

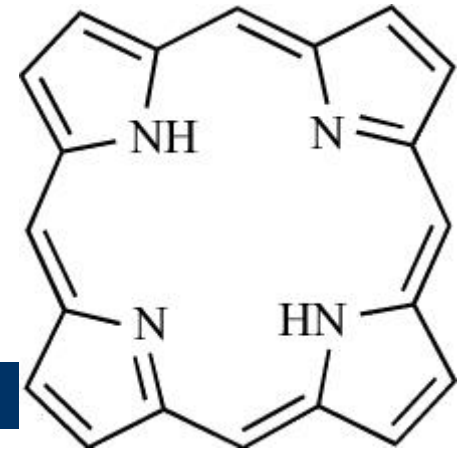
Krevní barviva – porfyriny, hemoglobin, bilirubin

Mgr. Zuzana Stražilová



Porfyriny

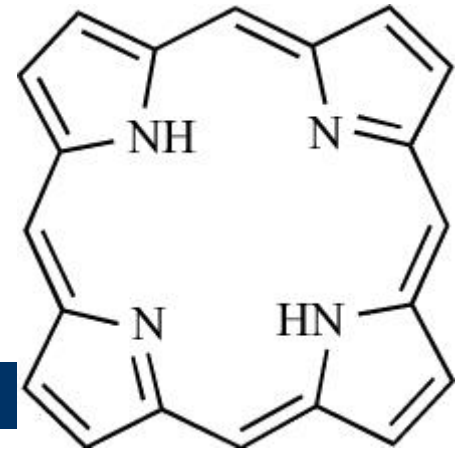
Porfyriny



- prekurzory hemu
- tetrapyrolové 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

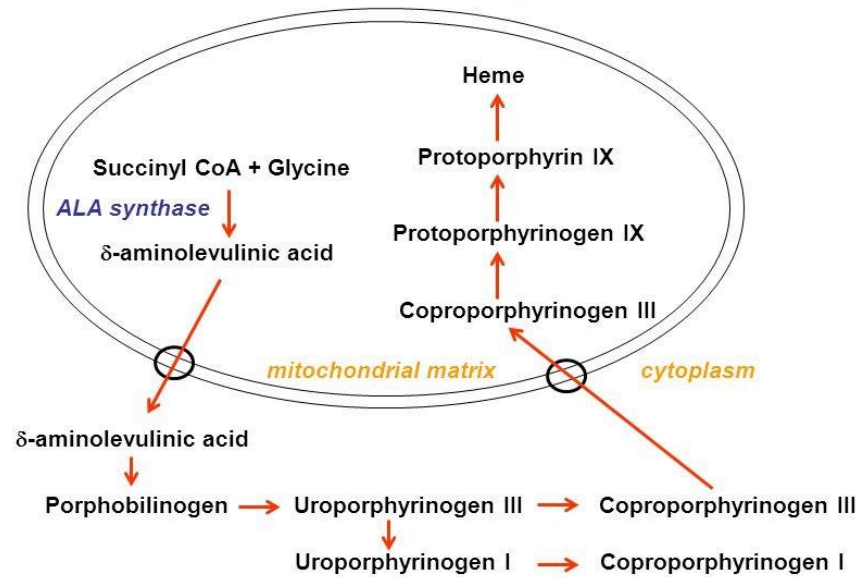
Porfyriny



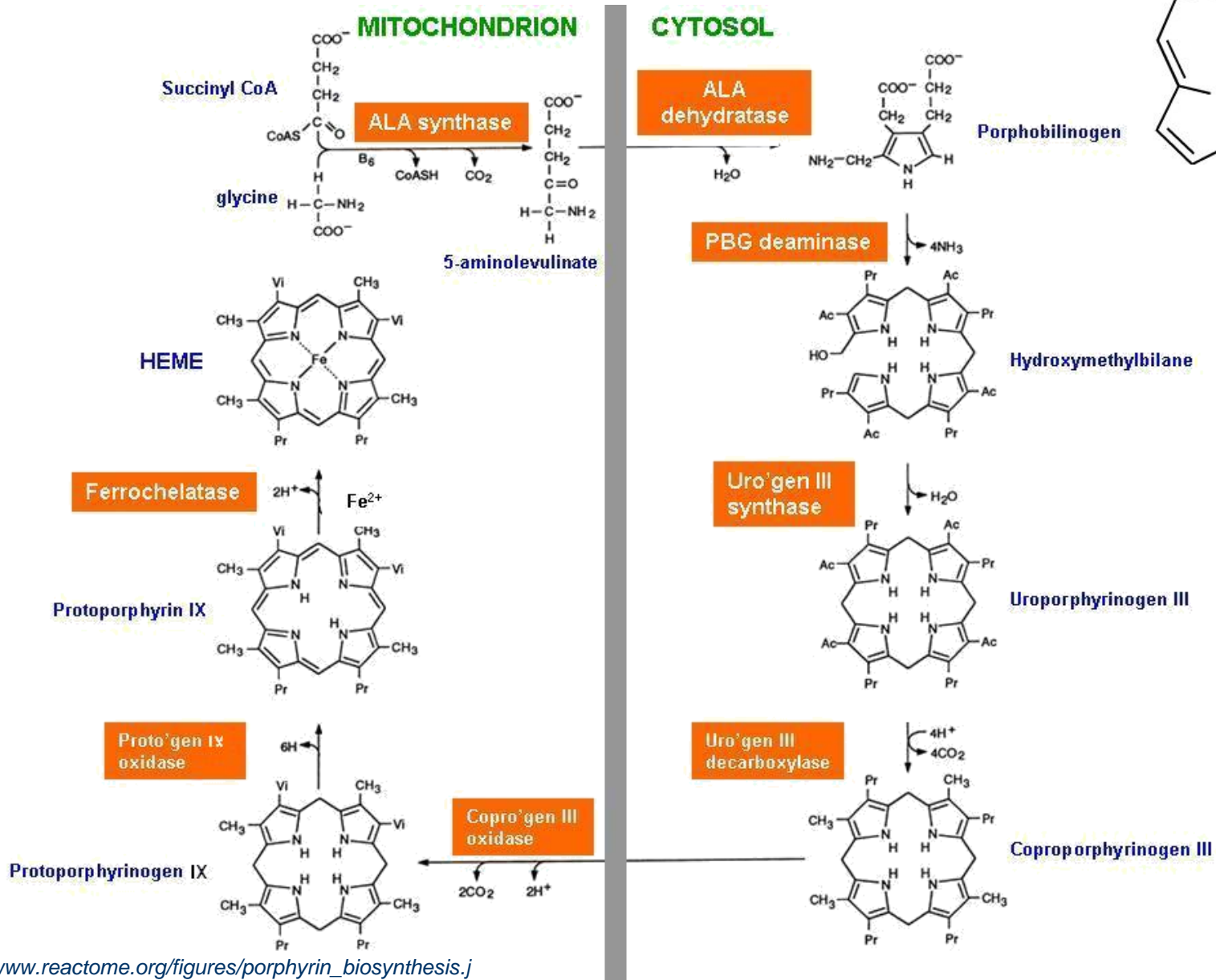
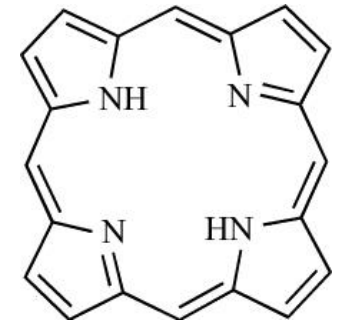
- Porfyriny - tetrapyroly, prekurzory hemu
- Vznikají řadou na sebe navazujících reakcí
- Důležité 2 enzymy:
 - **syntáza kyseliny 5 – aminolevulové**
tvorba kyseliny 5 - aminolevulové (ALA) z glycinu a sukcinátu
 - **porfobilinogensyntáza**
vznik porfobilinogenu z 2 molekul ALA
- *Glycin + sukcinylkoenzym 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 δ – 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

