

Výhody suché chemie u pediatrických vzorků – neonatální bilirubin jako příklad

M. Šrámková, R. Průša

SOUHRN

U novorozenců je nejčastěji řešenou diagnózou novorozenecká hyperbilirubinemie. Je způsobena zvýšenou koncentrací především nekonjugovaného bilirubinu díky nezralosti konjugčních enzymů a výměně fetálního hemoglobinu. Je důležité monitorovat jeho hladinu, protože v případě vysokých hodnot může být nebezpečná pro zdraví dítěte a v extrémních případech dokonce může vést k poškození mozku. Stanovení hladiny bilirubinu pomocí různých metod umožňuje lékařům monitorovat, případně léčit novorozeneckou žloutenku a předcházet možným komplikacím.

Klíčová slova: pediatrický vzorek, suchá chemie, Vitros 4600, novorozenecké bilirubiny

SUMMARY

Neonatal hyperbilirubinemia is the most commonly diagnosed diagnosis in newborns. It is caused by an increased concentration of mainly unconjugated bilirubin due to the immaturity of conjugation enzymes and the exchange of fetal hemoglobin. It is important to monitor its level, because in the case of high values it can be dangerous for the health of the child and in extreme cases it can even lead to the damage of the brain. Determining the level of bilirubin using various methods allows doctors to monitor and possibly treat neonatal jaundice and prevent possible complications.

Šrámková Monika, Průša Richard: The advantages of dry chemistry in pediatric specimens – neonatal bilirubin as a example

Key words: pediatric specimen, dry chemistry, Vitros 4600, neonatal bilirubins

Úvod

Bilirubin je lineární tetrapyrrolové žlučové barvivo hydrofobní povahy. Vzniká z hemu při odbourávání různých hemoproteinů, nejvíce z hemoglobinu. Jeho syntéza je lokalizována hlavně ve slezině, kostní dřeni, játrech a v kůži. Syntéza bilirubinu je lokalizována převážně v retikuloendotelových buňkách sleziny, ale také v kostní dřeni (z neefektivní erythropoézy), Kupfferových buňkách jater

a v tkáňových makrofázích kůže (např. při hematomu). Hem je oxidován enzymem hemoxygenázou, která je indukovatelná substrátem, ale může být indukována též UVA zářením (v kůži). Tento enzym je lokalizován v hladkém endoplazmatickém retikulu a pro svou funkci vyžaduje molekulární kyslík a NADPH. Z hemu tak vzniká netoxický modro-zelený lineární tetrapyrrol biliverdin a současně se uvolňuje železo ve formě Fe^{3+} . Biliverdin je dále enzymem biliverdinreduktázou redukován na nerozpustný a jediný toxický izomer bilirubinu – bilirubin IX α . Ten je naopak rozpustný v tucích a může prostupovat buněčnými membránami (např. placenta) a biologickými bariérami (např. hematoencefalická). Aby mohl být z těla odstraněn, musí být v hepatocytech přeměněn na rozpustnější derivát. Krví je transportován ve vazbě na albumin do jater, kde dochází k jeho konjugaci s kyselinou glukuronovou pomocí enzymu uridin difosfoglukuryltransferázy a vznikají mono a diglukuronidy. Tento tzv. konjugovaný bilirubin je ve vodě mnohem lépe rozpustný, fyziologicky je vylučován do žluče, při zvýšení koncentrace v krvi se vylučuje také močí. Transport bilirubinu krví probíhá pomocí albuminu, bilirubin je na něj vázán volně, nekovalentními vazbami (= volný bilirubin, tj. v játrech zatím nekonjugovaný). Tato forma bilirubinu bývá též označována jako tzv. nepřímý bilirubin, což souvisí s jeho laboratorním stanovením. Na albuminu existují dvě vazebná místa pro bilirubin: jedno s vyšší afinitou (asociační konstanta vyšší než $10^6 M^{-1}$), druhé s afinitou nižší. Toxicita bilirubinu (kernikterus), kdy dochází k jeho pronikání do membránových lipidů buněk, se však běžně vyskytuje už při koncentracích vyšších než 250 mg/L (428 mmol/L). Z této skutečnosti vyplývá, že druhé, slabší vazebné místo na albuminu efektivně k transportu bilirubinu nepřispívá. Pevnost vazby mezi bilirubinem a albuminem klesá při acidóze a může být porušena i účinkem některých léků. Vazba mezi bilirubinem a albuminem není specifická - vazebná místa mohou být obsazena jinými transportovanými látkami (např. mastnými kyselinami nebo lipofilními léky).

