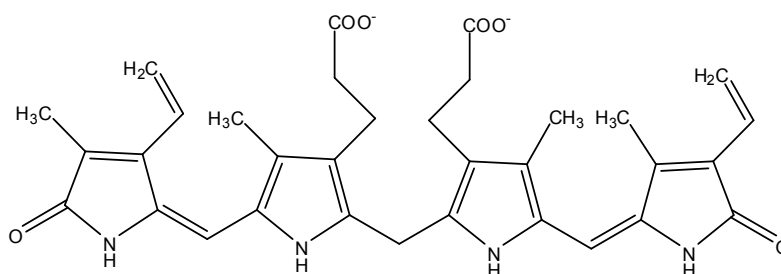


Oznaczanie bilirubiny całkowitej w płynach ustrojowych metodą utleniania z użyciem wanadanu jako czynnika utleniającego

Wprowadzenie

Bilirubina jest organicznym związkiem chemicznym, żółtym barwnikiem – produktem degradacji części porfirynewej hemu (część białkowa – globina – degradowana jest do pojedynczych aminokwasów, atom żelaza zostaje włączony do ogólnej puli żelaza organizmu, a hem ulega przekształceniu w linearną cząsteczkę – biliwerdynę, redukowaną z kolei do bilirubiny) uwolnionego wcześniej z hemoglobiny w śledzionie, wątrobie lub szpiku kostnym.



Dla celów klinicznych bilirubinę wyraża się jako dwie frakcje: związaną i wolną. W hepatocytach bilirubina jest enzymatycznie związana z dwoma resztami kwasu glikuronowego tworząc ester. Taką formę bilirubiny nazywa się bezpośrednią lub inaczej związaną, cholebilirubiną, bilirubiną A. Nie łączy się ona z białkami krwi, dzięki czemu z łatwością przedostaje się do moczu, jest rozpuszczalna w wodzie. Wydzielana przez wątrobę do żółci bilirubina przedostaje się do jelita, gdzie ulega przemianie pod wpływem enzymów i bakterii jelitowych w urobilinogen, a następnie w barwnik urobilinę.

Bilirubina niezmodyfikowana kwasem glukuronowym wiąże się z albuminą i jest określana jako pośrednia lub też wolna, hemobilirubina, bilirubina B. Oblicza się ją jako różnicę bilirubiny całkowitej i bezpośredniej. Jest ona nierozpuszczalna w wodzie, w tej postaci nie może przeniknąć do kłębuszków nerkowych i przedostać się do moczu. Może za to przenikać przez barierę krew-mózg i w dużych stężeniach działać neurotoksycznie. Po dostaniu się do komórek wątrobowych bilirubina pośrednia jest dwukrotnie sprzęgana z kwasem glukuronowym. Przez to traci zdolność przenikania bariery krew-mózg i przestaje być związkiem neurotoksycznym.

Prawidłowy poziom bilirubiny całkowitej w surowicy krwi człowieka wynosi 0,3–1,0 mg/dl lub 5,1–17,0 μmol/l. Po przekroczeniu stężenia 2-2,5 mg/100 ml krwi,

bilirubina dyfunduje do tkanek, powodując ich żółknięcie (żółtaczka). Zwiększenie stężenia bilirubiny w osoczu określa się jako hiperbilirubinemię - może być ona spowodowana zwiększonym wytwarzaniem bilirubiny w wyniku żółtaczki mechanicznej, zespołu Dubina-Jonsona, schorzenia dróg żółciowych czy pęcherzyka żółciowego lub też niezdolnością wydzielania bilirubiny powstającej w prawidłowych ilościach przez uszkodzoną wątrobę.

Bilirubina została w ostatnich latach po raz pierwszy odkryta u pozbawionych krwi roślin, gdzie bilirubina nie jest produktem rozkładu hemoglobiny, lecz chlorofilu. Dzieje się tak, gdyż oba barwniki mają podobną budowę. Odkrycia dokonano dopiero teraz, pomimo że rośliny z rodziny strelcjomatych są bardzo popularne.



Owoce strelciji

© Sebastian Stabinger, GNU FDL

Okazało się, że cechy intensywnie pomarańczowego barwnika meszku na owocach strelciji (*Strelitzia nicolai*) (skórzasty pękający owoc osiąga rozmiary grochu) nie pasują do właściwości chemicznych znanych pigmentów roślinnych. Pochłaniał on promieniowanie o długości fali innej niż w przypadku karotenoidów, poza tym w nietypowy sposób reagował z rozpuszczalnikami polarnymi i niepolarnymi. Strukturę bilirubiny potwierdzono badaniami NMR. Obecnie biochemicy badają poszczególne etapy rozkładu chlorofilu do bilirubiny. [Źródło: [Science](#)]

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości bilirubiny całkowitej w płynach ustrojowych metodą spektrofotometryczną z udziałem metawanadanu sodu.