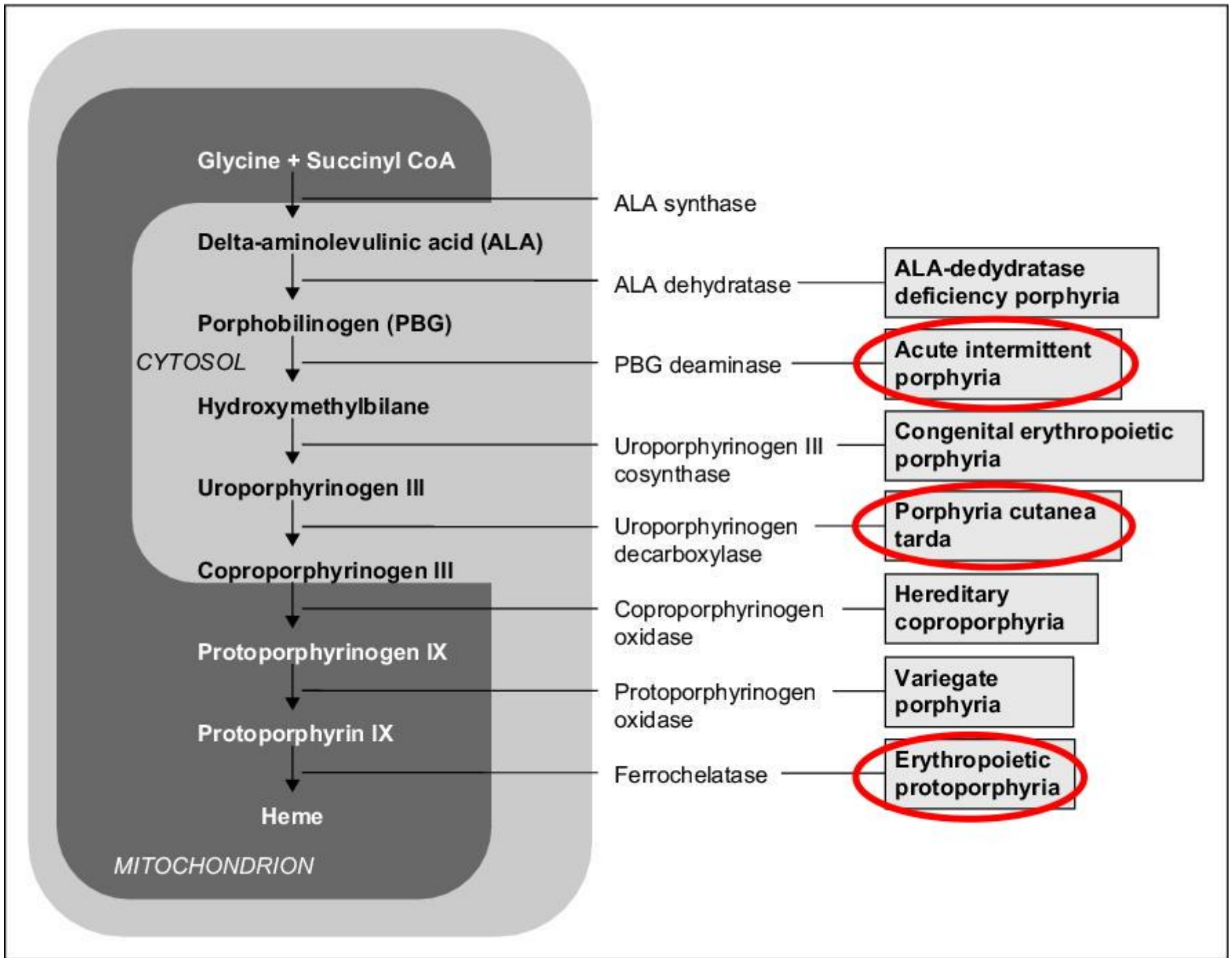
- porucha přeměny porfobilinogenu a porucha metabolismu steroidů v játrech (hromadí se a indukují tvorbu syntázy ALA)

