

Validacija referentnog intervala za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće

Zorić, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:473383>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET**

DIPLOMSKI RAD

LARA ZORIĆ

Zagreb, 2022.

Lara Zorić

**Validacija referentnog intervala za žučne kiseline
za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna
trudnoće**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Lore Dukić, spec. med. biokem. i lab. med. i suvoditeljstvom doc. prim. dr. sc. Vladimira Blagaića, dr. med. spec. ginekologije i porodništva, subspec. fetalne med. i opstetricije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. Lori Dukić na nesebičnim savjetima, iskazanom povjerenju i prvenstveno ljudskosti. Hvala svim zaposlenicima Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ koji su od početka samnom na ovom putu.

Hvala i komentoru doc. Blagaiću i svim zaposlenicima Odjela za roditelje i babinjače Klinike za ginekologiju Kliničke bolnice „Sveti Duh“ na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela bez kojih obim ovog rada nikada ne bi mogao biti ovolik.

Posebno hvala prijateljima koji su me pratili na ovom dugom putu i samnom zatvorili još jedno poglavlje.

Za kraj se želim zahvaliti svojoj obitelji i Karlu. Hvala na podršci, poticaju i ljubavi.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Žučne kiseline | 2 |
| 1.1.1. Fiziološke uloge | 2 |
| 1.1.2. Metabolizam..... | 4 |
| 1.1.3. Patofiziologija | 7 |
| 1.2. Intrahepatička kolestaza u trudnoći..... | 8 |
| 1.2.1. Etiologija i faktori rizika | 9 |
| 1.2.2. Klinička slika..... | 10 |
| 1.2.3. Posljedice za fetus | 10 |
| 1.2.4. Laboratorijska dijagnostika | 12 |
| 1.3. Verifikacija metode..... | 13 |
| 1.3.1. Metoda određivanja žučnih kiselina..... | 13 |
| 1.4. Validacija referentnog intervala..... | 14 |
| 1.4.1. Odabir referentnih pojedinaca | 15 |
| 1.4.2. Predanalitički i analitički čimbenici | 16 |
| 1.4.3. Statistička obrada rezultata..... | 16 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME..... | 18 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 20 |
| 3.1. Verifikacija metode..... | 21 |
| 3.1.1. Stabilnost | 21 |
| 3.1.2. Preciznost | 23 |
| 3.1.3. Linearnost..... | 23 |
| 3.1.4. Verifikacija referentnog intervala | 24 |
| 3.1.5. Točnost – usporedba metoda..... | 24 |
| 3.1.6. Interferencija lipemije | 25 |
| 3.1.7. Statistička obrada podataka | 26 |
| 3.2. Validacija referentnog intervala..... | 26 |
| 3.2.1. Odabir referentnih ispitanica | 26 |
| 3.2.2. Predanalitički i analitički čimbenici | 27 |
| 3.2.3. Statistička obrada podataka | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 29 |
| 4.1. Verifikacija metode..... | 30 |

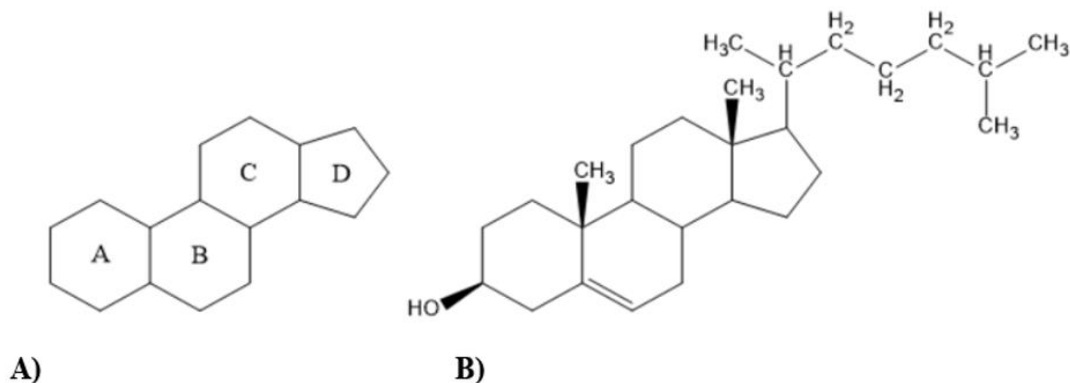
| | |
|---|-----------|
| 4.1.1. Stabilnost..... | 30 |
| 4.1.2. Preciznost | 33 |
| 4.1.3. Linearnost..... | 33 |
| 4.1.4. Verifikacija referentnog intervala | 35 |
| 4.1.5. Točnost – usporedba metoda..... | 36 |
| 4.1.6. Interferencija lipemije | 38 |
| 4.2. Validacija referentnog intervala..... | 41 |
| 4.2.1. Raspodjela podataka..... | 41 |
| 4.2.2. Ispitivanje vrijednosti koje odstupaju | 43 |
| 4.2.3. Izrada referentnog intervala | 44 |
| 5. ZAKLJUČAK | 48 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA..... | 50 |
| 7. LITERATURA..... | 53 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY | 60 |
| 8.1. Sažetak | 61 |
| 8.2. Summary | 62 |
| 9. PRILOZI | 63 |
| 9.1. Upitnik za validaciju referentnog intervala..... | 64 |

1. UVOD

1.1. Žučne kiseline

1.1.1. Fiziološke uloge

Žučne kiseline (ŽK) čine skupinu sličnih steroidnih molekula koje odlikuju posebna fizikalno-kemijska svojstva neophodna za njihovu fiziološku ulogu (Monte et al, 2009). Prikaz steroidne strukture od tri šesteročlana (A, B i C) i jednog peteročlanog prstena (D) je na Slici 1.