Bilirubina całkowita w obecności soli kwasu wanadowego i detergentu jest w środowisku kwaśnym utleniana do barwnej biliwerdyny. Rozpuszczalny w wodzie glukuronian bilirubiny wchodzi w reakcję bezpośrednio, natomiast bilirubina związana z albuminą wymaga wcześniejszej hydrolizy pod wpływem detergentów. Reakcja utleniania powoduje

zmianę żółtego zabarwienia charakterystycznego dla bilirubiny, do barwy zielonej charakterystycznej dla biliwerdyny. Intensywność zabarwienia powstałej pochodnej, mierzona przy długości fali 420 nm, jest proporcjonalna do stężenia bilirubiny całkowitej w badanej próbce.

Sprzęt i materiały:

- Roztwór wzorcowy bilirubiny CORMAY MULTICALIBRATOR LEVEL 1 o stężeniu podanym przez prowadzącego,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia bilirubiny całkowitej *Lquick Cor-BIL TOTAL* składa się z dwóch oddzielnych odczynników *1-BIL TOTAL* i *2- BIL TOTAL*. Skład i stężenie składników w zestawie :

1-BIL TOTAL

- Bufor cytrynianowy (pH 2,8) 90 mmol/l
- detergent

2- BIL TOTAL

- bufor fosforanowy (pH 7,0) 4,6 mmol/l
- metawanadan sodu 3,0 mmol/l

- 6 ciemnych probówek typu eppendorf,
- pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 kuweta polistyrenowa do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- termostat,
- Spektrofotometr UV-Vis SP-830 *PLUS*.

Bilirubina jest wrażliwa na światło (ulega fotooksydacji), dlatego próbki należy chronić przed światłem zarówno słonecznym, jak i sztucznym.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-BIL TOTAL. Ogrzać do temperatury oznaczenia 37°C. Następnie dodać 100 µl roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i inkubować 2 min. w temp. 37°C. Następnie przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Odczytać absorbancję A₁ prób wzorcowych przy długości fali 420 nm względem powietrza. Po pomiarze dokładnie całą zawartość przenieść do eppendorfa. Pomiar wykonać trzykrotnie.

2. Próba badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-BIL TOTAL. Ogrzać do temperatury oznaczenia 37°C. Następnie dodać 100 µl roztworu badanego (surowicy). Dokładnie wymieszać i inkubować 2 min. w temp. 37°C. Następnie przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Odczytać absorbancję A1 prób badanych przy długości fali 420 nm względem powietrza. Po pomiarze dokładnie całą zawartość przenieść do eppendorfa.
3. Do eppendorfów z próbami wzorcowymi i badanymi dodać 200 µl odczynnika do oznaczeń 2-BIL TOTAL.
4. Próba wzorcowa: Po dodaniu odczynnika do oznaczeń 2-BIL TOTAL zawartość dokładnie wymieszać i po 10 minutach inkubacji w temperaturze 37°C odczytać absorbancję A2 prób wzorcowych wobec powietrza przy tej samej długości fali. Zabarwienie jest stabilne przez 30 min. Obliczyć $\Delta A = A1 - A2$. Pomiar wykonać trzykrotnie.
5. Próba badana: Po dodaniu odczynnika do oznaczeń 2-BIL TOTAL zawartość dokładnie wymieszać i po 10 minutach inkubacji w temperaturze 37°C odczytać absorbancję A2 prób badanych wobec powietrza przy tej samej długości fali. Zabarwienie jest stabilne przez 30 min. Obliczyć $\Delta A = A1 - A2$. Pomiar wykonać trzykrotnie.

Składnik próbki \ Próba	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
1-BIL TOTAL	1000µl	1000µl
Multikalibrator	100µl	---
Roztwór badany	---	100µl
Dokładnie wymieszać i po 2 min. inkubacji w temp. 37°C odczytać absorbancję A1 prób wzorcowych (PW) i badanych (PB). Następnie dodać:		
2-BIL TOTAL	200µl	200µl
Dobrze wymieszać i dokładnie po 10 min. inkubacji w temp. 37°C przenieść 800 µl roztworu do kuwetki i odczytać absorbancję A2 próby wzorcowej(PW) i badanej (PB) wobec powietrza przy długości fali 420 nm. Pomiar wykonać trzykrotnie.		

Opracowanie wyników:

- Obliczyć $\Delta A = A1 - A2$ dla obydwu prób;

- Obliczyć stężenie bilirubiny całkowitej w badanej próbce korzystając ze wzoru:
Stężenie bilirubiny całkowitej = $\Delta A(\text{PB}) / \Delta A(\text{PW}) \times \text{stężenie kalibratora}$

Wartości prawidłowe (surowica):

dorośli 0,3-1,2 mg/dl (5-21 $\mu\text{mol/l}$)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość bilirubiny całkowitej w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. Bilirubina (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi bilirubiny w organizmie, metody oznaczania bilirubiny we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.