Celá řada dalších typů porfyrií

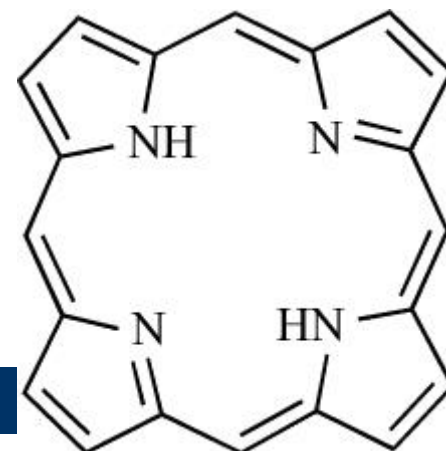
Rozlišení typů - analýza porfyrinů nejčastěji v moči

- zřídka v plasmě, erytrocytech a stolici

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



Stanovení porfyrinů



- Konjugované dvojné 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)

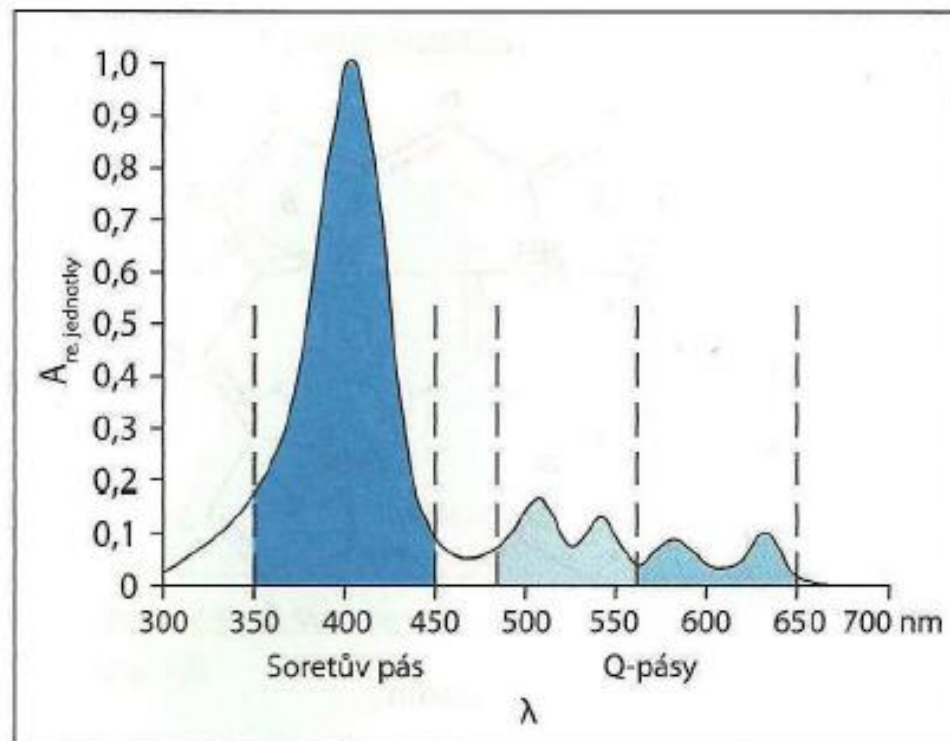
Stanovení celkových porfyrinů:

- **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:

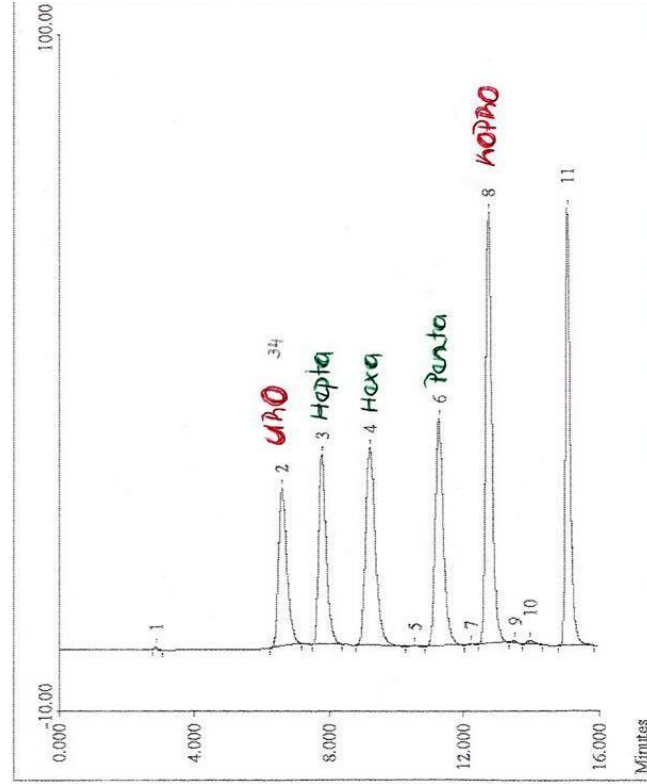
- V kyselém prostředí po ozáření UV světlem (400 nm) silně fluoreskují v červené oblasti (550-650 nm)
- Okyselená moč **metodou HPLC** na reverzní fázi s použitím fluorescenčního detektoru (fosf. pufr, metanol)
- Materiál – sbíraná moč za 24 hod, konzervovaná Na_2CO_3
Nutno **chránit před světlem**
- **Referenční rozmezí**
 - Uroporfyrin : do 0,050 μmol / 24 hod
 - Koproporfyrin : do 0,280 μmol / 24 hod
 - Heptaporfyrin : do 0,014 μmol / 24 hod
 - Hexaporfyrin : do 0,006 μmol / 24 hod
 - Pentaporfyrin : do 0,005 μmol / 24 hod

