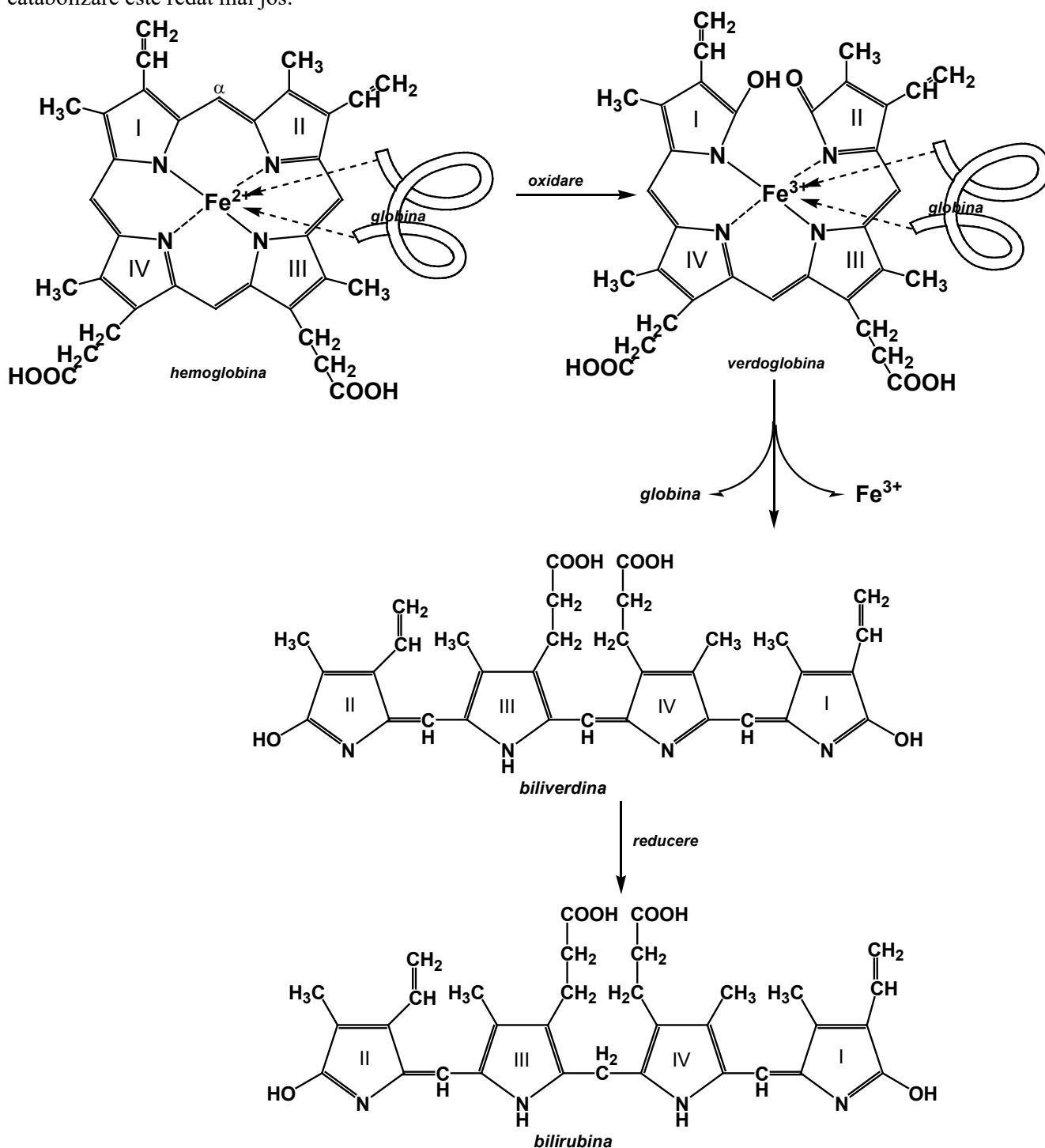


# DETERMINAREA CANTITATIVĂ A BILIRUBINEI ÎN SÂNGE

## Generalități

Bilirubina se formează în organismul uman și animal prin catabolizarea hemoglobinei în sistemul reticulohistocitar, ficat, splină etc.