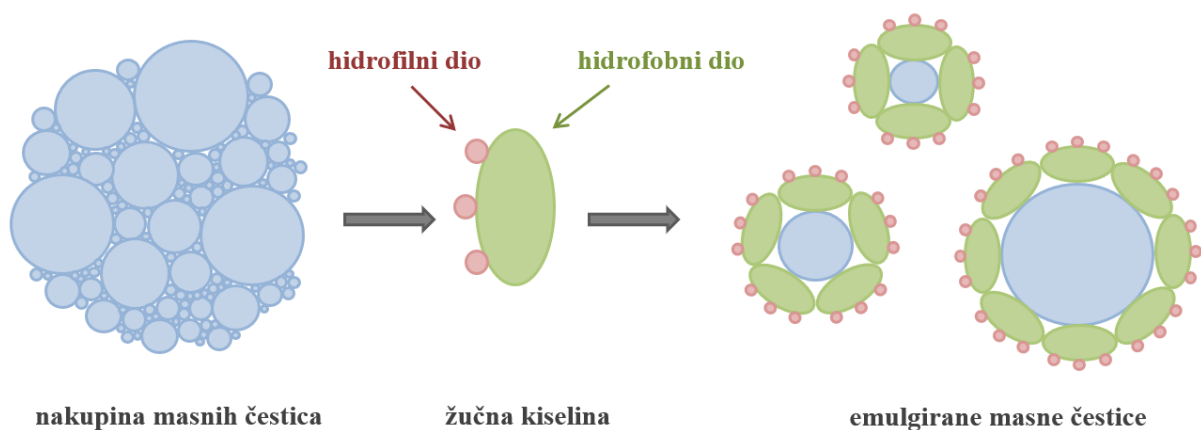


Slika 1. A) Kemijska struktura steroidne strukture koja se sastoji od 3 šesteročlana prstena (A, B i C) i jednog peteročlanog prstena (D); **B)** kemijska struktura kolesterola.

Sintetiziraju se u jetri iz kolesterola mnogobrojnim uzastopnim enzimskim reakcijama i izlučuju putem žuči. Sama molekula kolesterola je netopiva i nenabijena molekula koja mijenja svoja fizikalna svojstva metabolizmom do ŽK. Nakon sinteze iz kolesterola, ŽK se konjugiraju s aminokiselinama taurinom ili glicinom što molekulama ŽK daje negativan naboj pri visokim pH vrijednostima koje su prisutne u tankom crijevu. Negativno nabijeni bočni lanac čini hidrofilni dio ŽK, dok je steroidna struktura hidrofobna zbog čega se ŽK svrstavaju u skupinu amfipatskih molekula. Iz tog posebnog fizikalno-kemijskog svojstva, među ostalim, proizlaze njihove fiziološke uloge (Hofmann, 1999).

Do danas je otkriven spektar od pet glavnih funkcija ŽK. Primarna funkcija im je eliminacija kolesterola iz organizma. Već je rečeno da je kolesterol izrazito lipofilna molekula čijim metabolizmom nastaju ŽK. Osim što su razgradni produkti metabolizma kolesterola, ŽK također emulgiraju ostale nemetabolizirane molekule kolesterola u žuči i na taj način potiču transport kolesterola iz hepatocita u intestinalni lumen te njegovu fekalnu eliminaciju iz organizma.

Druga funkcija ŽK je emulgiranje i otapanje masti. ŽK stvaraju posebne strukture u vodi zvane micelle zbog amfipatskog svojstva. Micelle ŽK, ili koloidni agregati, se po svojim svojstvima razlikuju od micela drugih deterdženata prvenstveno zbog toga što su ŽK generalno manje molekule (Carey i Small, 1972). Svojim hidrofobnim dijelom se okreću prema središtu, odnosno lipidnoj čestici, a hidrofilnim dijelom prema vodenoj sredini u kojoj se nalaze. Nastale micelle pospješuje emulziju i topljivost masnih čestica shematski prikazano na Slici 2. Povećana topljivost u crijevima proporcionalna je povećanju apsorpcije masti i samim time vitamina topljivih u mastima (vitamini A, D, E i K).



Slika 2. Shematski prikaz stvaranja micela ŽK i emulzije čestica masti. Hidrofobni dio ŽK se okreće prema masnoj čestici, dok je hidrofilni dio okrenut prema vodenoj sredini u tankom crijevu gdje nastaju micelle.

Treća i četvrta funkcija vezane su uz izlučivanje žuči. Sintetizirane ŽK se izlučuju aktivnim transportom iz hepatocita u žučne vodove gdje povećavaju osmotsku aktivnost i potiču izlučivanje drugih sastavnica žuči poput fosfolipida. Stvaraju micelle zbog čega koncentracija slobodnih ŽK u žučnim vodovima pada što je pogodno za organizam s obzirom da u slobodnom obliku oštećuju epitelne stanice žučnih vodova (Hofmann, 1999).

Posljednja posebno istaknuta funkcija ŽK je regulacija sinteze kolesterola i ŽK negativnom povratnom spregom. Inhibicijom enzima uključenih u reakcije sinteze kolesterola, prvenstveno 7α -hidroksilaze i 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze, ŽK kontroliraju biosintetski put kolesterola i vlastitu biosintezu (Vlahcevic et al, 1994). Osim indirektno inhibicije vlastite sinteze, ŽK direktno inhibiraju vlastiti biosintetski put preko nuklearnog farnezoid X receptora (FXR). Pri visokim i toksičnim unutarstaničnim

koncentracijama, ŽK se vežu za FXR i aktiviraju ga, a aktivirani receptor djeluje kao transkripcijski faktor za brojne proteine uključene u metabolizam ŽK. Krajnji produkt aktivacije FXR receptora je smanjeni opseg sinteze i apsorpcije, te povećana sekrecija ŽK (Kliewer i Mangelsdorf, 2015).

