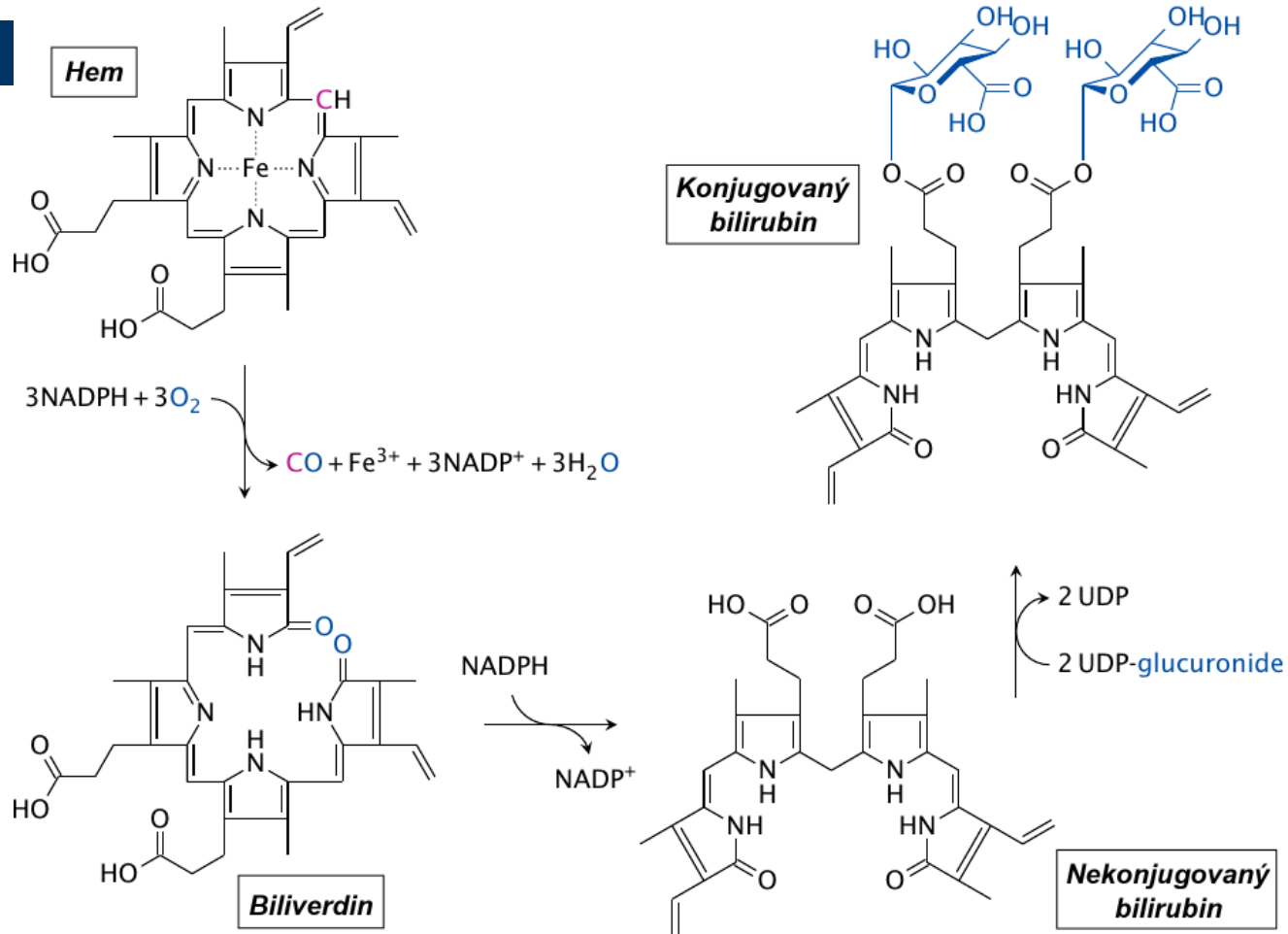




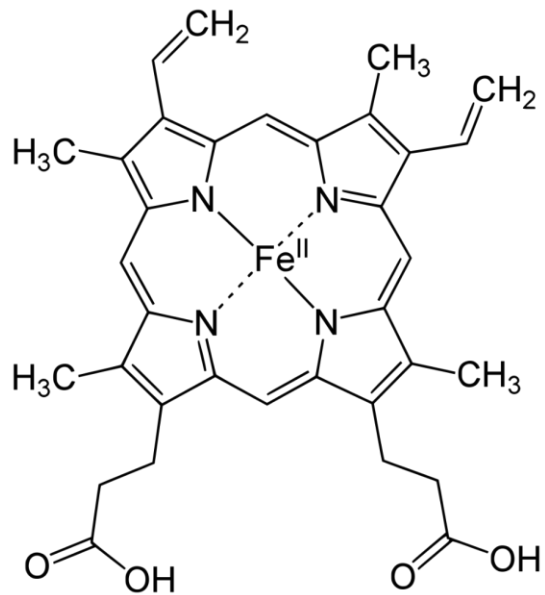




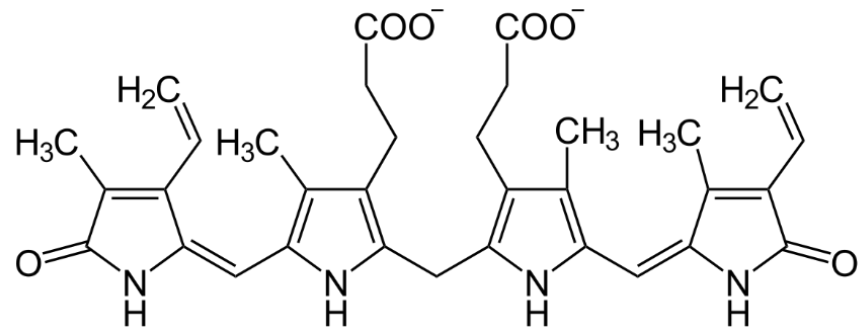
# Konverze hemu na biliverdin a redukce biliverdinu na bilirubin



# Hemová skupina, bilirubin



**hem**



**bilirubin**

# Bilirubin- přímý a nepřímý

- Bilirubin přímý
  - Dává po přidání směsi diazočinidel k séru přímo zbarvení
  - Přímý odpovídá bilirubinu konjugovanému - podíl, který již prošel játry, kde byl konjugován s kys. glukuronovou
- Bilirubin nepřímý
  - Nerozpustný ve vodě, vázaný na albumin, dosud játry neprošel
  - Nekonjugovaný, je třeba uvolnit z vazby na albumin (kofeinu, benzoátu sodného)
  - Toxicita – proniká do lipofilní tkáně, včetně CNS

Sérum nutno **chránit před přímým světlem** – pokles

# Hyperbilirubinemie

- Poškození jat. buněk (toxiny, alkohol, viry)
- Hemolytické procesy
- Dědičné poruchy (např. Gilbertův syndrom)
- Ikterus

# Ikterus (hyperbilirubinemie)

- **Prehepatální (hemolytická) žloutenka**