Stanovení celkových porfyrinů



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

Chromatogram s píky jednotlivých porfyrinů



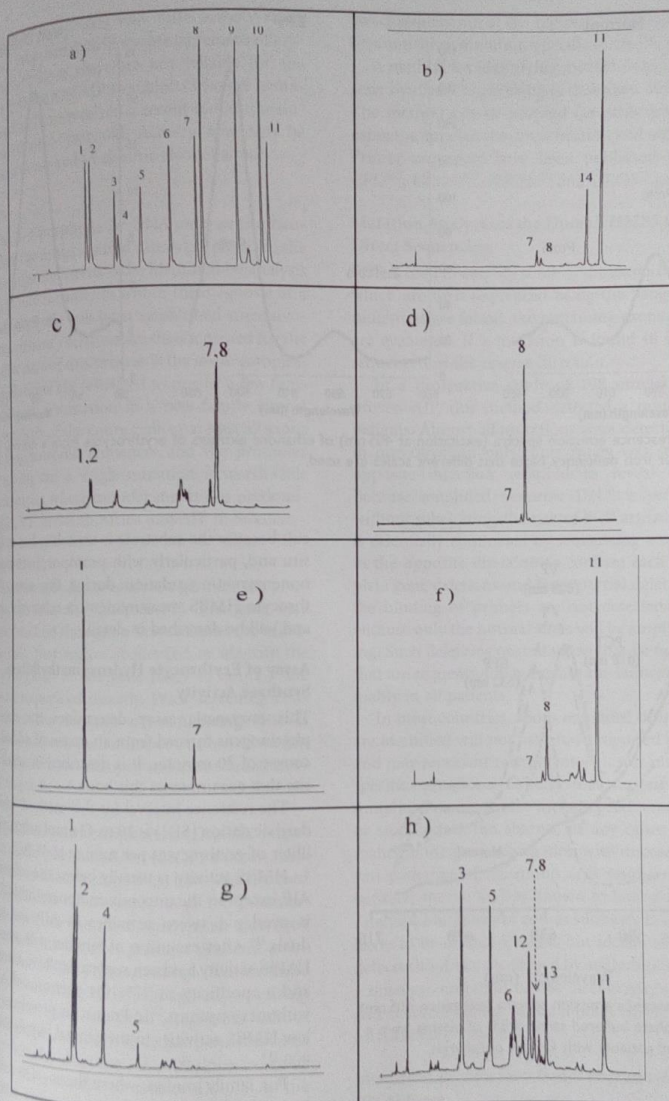


Figure 32-14 Representative HPLC chromatograms for (a) working standard; b, normal feces; c, normal urine; d, feces—hereditary erythropoietic porphyria; e, urine—congenital erythropoietic porphyria; f, feces—variegata porphyria; g, urine—porphyria cutanea tarda; h, urine—porphyria cutanea tarda chromatographic 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 $\mu\text{mol/l}$

A decorative graphic on the left side of the slide, consisting of a light green vertical bar and a dark blue horizontal bar with rounded ends.

Hemoglobin

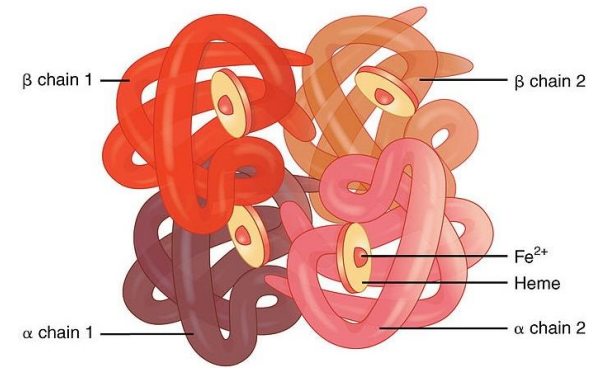
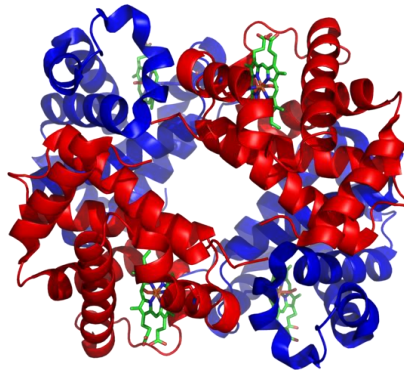
Hemoglobin

- 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:

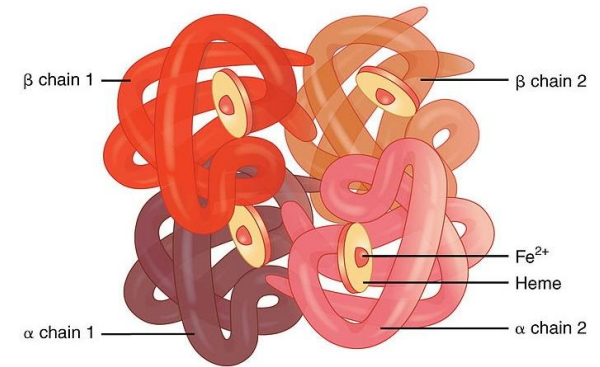
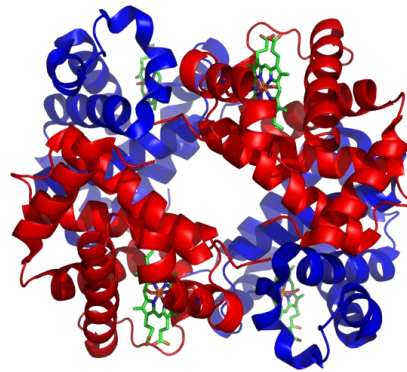
B	P	U
ženy: 120-165 g/l muži: 130-175 g/l	Do 50 mg/l >300mg/l intravaskulární hemolýza	0 arb.j.