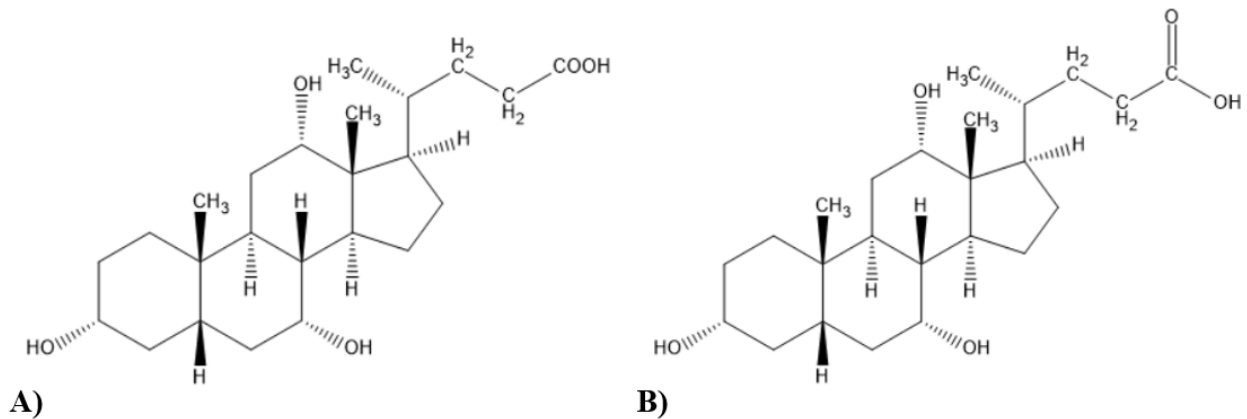
Osim navedenih pet funkcija koje su otkrivene u prošlom stoljeću, potpuna i sveobuhvatna biološka funkcija ŽK se tek počinje integrirati i razumjeti. Na prijelazu između dva stoljeća otkriveno je da ŽK također imaju ulogu u poticanju apsorpcije kalcija u intestinalnom sustavu, reguliranju sekrecije kolekistokinina iz gušterače, te reguliranju rasta mikroorganizama u tankom crijevu djelujući kao potentni antimikrobni agensi (Sanyal i sur. 1994; Koop i sur. 1996; Begley i sur., 2005).

1.1.2. Metabolizam

Kao derivati kolesterola, primarne ŽK nastaju transformacijom kolesterola hidroksilacijom dvostruke C₅-C₆ veze, epimerizacijom hidroksilne skupine na poziciji C₃, te oksidativnim cijepanjem tri ugljikova atoma u bočnom ugljikohidratnom lancu (Angellon i sur., 2008). Zbog epimerizacije na C₃ poziciji steroidnog prstena u strukturi svake ŽK hidroksilna skupina na poziciji C₃ je uvijek u α -konfiguraciji (Chiang, 2013). Reakcije biotransformacije lokalizirane su u različitim staničnim organelama, tako da se one reakcije koje uključuju modifikacije steroidnog prstena odvijaju u endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijima, dok su peroksisomi odgovorni za uklanjanje tri ugljikova atoma ugljikohidratnog lanca (Russel, 2003).

Navedeni proces dorade steroidnog prstena do primarne ŽK može biti kataliziran enzimima klasičnog ili alternativnog puta biosinteze. Ono što razlikuje ova dva puta je lokacija u tijelu. Alternativnim putem sinteza ŽK iz oksisterola se odvija u raznim tkivima i stanicama u tijelu izvan jetre. Produkti nastali u drugim tkivima cirkulacijom dolaze do hepatocita gdje se finalno obrađuju do strukture primarnih ŽK, dok se klasični put sinteze iz kolesterola odvija isključivo u jetrenim stanicama (Cali i Russel, 1991). Enzim 7 α -hidroksilaza prvi je i glavni enzim klasičnog puta biosinteze. Aktivnost enzima je regulirana unutarstaničnom koncentracijom ŽK negativnom povratnom spregom, a važnosti pravilne regulacije 7 α -hidroksilaze doprinosi činjenica da taj korak ograničavajući (engl. *rate limiting*). Pravilno regulirana aktivnost enzima direktno utječe na krajnji broj sintetiziranih molekula ŽK (Angellon i sur., 2008).