  - Zvýšený rozpad erytrocytů
  - ↑ nepřímý bilirubin v séru
  - Negativní nález v moči
  - Hemolytická anemie, novorozenecká žloutenka, Rh inkompatibilita matky a plodu
- **Hepatální (jaterní) žloutenka**
  - Poškozené hepatocyty (alkoholem, toxiny, viry)
  - ↑ celkový, konj. bilirubin v séru
  - Pozitivní nález v moči
- **Posthepatální (obstrukční) žloutenka**
  - Uzávěr žlučových cest (litiáza, nádor...)
  - ↑ celkový, konj. bilirubin v séru
  - Pozitivní nález v moči
  - Úplná obstrukce → přerušení odtoku žluči → absence degradačních produktů bilirubinu → acholická stolice (šedo-bílá)

# Referenční hodnoty

- Bilirubin celkový S/P:
  - dospělí do 20 umol/l**
  - novorozenci 1den do 100 umol/l
  - novorozenci 2dny do 120 umol/l
  - novorozenci 3dny do 205 umol/l
- Bilirubin přímý S/P:
  - dospělí do 5 umol/l**
- U 0 arb. jednotek



# Bilirubin

- Doporučená rutinní metoda: Jendrassik – Gróf, **fotometrické metody s DCA a DPD**
- Referenční metoda: Doumas – Perry