La început nucleul porfirinic din molecula hemoglobinei suferă o scindare oxidativă la nivelul grupei  $\alpha$ -metinice dintre ciclurile pirolice I și II ale hemului, cu oxidarea simultană a fierului bivalent în trivalent. În urma acestei transformări oxidative apare o substanță de culoare verde, numită verdoglobină sau coeglobină, care pe lângă nucleul porfirinic deschis conține încă globina și fierul trivalent. În fazele următoare ale procesului catabolic verdoglobina pierde atomul de fier și globina. Ca rezultat se formează un pigment biliar, de culoare verde, numit biliverdină. Prin reducerea enzimatică a biliverdinei ia naștere bilirubina, substanță colorată în roșu, care constituie principalul pigment al bilei și un component normal al sângelui. Schematic procesul de catabolizare este redat mai jos:



Bilirubina liberă din sânge, datorită insolubilității ei în apă, nu trece în urină. Această bilirubină liberă se numește bilirubină indirectă sau extrahepatică. Din sânge bilirubina liberă pătrunde în ficat, unde se conjugă, în marea ei majoritate, cu acidul uridindifosfat-glucuronic rezultând astfel glucuronidbilirubina și diglucuronidbilirubina. Bilirubina conjugată, cunoscută sub numele de bilirubină directă sau hepatică posedă o solubilitate bună în apă. Datorită acesteia bilirubina directă este excretată prin bilă în duoden și de aici trece în intestinul subțire, unde este transformată în continuare în alți pigmenți biliari.

Concentrația sanguină de bilirubină constantă în condiții normale poate crește în diferite forme de icter. Nivelul sanguin al bilirubinei, ușor de urmărit experimental, oferă un test comod pentru explorarea stării funcționale a ficatului.

### Principiul metodei:

Prin reacția dintre acidul sulfanilic și azotitul de sodiu se formează acidul diazofenilsulfonic (acid diazosulfanilic). Acidul diazofenilsulfonic reacționează cu bilirubina directă (conjugată) din serul sanguin și rezultă azobilirubina care, în mediu neutru, este colorată în roșu purpuriu. Tratarea serului sanguin cu reactivul cofeinic conferă bilirubinei indirecte (libere) solubilitate, ceea ce-i permite să reacționeze cu acidul diazosulfanilic. Intensitatea culorii azobilirubinei în mediu alcalin este proporțională cu bilirubina totală (indirectă și directă). Prin diferență față de bilirubina totală se poate afla și bilirubina indirectă (liberă).

### Reactivi:

1. Soluție de acid sulfanilic 29mM în soluție de acid clorhidric 0,17N. Se dizolvă 0,5 g de acid sulfanilic în 30 – 40 ml de apă distilată și se adaugă 1,5 ml de acid clorhidric concentrat. Dacă acidul sulfanilic se solubilizează greu se poate încălzi ușor vasul pe baia de apă. După ce s-a dizolvat complet acidul sulfanilic și s-a răcit vasul se completează volumul soluției la 100 ml cu apă distilată.

2. Soluție de azotit de sodiu 0,072M. se dizolvă 0,5 g azotit de sodiu (NaNO<sub>2</sub>) în 100 ml de apă distilată.

3. Diazoreactiv. Se prepară la momentul utilizării prin amestecarea a 10 ml de soluție de acid sulfanilic (reactiv 1) cu 0,3 ml soluție de azotit de sodiu (reactiv 2).