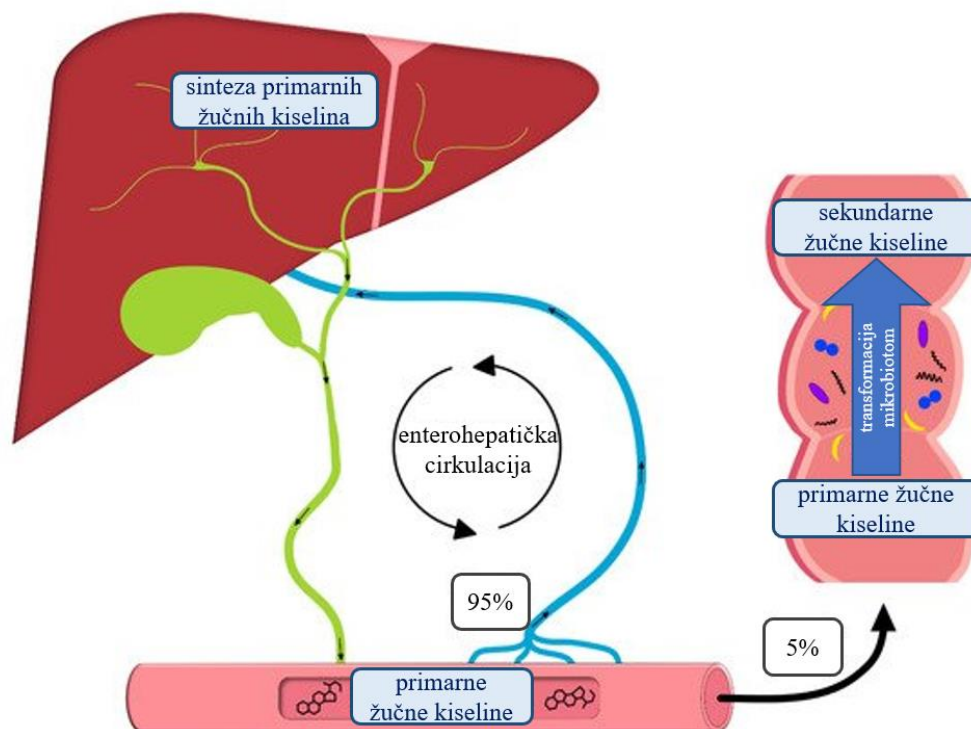
Posljednji korak sinteze prije izlučivanja u crijeva je konjugacija s aminokiselinama. Kolna (engl. *cholic acid*, CA) i kenodeoksikolna kiselina (engl. *chenodeoxycholic acid*, CDCA), kao glavni predstavnici primarnih ŽK, konjugiraju se s glicinom ili taurinom povećavajući na taj način topljivost ŽK u kiselom okruženju crijeva i poboljšavajući funkciju emulzije masti (Slika 3).



Slika 3. Strukture primarnih ŽK: **A)** kolna kiselina; **B)** kenodeoksilona kiselina.

Ljudsko tijelo u prosjeku dnevno sintetizira između 200 i 600 mg primarnih ŽK i izluči otprilike jednaku količinu fekalnim putem što čini samo 5% od ukupne mase u tijelu. Od ukupno 3 g ŽK u tijelu, samo 5% dopijeva do distalnog dijela tankog crijeva gdje podliježu djelovanju bakterija, a primarni razlog tome je enterohepatička cirkulacija.

Cijeli probavni sustav karakterizira lučenje sastavnica koje omogućuju i pospešuju razgradnju hrane poput sline, želučanog soka i sokova gušterače, ali žuč koju luči žučni mjehur karakteristična je upravo zbog ŽK. ŽK se nakon lučenja u intestinalni sustav ponovno apsorbiraju u distalnom dijelu tankog crijeva. Sadržaj apsorbiran u ileumu se portalnom venom vraća u jetru od kuda se ponovno luči putem žuči u crijevo. Kontinuirani proces sekrecije, apsorpcije i resekrecije naziva se enterohepatička cirkulacija (Slika 4). U slučaju ŽK, enterohepatička cirkulacija je od iznimne važnosti za njihov metabolizam i homeostazu. Povratkom u jetru portalnom venom, primarne ŽK direktno inhibiraju sintezu kolesterola i samim time vlastitu sintezu (Hoffman, 1999).



Slika 4. Shematski prikaz enterohepatičke cirkulacije. Primarne ŽK sintetizirane u jetri izlučuju se putem žuči u duodenum, od kud se 95% izlučenih ŽK reapsorbira u ileumu, a preostalih 5% dopijeva do kolona gdje se djelovanjem bakterijskih enzima transformiraju u sekundarne ŽK (preuzeto i prilagođeno iz Grüner i Mattner, 2021).

One molekule ŽK koje izbjegnu enterohepatičku cirkulaciju podliježu transformaciji u sekundarne ŽK enzimima crijevne mikrobiote (Grüner i Mattner, 2021). Preko dvadeset sekundarnih ŽK identificirano je u ljudskom fecesu, ali deoksikolna (engl. *deoxycholic acid*, DCA), ursodeoksikolna (engl. *ursodeoxycholic acid*, UDCA) i litokolna (engl. *lithocholic acid*, LCA) ističu se kao najzastupljenije. Sekundarne ŽK nastaju djelovanjem bakterijskih enzima u procesima dekonjugacije, oksidacije/epimerizacije, dehidroksilacije na poziciji C₇ i esterifikacije (Gerard, 2013). Jedna od funkcija ŽK je antimikrobno djelovanje u crijevima. Pokazalo se da u kombinaciji s imunoglobulinom A (IgA), najzastupljenijim protutijelima sluznice probavnog sustava, ŽK pojačavaju svoje antimikrobno djelovanje, a kombinacija ŽK i IgA inhibira bakterijski rast i adheziju bakterija što rezultira usporenim razvojem infekcija u bilijarnom traktu (Hoffman, 1999).

1.1.3. Patofiziologija

Određene ŽK su citotoksične. Unatoč tome što su jedne od najvažnijih sastavnica žuči, pokazalo se da ŽK mogu uzrokovati kolestazu, odnosno smanjenje ili zastoj protoka žuči. Kada je brzina stvaranja žuči u žučnom mjehuru veća od brzine sekrecije žučnim kanalčićima, žučni konstituenti, posebice ŽK, se nakupljaju i oštećuju citoskelet, organele i membrane žučnih kanalčića. Citotoksičnost akumuliranih ŽK uzrokuje daljnje oštećenje hepatocita i smanjenje lučenja žuči (Sawkatanwer, 1995).