# Stanovení bilirubinu - historie

Reakce bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou – Ehrlich v r. 1883 - současné metody z reakce vychází

# Stanovení bilirubinu

## **Metoda Doumase - Perry (r. 1985):**

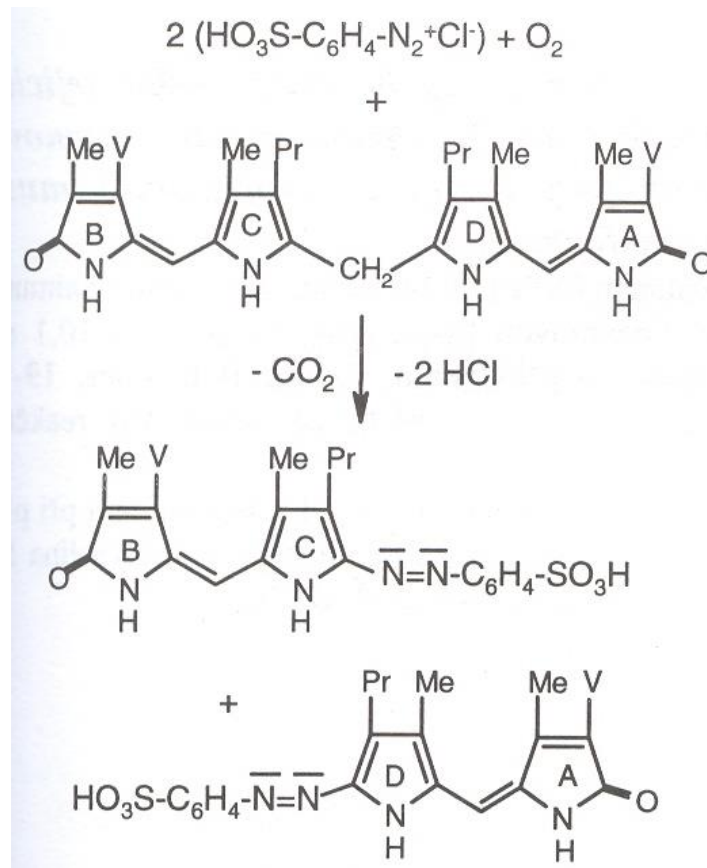
- Vychází z metody Jendrassik – Gróf, všechny kroky optimalizovány a specifikovány

# Stanovení bilirubinu celkového a přímého s diazotovanou kyselinou sulfanilovou

## Metoda Jendrassik – Gróf ( r. 1938):

- Azokopulační metoda
- Přidat diazotovanou kyselinu sulfanilovou (činidlo z dusitanu sodného a kyseliny sulfanilové)
- Vznik červeně zbarveného azobilirubinu s abs. max. 440 nm (interferuje hemolýza)
- Modrá forma azobilirubinu – po 10 minutách k reakci přidat NaOH a vínan sodno-draselný - 600 nm, hemolýza nevadí
- Celkový bilirubin - po přidavku akcelerátoru - kofein + benzoát (Při stanovení bilirubinu konjugovaného se tento krok vynechá)
- Při stanovení přímého bilirubinu reakci zastavit kyselinou askorbovou

# Kopulace bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou - tvorba azobilirubinu



# Stanovení bilirubinu celkového s DPD

- Celkový bilirubin v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla kopuluje s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí
- Rychlá reakce dichlorofenyldiazonium tetrafluoroborátu (DPD) s bilirubinem - tvorba azobilirubinu

kyselina

Bilirubin + diazoniový iont -----> azobilirubin

- Intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná celkovému bilirubinu a může být stanovena fotometricky
- **V praxi nejrozšířenější metoda**
- Hemolýza ruší až od vysokých koncentrací hemoglobinu

# Stanovení bilirubinu

Enzymové stanovení bilirubinu přes biliverdin:

- Oxidace bilirubinu kyslíkem na zelený biliverdin – s bilirubinoxidasou
- Měří se pokles absorbance – 424 - 465 nm
- Běžně se nepoužívá

Stanovení bilirubinu přímou spektrofotometrií u novorozenců:

- Absorbance se měří při 454 nm
- Metoda nelze použít u starších - přítomnost karotenu a jiných pigmentů