Hemoglobin



- **Tetramer** – podjednotky spojeny H-můstky a iontovými vazbami
- Každá podjednotka složena z proteinové části – **globinu** a prostetické skupiny – **hemu** s centrálním kationtem **Fe²⁺** (pevně vázán koordinálně kovalentními vazbami)
- Patří mezi konjugované bílkoviny - spojením bílkoviny s organickým komplexem obsahujícím kov
- Hemoglobin **tvořen z hemu** (protoporfyrin IX s navázaným Fe²⁺) a bílkoviny **globinu**
- Globin je tvořen 4 polypeptidickými řetězci: např. dvěma řetězci α a dvěma řetězci β
- 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. 2α a 2β), 4 hemy, 4 Fe

Hemoglobin



- několik typů molekul Hb – rozlišujeme podle globinových řetězců (α , β , γ , δ , ϵ a ζ):

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 (HbCO₂)** – fyziologický komplex s oxidem uhličitým (CO_2 navázaný přes $-NH_2$ konec β 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 interstinální 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 α či β 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)

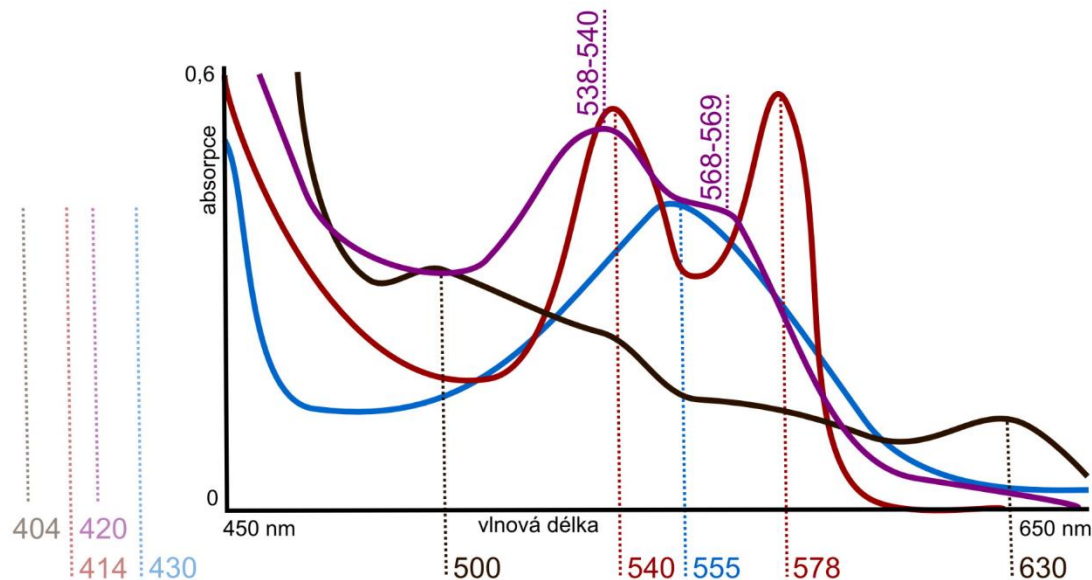
Talasémie:

- Dědičné poruchy - změna poměru syntézy jednoho či druhého globinového řetězce
- α -talasémie (Afrika, jihovýchodní Asie) – redukce α řetězců
- β -talasémie (Středomoří, Indie, jižní Čína) – redukce β 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 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 přidavkem 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 – viz. screeningová stanovení

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

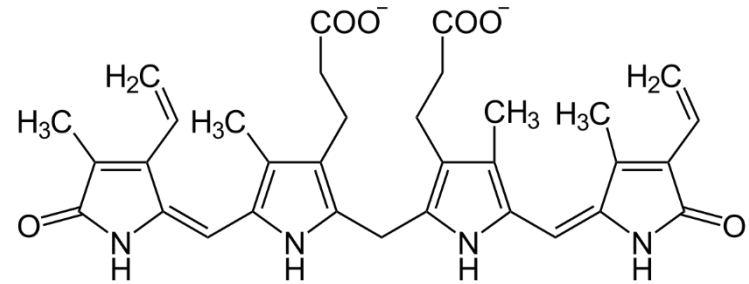
Metoda na automatickém analyzátoru:

- 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

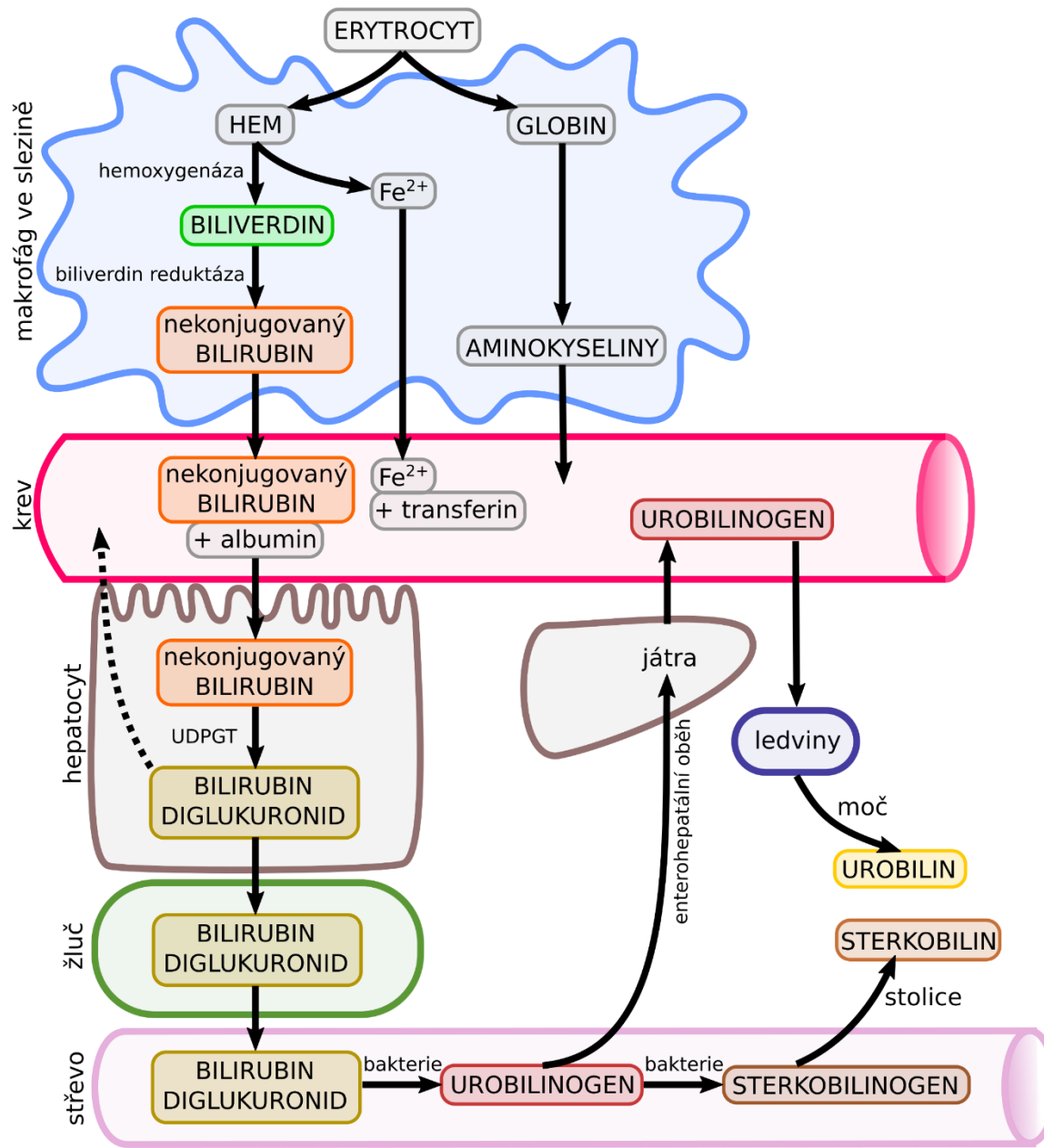


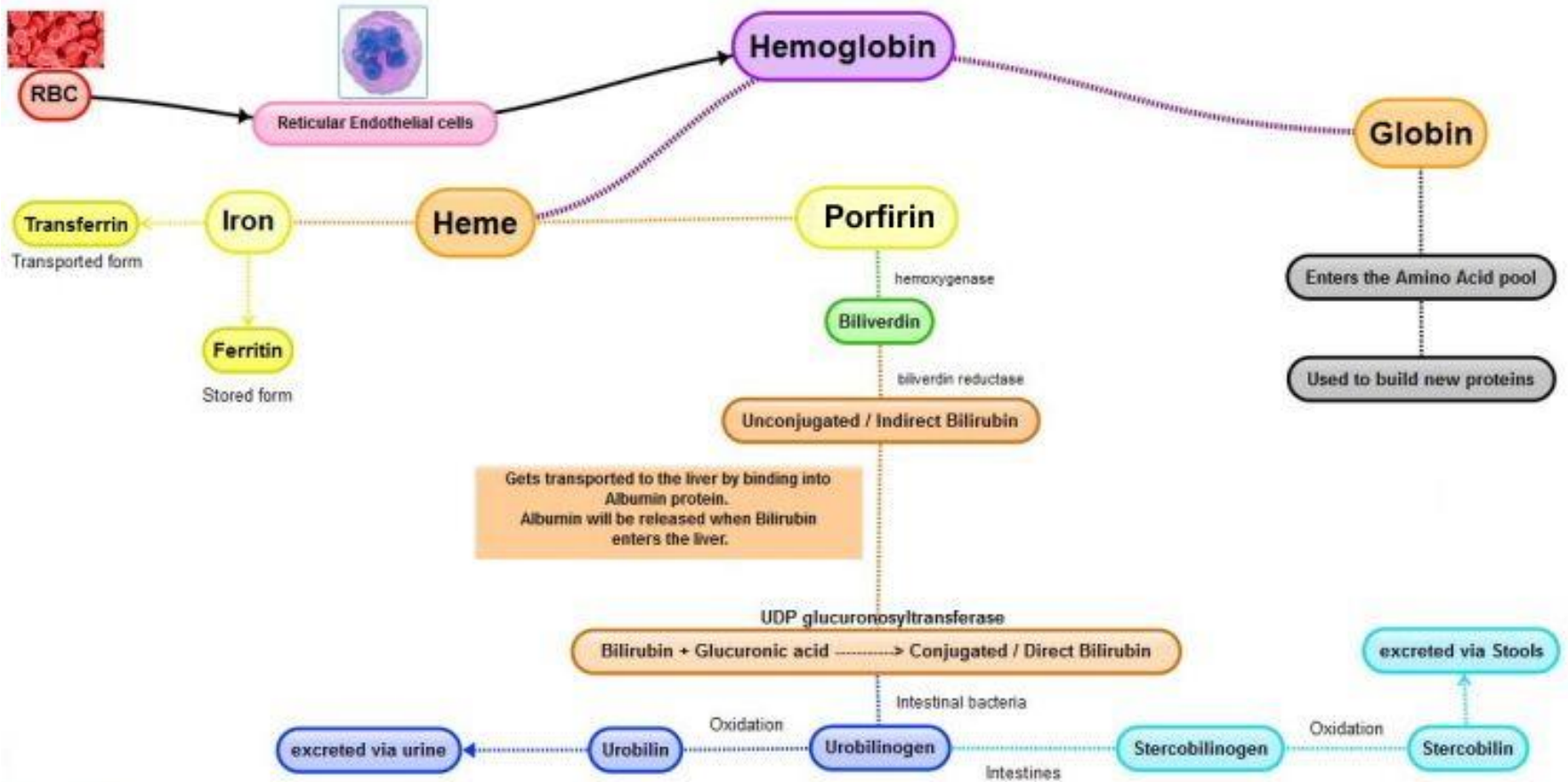
- Lineární tetrapyrrolové barvivo, hydrofobní charakter
- Přirozené žluté barvivo
- Není jednotná látka - řada tetrapyrrolů
- Žlučové barvivo, nadbytek → žluté zbarvení sliznic a kůže – žloutenka (ikterus)
- Produkt katabolismu hemoproteinů (hemoglobin, myoglobin, katalasa, cytochromy)
- Většina (85%)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