Hidrofobnost je jedna od glavnih karakteristika molekule ŽK koja utječe na unutarstaničnu toksičnost, a što je molekula ŽK hidrofobnija njena toksičnost se povećava. Na cjelokupnu hidrofobnost utječe broj i orijentacija hidroksilnih skupina, te amidna skupina na poziciji C₂₄ (Thomas i sur., 2008). Otkriveno je nekoliko mehanizama kojima ŽK djeluju citotoksično: kao deterdženti razgrađuju stanične membrane i njihove lipidne komponente, induciraju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i aktiviraju procese nekroze i apoptoze (Perez i Briz, 2009).

Mehanizam izazivanja oksidativnog stresa u hepatocitima zbog nakupljenih ŽK u kolestazi usko je povezan s hidrofobnošću molekula. ŽK narušavaju proces staničnog disanja zato što inhibiraju nekoliko enzimskih kompleksa koji su odgovorni za transport elektrona na unutarnjoj membrani mitohondrija. Potaknuta je lipidna peroksidacija i nastaju ROS, a antioksidativna sposobnost stanice se smanjuje tijekom vremena. Hidrofobne ŽK povećavaju propusnost vanjske mitohondrijske membrane što je glavni okidač nekroze ili apoptoze stanice (Lemasters i sur., 1998).

U kolestazi dolazi do retencije i akumulacije hidrofobnih ŽK (npr. CDCA i DCA) u hepatocitima i posljedično oštećenja jetrenog parenhima (Perez i Briz, 2009). Nekroza i apoptoza jetrenog parenhima primijećene su vrlo rano u kolestatskoj bolesti, a uzrok su daljnjih komplikacija poput upala i fibroze neparenhimskih stanica. Oštećeni hepatociti otpuštaju faktore rasta, citokine, kemokine i produkte lipidne peroksidacije zbog čega se upalni odgovor pojačava, a fibrinogeneza stimulira (Maher i Friedman, 1993).

Osim citotoksičnog djelovanja i poticanja upalnog odgovora, dokazana je i proliferativna aktivnost ŽK. Kod glodavaca je pokazano da neke molekule ŽK moduliraju sintezu deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) tijekom regeneracije jetre, procesa koji je ovisan o vezanju molekule ŽK na FXR receptor. Kod ljudi se povišene serumske koncentracije hidrofobnih ŽK povezuju s povećanom incidencijom karcinoma grkljana, jednjaka, želuca, gušterače, tankog crijeva i kolona (Bernstein i sur., 2005). Smatra se

kako je glavni uzrok karcinogeneze oksidativni stres koji izazivaju unutar stanice. Ponavljajuća oštećenja DNA molekule povećavaju vjerojatnost mutacije i inaktivaciju tumor supresorskih gena. Oksidativni stres prouzrokovan visokim koncentracijama ŽK također može uzrokovati oštećenja epitelnih stanica bubrega i pluća. Kod pacijenata koji boluju od intrahepatičke kolestaze primijećeni su poremećaji funkcije glomerula i tubula bubrega (Smolarczyk i sur., 2000).

1.2. Intrahepatička kolestaza u trudnoći

U trudnoći, u organizmu majke se događaju brojne fiziološke i anatomske promjene da bi se osigurali najbolji uvjeti za rast fetusa. Svi organski sustavi se prilagođavaju novom stanju u svrhu očuvanja normalnog tijeka trudnoće. Povećane potrebe za folnom kiselinom, vitaminom B₁₂ i željezom samo su neke od izraženijih fizioloških potreba. Kao što se ostali organi prilagođavaju drugom stanju, jetra i metabolizam majke se također mijenjaju (McIlvrde i sur., 2017). Glukoneogeneza se povećava, osjetljivost na inzulin se smanjuje, a promijenjeni metabolizam glukoze i lipida posljedica su kombinacije povećane inzulinske rezistencije i hormonskih promjena u trudnoći (Angueira i sur., 2015). Još jedna značajna promjena u hepatobilijarnom sustavu majke je promjena protoka žuči. Blago narušeni transport žuči u većini slučajeva uzrokuje blagi porast koncentracije ŽK u serumu koji je zanemariv, osim u slučajevima intrahepatičke kolestaze (engl. *intrahepatic cholestasis of pregnancy*, ICP) kada koncentracija ŽK u serumu majke izrazito raste (Kietel i sur., 2016).

Intrahepatička kolestaza u trudnoći jedna je od najčešćih bolesti jetre kod trudnica. Simptomi se najčešće ispoljavaju u trećem tromjesečju, a bolest se u većini slučajeva povlači nakon rođenja djeteta (Piechota i Jelski, 2020). ICP karakterizira svrbež (pruritus) tijekom trudnoće, povišene aktivnosti transaminaza i povišena koncentracija ŽK u serumu (Williamson i Geenes, 2014).

Incidencija intrahepatičke kolestaze u trudnoći u svijetu varira od manje od 1% do 27,6%, a razlog ovako širokog raspona nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da razlike između etničkih skupina i različiti okolišni faktori imaju značajan utjecaj na rizik razvoja ICP-a. U usporedbi s Južnom Amerikom gdje je incidencija bolesti najveća i iznosi do 27,6%, postotak oboljelih trudnica u Europi je između 0,5-1,5%, s tim da je najveći postotak zabilježen u Švedskoj (Geenes i Williamson, 2009).

1.2.1. Etiologija i faktori rizika

Etiologija ICP-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, iako postoje studije koje povezuju genetske, hormonske i okolišne čimbenike s rizikom razvoja bolesti. Od genetskih faktora se posebno ističe mutacija u transporteru za fosfolipide MRP3 (engl. *multi-drug resistance protein 3*) u hepatobilijarnom traktu (Jacquemin i sur., 1999). MRP3 je flipaza koja transportira fosfatidilkolin iz hepatocita u žučne kanaliće. U 16% slučajeva ICP-a je dokazana mutacija u genu koji kodira MRP3, a prisutnost mutacije se povezuje s ozbiljnošću bolesti. Trudnice s mutiranim MRP3 transporterom imale su koncentracije ŽK u serumu iznad 40 $\mu\text{mol/L}$ (Piechota i Jelski, 2020). Mutacija u genu koji kodira efluksnu pumpu za ŽK (BSEP, engl. *bile salt export pump*) također uzrokuje ICP, kao i lijekovima uzrokovana oštećenja jetre, a nemogućnost izlučivanja citotoksičnih ŽK dovodi do njihove akumulacije i oštećenja hepatocita (Lang i sur., 2007).