4. Reactiv cofeinic. Soluția A: soluție de cafeină 0,13M în soluție de benzoat de sodiu 0,156M, preparată prin dizolvarea a 10 g cafeină și 15 benzoat de sodiu în 90 ml de apă distilată prin încălzire pe baia de apă. După răcire se va completa volumul soluției la 100 ml cu apă distilată. Soluția B: soluția de acetat de sodiu 25%. Reactivul cofeinic se va prepara la momentul utilizării prin amestecarea de volume egale de soluție A și B.

5. Soluție de tartrat de sodiu și potasiu 0,93M în soluție de NaOH 1,9N. Preparare: prin dizolvarea a 15 g de tartrat dublu de sodiu și potasiu (sare Seignette) și 7,5 g de NaOH în 100 ml de apă distilată.

6. Soluție de NaCl 0,9%.

### Mod de lucru:

#### A) Determinarea bilirubinei totale:

Se va lucra după planul din următorul tabel:

	Probă	Martor
Ser sanguin (ml)	0,25	0,25
Reactiv cofeinic (R4) (ml)	1	1
Soluție de NaCl (R6) (ml)	-	0,25
Diazoreactiv (R3) (ml)	0,25	-
Se vor agita eprubetele și se vor lăsa pentru 10 – 30minute la temperatura camerei		
Soluție de tartrat (R5) (ml)	1	1

Se vor agita eprubetele apoi se lasă în repaus la temperatura camerei 5 – 30 minute după care se vor citi extincțiile probelor față de martor la lungimea de undă de 600 nm.

#### B) Determinarea bilirubinei directe (conjugate):

Se va lucra conform tabelului următor:

	Probă	Martor
Ser sanguin (ml)	0,5	0,5
Soluție de NaCl (R6) (ml)	1,75	2
Diazoreactiv (R3) (ml)	0,25	-

Se agită, se lasă în repaus EXACT 5 minute la temperatura camerei apoi se va citi extincția probei față de martor la lungimea de undă de 530 nm.

### Calculul rezultatelor:

Coefficienții de extincție procentuală ai azobilirubinei la 600 și 530 nm sunt egali cu 1150 și respectiv 943. De aici:  $E_{1\text{mg}/100\text{ml}}^{600} = 1,15$  și  $E_{1\text{mg}/100\text{ml}}^{530} = 0,943$ .

Cantitatea de bilirubină totală în 100 ml de ser saunguin se află cu ajutorul formulei:

$$\text{mg bilirubina} / 100 \text{ ml} = \frac{E^{600}}{1,15} \times \frac{2,5}{0,25}$$

Cantitatea de bilirubină directă se va calcula după formula:

$$\text{mg bilirubina} / 100 \text{ ml} = \frac{E^{530}}{0,943} \times \frac{2,5}{0,5}$$

Nivelul bilirubinei libere în serul sanguin se va afla prin diferență între valoarea bilirubinei totale și valoarea bilirubinei legate.

**Observații:**

1. Dozarea bilirubinei se va efectua pe ser nehemolizat și la cel mult 2 ore de la recoltarea serului.
2. În cazul unei concentrații ridicate de bilirubină serul sanguin se va dilua de 2 sau de 4 ori cu soluție de NaCl 0,9% (R6) rezultatele obținute fiind ulterior înmulțite cu factorul de diluție.

**Importanța practică:**

Concentrația bilirubinei totale în sângele omului sănătos este de până la 1 mg / 100 ml ser. Conținutul bilirubinei conjugate (directe) poate să atingă valoarea de 0,25 mg / 100 ml ser. Bilirubina liberă (indirectă) se află prin scăderea valorii bilirubinei conjugate din cea a bilirubinei totale.

Determinarea bilirubinei totale și a fracțiilor ei prezintă o mare însemnătate clinică, ajutând la stabilirea diagnosticului diferitelor boli.

Icterele hepatice (hepatite, ciroze) sunt însoțite de creșterea conținutului de bilirubină totală și conjugată. O oarecare creștere a cantității de bilirubină liberă se observă în insuficiența hepatică.