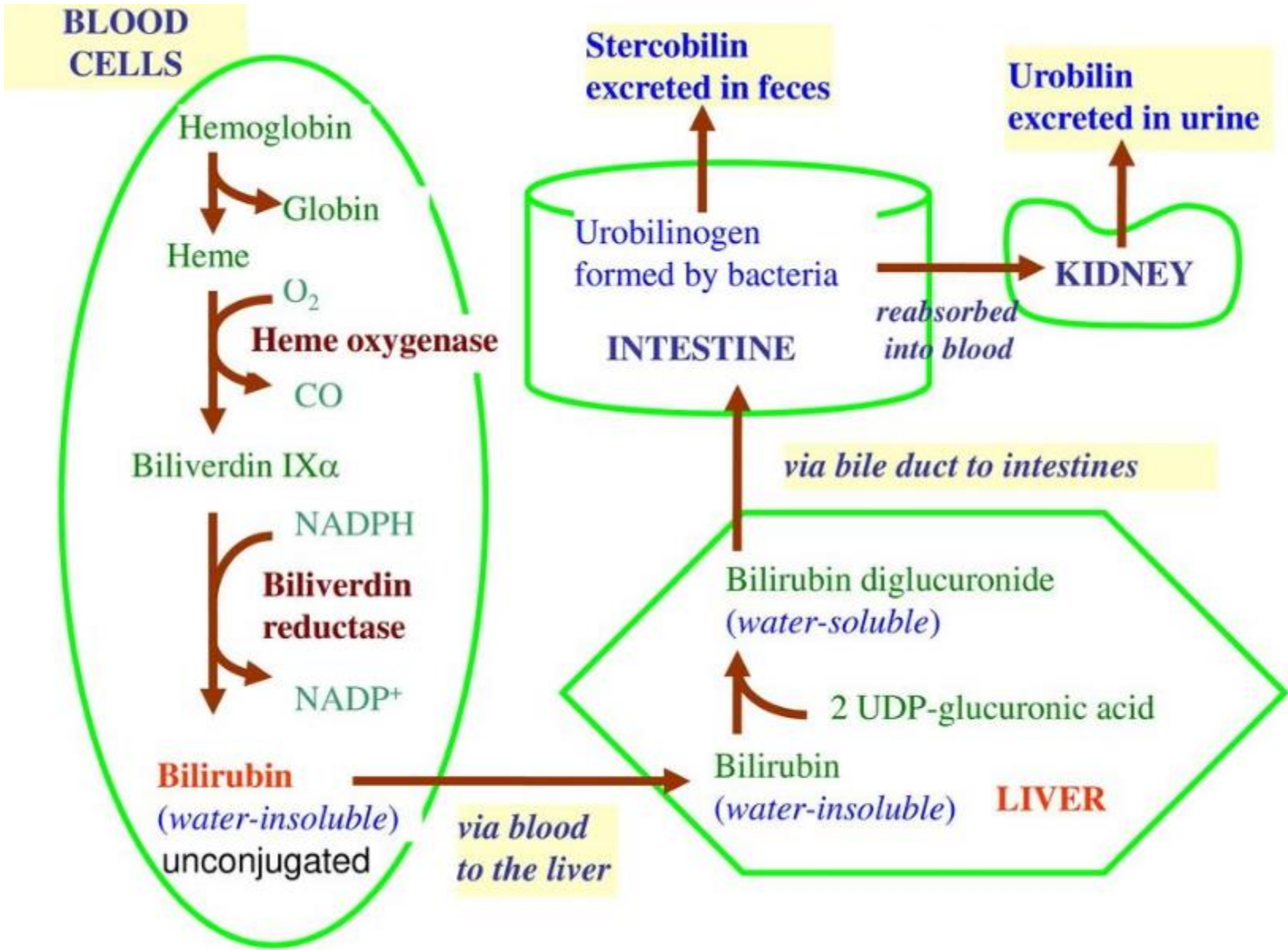
Odbourávání Hb

- 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)

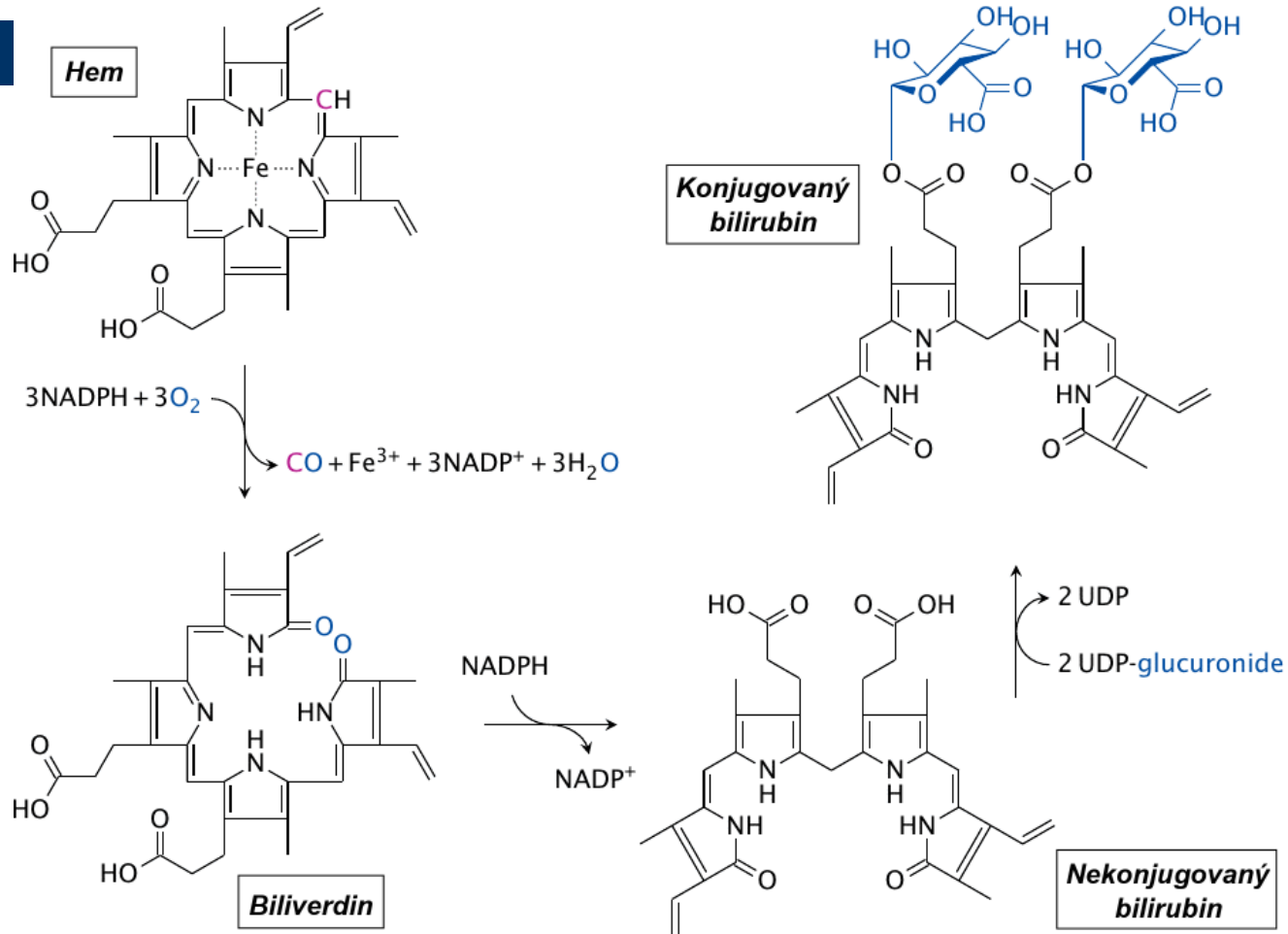
- Degradace hemu:
- Biliverdin (zelený) → nepřímý bilirubin (žlutý), ve vodě nerozpustný
- Bilirubin vázaný na albumin transportován do jater
- V játrech extrahován hepatocyty, uvolnění vazby na albumin, vazba na kyselinu glukuronovou – stává se ve vodě rozpustným
- Konjugovaný bilirubin vylučován žlučovými 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**