Žlučí se dostává do střeva, kde dochází k jeho dekonjugaci a následné redukci bakteriální flórou na urobilinoidy. Tyto látky částečně cirkulují v enterohepatálním oběhu, částečně jsou ve střevě oxidovány a vylučovány stolicí. Při chybění žlučových barviv postrádá stolice své charakteristické zbarvení, je tzv. acholická. Bilirubin však není pouze odpadním produktem metabolismu, má také významné antioxidační vlastnosti - je lapačem volných radikálů, inhibuje peroxidaci lipidů.

Hyperbilirubinemie je bez ohledu na věk definována jako zvýšení koncentrace bilirubinu v krvi nad 25 $\mu\text{mol/L}$. Klinicky se projevuje ikterem, žlutým zbarvením sklér, později kůže a sliznic. U novorozence bývá ikterus obvykle klinicky patrný až při hodnotách bilirubinu nad 85 $\mu\text{mol/L}$. Novorozenci mají zvýšenou koncentraci bilirubinu fyziologicky kvůli zvýšené degradaci erytrocytů a s tím spojenou výměnu fetálního hemoglobinu za hemoglobin

dospělého typu a nezralosti enzymových procesů (nízká aktivita uridyldifosfát glukuronyltransferázy). Koncentrace bilirubinu je 2 až 3 násobná již první den života než v dospělosti a to v důsledku nižší vazebné kapacity albuminu, vychytávání bilirubinu a konjugace. Navíc u novorozenců je bilirubin hydrolyzován v tenkém střevě zpět na nekonjugovaný bilirubin, tomu napomáhá mnohonásobně zvýšený enzym β -glukurodináza.

Fyziologická hyperbilirubinemie se objevuje u 45 až 65 % zdravých novorozenců a patří k nejčastěji řešeným diagnózám na neonatologických odděleních. K rozvoji fyziologického ikteru u novorozence vede kromě výše uvedeného ukončení placentární clearance bilirubinu, snížená eliminační schopnost jater (zejména snížená aktivita uridyldifosfoglukuronyltransferázy) při zvýšené zátěži bilirubinem v časném postnatálním období, která je způsobena vyšším rozpadem erytrocytů, vyšší podíl bilirubinu nepocházející z erytrocytů, zvýšená aktivita β -glukurodinázy ve střevě a vyšší enterohepatální oběh bilirubinu. Fyziologická hyperbilirubinemie se objevuje kolem třetího dne života a mizí do konce prvního týdne, je třeba ji vždy odlišit od hyperbilirubinemie patologické. Cílem léčebných opatření je předejít vzestupu hladiny bilirubinu ohrožujícímu novorozence rozvojem bilirubinové encefalopatie, která u přetrvávající hyperbilirubinemie může progredovat trvalým postižením centrální nervové soustavy (jádrový ikterus — kernikterus). Nekrózou bývají postiženy neurony bazálních ganglií, jader mozkových nervů a mozečku [1]. V případě konjugované hyperbilirubinemie mají léčebná opatření zabránit progresi jaterního a dalšího poškození. Měření bilirubinu je klíčové pro léčbu novoro-

zenecké žloutenky. Základním předpokladem pro měření bilirubinu je jejich přesnost a preciznost. Tradičními analytickými metodami lze změřit bilirubin celkový a přímý, tato klasifikace ale není úplně dostatečná, viz tabulka č. 1. Jako přímý bilirubin se označuje takový, který v reakci reaguje přímo, tedy nepotřebuje akcelerátor. Bez jeho přítomnosti reaguje především konjugovaný bilirubin, velmi pomalu nekonjugovaný a také delta bilirubin vznikající při dlouhotrvající konjugované hyperbilirubinemii, což vede ke vzniku pevné kovalentní vazby na albumin. Delta bilirubin má biologický poločas 17 dní. Z toho vyplývá, že toto vyšetření přímého bilirubinu není přesné a neodpovídá pouze koncentraci konjugovaného bilirubinu. Bilirubin celkový zahrnuje nekonjugovaný, konjugovaný i delta. Odečtením přímého bilirubinu od celkového lze získat hodnotu tzv. nepřímého bilirubinu, tedy hodnotu nekonjugovaného bilirubinu, ovšem tady je třeba si uvědomit, že tato hodnota není rovna celé frakci nekonjugovaného bilirubinu. O bilirubinu je známo, že je to fotolabilní sloučenina. Expozice vzorku krve světlu může způsobit tvorbu jak konfiguračních (stereoizomerů), tak strukturních (konstitučních) isomerů. Konfigurační izomery interferují při diazo stanoveních. Ukázalo se, že strukturní isomery nereagují s diazočinidly [2].