Hormonski čimbenici koji utječu na razvoj ICP su spolni hormoni i njihovi metaboliti. Poveznica između ICP i steroidnih spolnih hormona otkrivena je zbog povećane incidencije ICP u blizanačkim trudnoćama i kod trudnica koje su uzimale oralnu kontracepciju, te zbog činjenice da se bolest javlja u trećem tromjesečju kada su koncentracije estrogena i progesterona najviše (Gonzalez i sur., 1989; Geenes i Williamson, 2009). Barth i sur. (2003) proveli su ispitivanje na 20 zdravih žena koje su uzele etinilestradiol propanolsulfonat nakon čega je zabilježen značajan porast koncentracije ŽK u serumu. U *in vitro* studijama je dokazano da 17- β -estradiol glukuronid inhibira BSEP pumpu kojom se ŽK izlučuju iz hepatocita što posljedično dovodi do nakupljanja ŽK u stanicama (Stieger i sur., 2000). Rezultati dobiveni na studijama na životinjama dokazali su da 17- β -estradiol glukuronid uzrokuje internalizaciju BSEP pumpe i MRP2 (engl. *multi-drug resistance protein 2*) proteina koji ima ulogu u stvaranju žuči.

Iako je velika većina autora bila fokusirana na učinke estrogena i njegovih metabolita na nastanak ICP, neke studije su pokazale da progesteron ima veću ulogu u patogenezi ICP od očekivanog. Studija koju su proveli Bacq i sur. (1995) dokazala je utjecaj progesterona na razvoj ICP. Trudnicama kojima je prijetio prijevremeni porod bio je apliciran prirodni progestin nakon čega su gotovo sve trudnice razvile intrahepatičku kolestazu. Osim toga, važno je naglasiti da se ukupna koncentracija progesterona i njegovih metabolita ne mijenja značajno u serumu zdravih trudnica i onih oboljelih od ICP, ali značajne promjene su primijećene u udjelu pojedinih metabolita (Meng i sur., 1997).

Razni okolišni faktori negativno utječu na razvoj ICP poput infekcije hepatitisom C, godišnjeg doba, niskih koncentracija selena u serumu, niskih koncentracija vitamina D,

višestrukih trudnoća i dobi trudnice (Floreani i Gervasi, 2016). Zanimljivo je istaknuti da je incidencija ICP češća tijekom zime u usporedbi s ljetom (Berg i sur., 1996). Pretpostavlja se da je nedostatak selena u tijelu uzrok smanjene antioksidativne sposobnosti organizma zbog čega manjak selena direktno utječe na ubrzavanje nastanka ICP (Kauppila i sur., 1987). Mehanizam utjecaja vitamina D nije u potpunosti razjašnjen, ali dokazano je da trudnice s ICP imaju niže koncentracije vitamina D u organizmu u usporedbi sa zdravim trudnicama (Shemer i Marschal, 2010). Rizik ponovnog razvoja ICP je visok. Žena koja je već imala ICP će vrlo vjerojatno imati ICP u idućoj trudnoći. Rizik se također povećava s višestrukim trudnoćama, neovisno o tome ima li žena povijest bolesti intrahepatičke kolestaze. Trudnica koja iznosi blizanačku trudnoću je sklonija razvoju intrahepatičke kolestaze, a postotak rizika razvoja bolesti je čak 14%. U usporedbi s blizanačkom trudnoćom, rizik razvoja ICP kod trudnica koje nose trojke je još veći i iznosi 43% (Floreani i Gervasi, 2016).