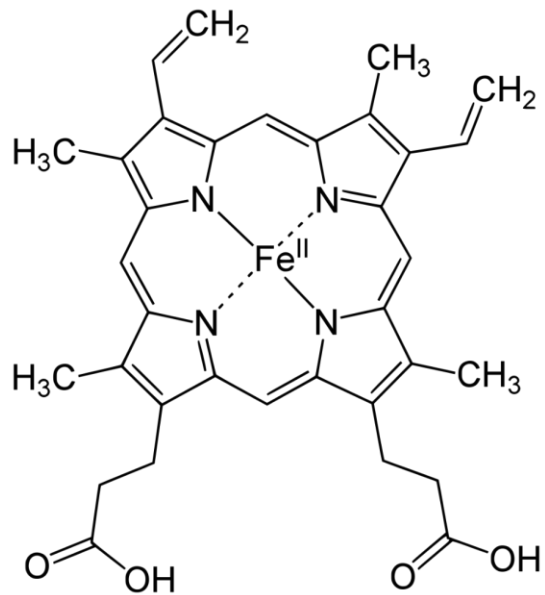




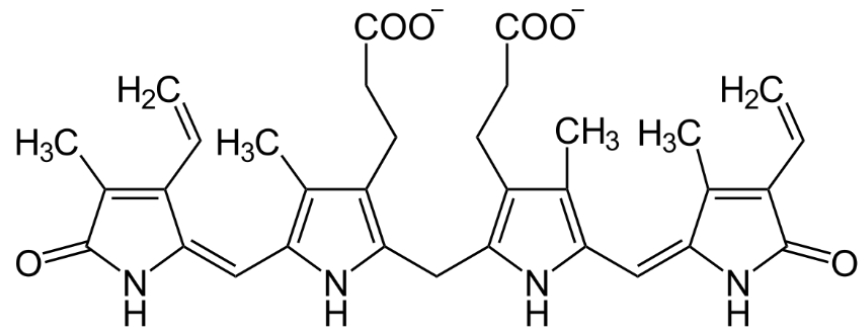
Konverze hemu na biliverdin a redukce biliverdinu na bilirubin



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

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):

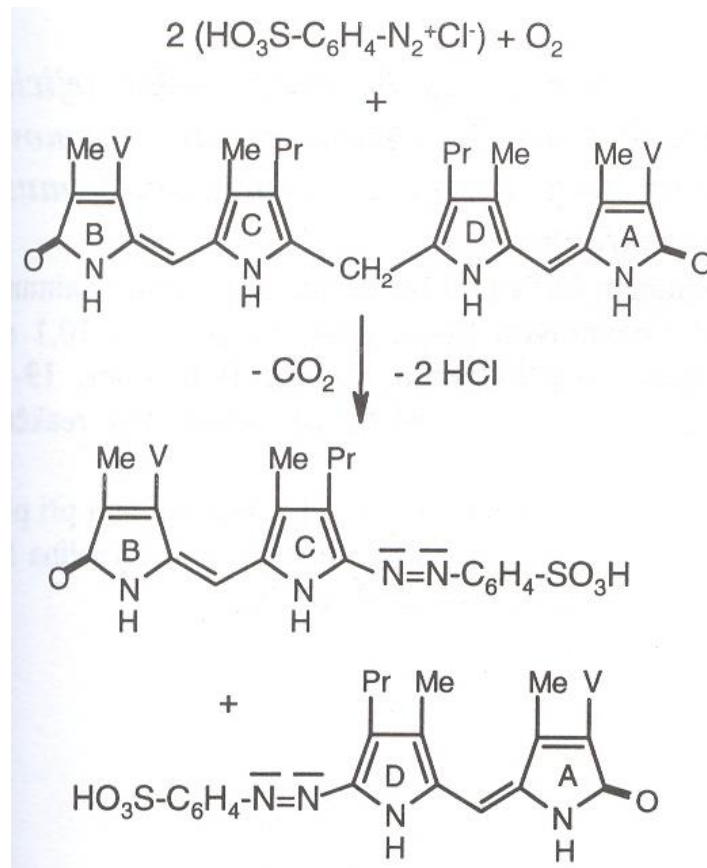
- Vychází z metody Jendrassik – Gróf, všechny kroky optimalizovány a specifikovány

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

Interpretace biochemických nálezů

- Kámen žlučníku
- Jaterní selhání
- Virová hepatitida
- Alkoholismus
- Porfyrie