Diazo reakci poprvé pro stanovení bilirubinu aplikovali van den Bergh a Muller v roce 1916. Zjistili, že konjugovaný bilirubin reaguje rychle a nekonjugovaný bilirubin reaguje pomalu v nepřítomnosti „akcelerátoru“. Tím byl dán základ stanovení přímého bilirubinu. Jendrassik a Grof modifikovali v roce 1938 diazo metodu, jako akcelerátor použili kofein, což je základní stanovení pro celkový bilirubin [3].

Tabulka č.1: Přehled druhů bilirubinů a možnosti jejich stanovení. Pomocí HPLC lze rozlišit frakce alfa (nekonjugovaný, Bu, α), beta (monoglukuronid, β , mBc), gama (diglukuronid, dBc,) a delta. Tradičními metodami lze rozlišit bilirubin celkový, přímý a lze dopočítat nepřímý. Pomocí metody BuBc na analyzátoru Vitros lze kvantifikovat konjugovaný bilirubin (Bc), nekonjugovaný (Bu), celkový novorozecký bilirubin, který je vypočítán jako součet Bu a Bc.

HPLC Peak	α	β	γ	δ
Druhy bilirubinů	nekonjugovaný (Bu)	monoglukuronid (mBc)	diglukuronid (dBc)	konjugovaný bilirubin kovalentně navázaný na albumin (delta)
Tradiční metody	celkový (TBIL)			
	nepřímý	přímý		
VITROS Metody	TBIL			
	Bu	Bc		Delta
	NBIL			



Obr. 1 Biochemický analyzátor VITROS® 4600, speciálně navržený tak, aby jej bylo možné snadno integrovat do každé fáze laboratorního pracovního postupu, od preanalytických až po postanalytická řešení.

Většina metod stanovení vychází z této reakce, tedy z reakce bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou za vzniku azobilirubinu. Ten je při neutrálním pH červený a v bazickém modrý a stanovuje se fotometricky. V přítomnosti akcelérátoru, tzn. směsi kofeinu, octanu sodného a benzoanu sodného, dochází k uvolnění nekonjugovaného bilirubinu z vazby na albuminu. Bez akcelérátoru reaguje pouze ve vodě rozpustný konjugovaný bilirubin. Dále existuje možnost stanovení bilirubinů přes biliverdin. Dumasova — Perryho metoda je také referenční metodou. Bilirubin je oxidován bilirubinoxidázou na biliverdin. Zaznamenává se pokles absorbance kineticky po dobu pěti minut při vlnové délce 424 – 465 nm. Přímý bilirubin se stanoví při pH 4,5 a celkový po přidání akcelérátoru při pH 8,5 [4]. Další možností je stanovení přes biliverdin po oxidaci kyselinou vanadičnou. Tuto analytickou metodu využíváme u nás na ÚLCHKB pro pacienty od 30 dní věku. Možností stanovení celkového bilirubinu z plné krve se využívá na jednotkách intenzivní péče, měří se z plné krve na point of care testing analyzátoch pomocí co-oximetru, kde je krev hemolyzována a koncentrace je spočítána jako podíl koncentrace bilirubinu v ředěné plazmě po hemolýze vzorku a odečtu vypočítaného hematokritu od jedné. Pokud se rozhodujeme o léčebném postupu, vždy je zlatým standardem výsledek bilirubinu ze séra z biochemické akreditované laboratoře [5]. Další možností, kterou využíváme na ÚLCHKB je stanovení konjugovaného a celkového novorozeneckého bilirubinu do 30 dní