1.2.2. Klinička slika

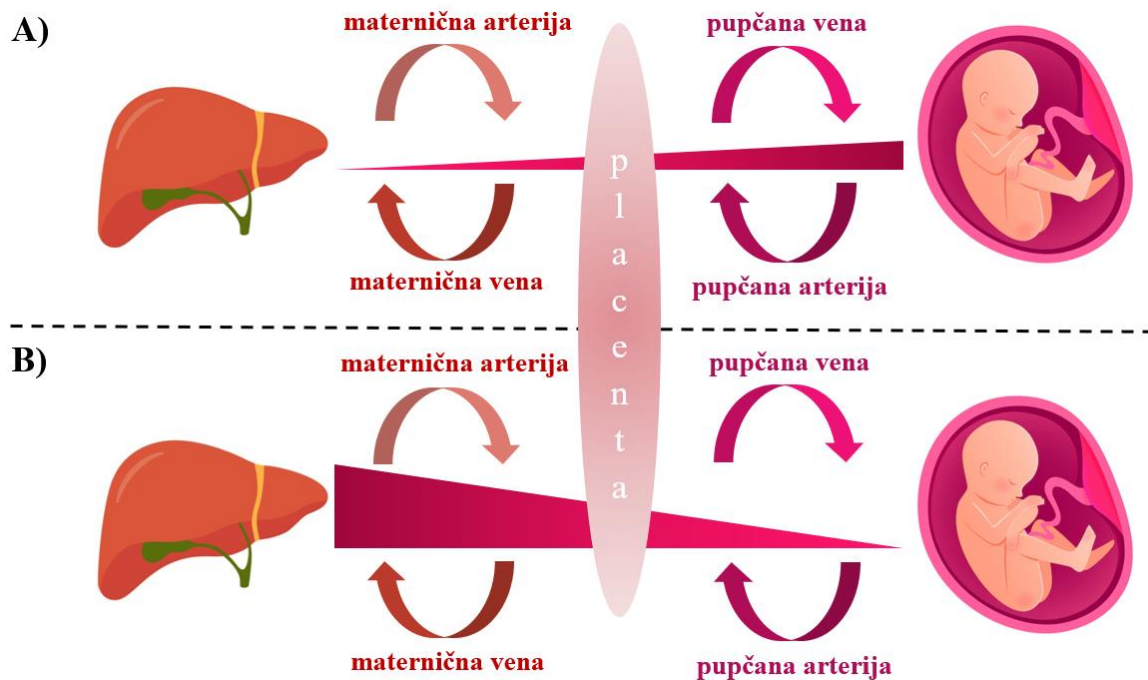
Jedan od najprepoznatljivijih simptoma intrahepatičke kolestaze u trudnoći je pruritus, odnosno svrbež koji se javi u trećem tromjesečju. Svrbež se često pojačava kako trudnoća napreduje, a većinom potpuno nestane unutar 48 sati nakon poroda. Iako većina trudnica razvije simptome ICP-a oko 30.-og tjedna trudnoće, najranije dijagnosticirani slučajevi su prijavljeni u 8.-om tjednu trudnoće (Kenyon i sur., 2002; Berg i sur., 1986). Svrbež je najčešći u području dlanova i tabana, ali može se javiti u drugim dijelovima tijela (Geenes i Williamson, 2009). Osim ogrebotina na koži koje su uzrokovane češanjem, drugi dermatološki poremećaji nisu zamijećeni.

Rjeđi simptomi ICP-a su abdominalna bol, mučnina i povraćanje, a moguća je pojava blage žutice otprilike četiri tjedna nakon pojave pruritusa. Poremećena apsorpcija lipida uzrokuje nedostatak vitamina topljivih u mastima. Nedostatak vitamina K i produljeno trombinsko vrijeme kod majke uzrokuju poremećaje hemostaze koji su temelj za nastanak hemoragija i krvarenja u centralni živčani sustav (CŽS) fetusa (Kondrackiene i Kupcinskas, 2008).

1.2.3. Posljedice za fetus

Fetus je sposoban sintetizirati ŽK pri kraju trećeg tromjesečja zbog čega koncentracija ŽK u fetalnom krvotoku raste i veća je u odnosu na majčin krvotok u zdravoj trudnoći (Colombo

i sur., 1985). Smatra se da se ŽK iz fetalnog krvotoka prenose transplacentarno preko pupčane arterije i maternične vene u majčin krvotok da bi se izlučile iz organizma (Slika 5A). U intrahepatičkoj kolestazi, koncentracije ŽK u serumu majke rastu od 2 do 20 puta iznad gornje granice referentnog intervala. U tom slučaju je primijećen i porast koncentracije ŽK u fetalnom krvotoku koji je ipak značajno nižeg obima (Shaw i sur., 1982; Reyes i Sjövall, 2000). Odnosno, transplacentarni gradijent koncentracije ŽK je obrnut u ICP u usporedbi sa zdravom trudnoćom (Slika 5B). Pretpostavlja se da koncentracija ŽK u fetalnom krvotoku, iako samo blago povišena u ICP, uzrokuje komplikacije ove bolesti (Williamson i sur., 2011).



Slika 5. Shematski prikaz gradijenta koncentracije ŽK u majčinom i fetalnom krvotoku i prijenosa ŽK preko placente. **A)** U zdravoj trudnoći je fetalna koncentracija ŽK blago povećana u odnosu na koncentraciju ŽK u majčinom serumu. **B)** U ICP je koncentracija ŽK u serumu majke značajno veća nego u fetalnom krvotoku (prema Williamson i sur., 2011).

Studije provedene na životinjama pokazale su moguća oštećenja placente u kolestazi, a o fenotipu placente ovise brojne histološke promjene. Sve histološke promjene placente koje nastaju u ICP su prevenirane pravovremenim tretiranjem bolesti s ursodeoksikolnom kiselinom koja je jedan od glavnih terapijskih izbora u intrahepatičkoj kolestazi (Serrano i sur., 2003).

Komplikacije intrahepatičke kolestaze mogu biti fatalne za fetus, a rizik od komplikacija korelira s koncentracijom ŽK u serumu majke (Castaño i sur., 2006). ICP se

povezuje s povećanim rizikom od preuranjenog poroda, abnormalnostima srčanog ritma fetusa, pojave mekonija u plodnoj vodi, fetalne hipoksije i intrauterine smrti fetusa (Fisk i Storey, 1988). Dixon i sur. (2016) pretpostavljaju da postoji poveznica između koncentracije ŽK i srčanih aritmija fetusa, kao i placentarne disfunkcije, a Williamson i sur. (2011) postavljaju hipotezu da je uzrok srčanih aritmija fetusa vezanje ŽK na membranske receptore srca djeteta.

ŽK utječu na povećani rizik preuranjenog poroda zbog interferencije sa signalnim putevima prostaglandina, te na taj način potiču motilitet crijeva fetusa što rezultira pojavom mekonija u plodnoj vodi. Nije sigurno je li riječ o primarnom učinku ŽK ili se radi o sekundarnim posljedicama njihove citotoksičnosti (Dixon i sur., 2016). Studija koju su proveli Germain i sur. (2003) pokazala je da uzrok preuranjenog poroda u ICP može biti povećana ekspresija i osjetljivost oksitocinskih receptora u mišićima maternice zbog povećane koncentracije ŽK.