věku dítěte na biochemickém analyzátoru Vitros 4600 od firmy Quidel Ortho, který využívá principu suché chemie. Suchá chemie je přístup v laboratorní diagnostice, kde jsou všechny potřebné reagensie pro biochemické analýzy aplikovány na sušený substrát nebo film. V tomto formátu jsou reakční složky fixovány na pevném nosiči, což odlišuje suchou chemii od tradiční mokré chemie, kde jsou reagensie obvykle ve formě kapalin. Vyhodnocuje se reflexní fotometrií. Metoda Vitros BuBc se provádí s použitím slidů, což je vícevrstevný, analytický prvek nanesený na polyesterový podklad. Na slide je nanesena kapka (10 μ l) vzorku pacienta, která se poté rovnoměrně rozprostře na ploše slidu a proniká do dalších vrstev. Nekonjugovaný bilirubin se za pomoci kofeinu a benzoanu sodného v rozprostírací vrstvě disociuje od albuminu a cestuje spolu s konjugovaným bilirubinem skrze krycí vrstvu k reagenční vrstvě. Bílkoviny (včetně albumin vázajícího delta bilirubinu a hemoglobinu) a rovněž lipidy a lipochromy (beta karoteny) se udržují v rozprostírací vrstvě. Krycí vrstva opticky blokuje potenciálně interferující sloučeniny zachycené v rozprostírací vrstvě, čímž zabraňuje jejich měření. V reagenční vrstvě se nekonjugovaný a konjugovaný bilirubin vážou na kationtový fixativ barvy. Následkem toho se absorpční vrcholy bilirubinových frakcí posouvají a koeficienty molárního zániku se výrazně zvyšují. Mono a di-glukuronidy bilirubinu vázající se na fixativ barvy mají identická spektra a jsou kvantitativně vyjádřena jako konjugovaný bilirubin. V blízkosti vlnové délky 400 až 420 nm

tudíž mají nekonjugovaný i konjugovaný bilirubin podobné molární absorpční schopnosti, ale při vlnové délce 460 nm má nekonjugovaný bilirubin vyšší molární absorpční schopnost než konjugovaný. Následkem těchto unikátních spektrálních charakteristik se reflexní hustoty při vlnových délkách 400 a 460 nm používají k určení koncentrací nekonjugovaného a konjugovaného bilirubinu. Výhodou tohoto stanovení je odstínění hemolýzy a potřeba malého množství patientského séra (10 µl). Navíc mrtvý objem je pouhých 35 µl v primární zkumavce, což je nejmenší známý objem z biochemických analyzátorů. To představuje značnou výhodu u pediatrických vzorků, zejména pak u neonatologických. Díky unikátní technologii se u novorozenců stanoví přímo frakce nekonjugovaného bilirubinu, který u nich převažuje.

Seznam zkratk

Bc – konjugovaný bilirubin

Bu – nekonjugovaný bilirubin

dBc – diglukuronid

mBc – monoglukuronid

NBIL – celkový novorozenecký bilirubin

TBIL – celkový bilirubin

Literatura

1. **Du L, Ma X, Shen X. et al.:** Bao Y, Chen L, Bhutani VK. Neonatal hyperbilirubinemia management: Clinical assessment of bilirubin production. *Semin Perinatol.* 2021 Feb;45(1):151351
2. **Kawamoto S, Koyano K, Ozaki M. et al.:** Arai T, Iwase T, Okada H, Itoh S, Murao K, Kusaka T. Effects of bilirubin configurational photoisomers on the measurement of direct bilirubin by the vanadate oxidation method. *Ann Clin Biochem.* 2021 Jul;58(4):311-317. doi: 10.1177/0004563221999068. *Epub* 2021 Mar 9. PMID: 33588585.
3. **Jendrassik, L. & Grof, P. et al.:** Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochem Z.* 1938; 297, 81–89
4. **Doumas, B. T. & Eckfeldt, J. H. Errors et al.:** in measurement of total bilirubin: a perennial problem. *Clin. Chem.* 1996; 42, 845–848
5. **Colombo G, Szoke D, Aloisio E. et al.:** Clinicians at Crossroads for a Dangerous Interference in Neonatal Bilirubin Determination at the Point-of-Care. *Clin Chem.* 2022 Jul 3;68(7):887-891. doi: 10.1093/clinchem/hvac077. PMID: 35780507.

Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.