1.2.4. Laboratorijska dijagnostika

Ukupne ŽK su trenutno najosjetljiviji biokemijski marker koji se koristi za postavljanje dijagnoze intrahepatičke kolestaze u trudnoći. Kod zdravih trudnica je koncentracija ŽK otprilike ista kao kod žena koje nisu trudne. Iako postoji blagi porast koncentracije ŽK u trudnoći, on je zanemariv, a koncentracija ŽK od 10 $\mu\text{mol/L}$ smatra se granična za postavljanje dijagnoze (Geenes i sur., 2014). Ako su koncentracije ŽK iznad 40 $\mu\text{mol/L}$, rizik komplikacija fetalnog razvoja se povećava (Kawakita i sur., 2015).

Iako je zamijećen porast serumskih aktivnosti alanin aminotransferase (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST), enzimska aktivnost gama-glutamil transferaze (GGT) najčešće ostaje unutar referentnog intervala. U samo 10% slučajeva ICP je zabilježena patološka aktivnost GGT kod trudnica koje su imale veća jetrena oštećenja (Milkiewicz i sur., 2003). Koncentracija bilirubina u serumu je rijetko izvan referentnog intervala i ne koristi se kao marker ICP.

Osim ŽK, kao osjetljiv, visoko specifičan i robustan dijagnostički marker ICP može se koristiti serumska aktivnost autotaksina. Autotaksin je lizofosfolipaza D koja je važna za motilitet stanica, proliferaciju i samonavođenje limfocita. Aktivnost autotaksina raste u trudnoći, a porast aktivnosti pozitivno korelira s tjednom trudnoće. U trudnoći autotaksin potiče angiogenezu i razvoj živčanog sustava tijekom embriogeneze. Autotaksin se može koristiti kao marker za diferenciranje uzroka pruritusa u trudnoći budući da je značajan porast aktivnosti zamijećen samo kod trudnica kod kojih je pruritus bio uzrokovan ICP-om (Kremer i sur., 2015).

1.3. Verifikacija metode

Prije uvođenja nove metode/analizatora potrebno je evaluirati ili verificirati novu metodu. Verifikaciju je također potrebno provesti ako je prisutno više analitičkih sustava u laboratoriju. Značajke metode propisuje proizvođač reagensa, a svrha njihove prethodne evaluacije je procjena analitičke kvalitete metode koja se uvodi u rutinski rad. Verifikacijom se utvrđuje da se promjena metode neće odraziti na laboratorijske nalaze pacijenata i da će nalazi ostati pouzdani.

Osnovne značajke metode koje se verificiraju prije uvođenja metode u rutinski rad su preciznost, istinitost, linearnost i referentni intervali. Ovisno o specifičnosti pretrage, ispituju se i druge značajke poput stabilnosti, granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD), granice kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ), interferencija i učinka *carry-over-a*.

Prije početka verifikacije potrebno je upoznati novu metodu i/ili analitički sustav i postaviti analitičke ciljeve, tj. kriterije za procjenu prihvatljivosti metode. Tijekom postupka verifikacije metode se provode eksperimenti i ispitivanja svake značajke, a statističkom obradom rezultata se procjenjuje analitička pogreška metode. Unaprijed zadani analitički kriteriji se uspoređuju s rezultatima verifikacije na temelju čega se donosi odluka o (ne)uvođenju nove metode u rutinski rad laboratorija (Šimundić, ured., 2013).

1.3.1. Metoda određivanja žučnih kiselina

Visoko osjetljiva metoda za određivanje koncentracije ŽK u serumu ili plazmi je spektrofotometrijska enzimatska metoda na 404 nm. ŽK se prevode u oksosteroide na poziciji C₃ uz nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), tionikotinamid adenin dinukleotid (tio-NAD⁺) i enzim 3 α -hidroksisteroid dehidrogenazu (3 α -HSD).

Hidroksilna skupina na poziciji C₃ u strukturi svih fiziološki prisutnih ŽK je u α -konfiguraciji zbog čega su ŽK podložne djelovanju enzima 3 α -HSD. 3 α -HSD oksidira primarne i sekundarne ŽK do odgovarajućih 3 α -oksosteroida uz koenzim tio-NAD⁺ koji se reducira do tio-NADH. Porast apsorbancije zbog nastanka reduciranog koenzima tio-NADH mjeri se na 404 nm i proporcionalan je koncentraciji ukupnih ŽK u serumu ili plazmi (Zhang i sur., 2004; Sentinel, Total Bile Acids Liquid, REF1700201 – 2.0/02, 2020/06/24).

1.4. Validacija referentnog intervala

Rezultati laboratorijskih pretraga imaju važnu ulogu u donošenju medicinske odluke. Objektivna i racionalna interpretacija nalaza direktno utječe na postavljanje dijagnoze, procjenu rizika, prognozu i praćenje učinka terapije .

Fiziološke promjene, genetika, životne navike i patofiziološka stanja odražavaju se na sastav biološkog materijala. Konstantne promjene u organizmu su rezultat kombinacije raznih čimbenika istovremeno. Zato je u procesu donošenja medicinske odluke potrebno znati koje su to „normalne“ ili „referentne“ vrijednosti.

Izrada referentnih vrijednosti i intervala se provodi na velikom broju „zdravih“ ispitanika. Potrebno je odabrati referentne osobe koje čine referentnu populaciju, referentni uzorak u kojem se određuju referentne vrijednosti koje pokazuju referentnu distribuciju iz koje se zatim izračunavaju donje i gornje referentne granice koje omeđuju referentni interval (Kolić i sur., 2017).

Razlikuju se dva pristupa izrade referentnog intervala: *a priori* i *a posteriori*. U *a priori* pristupu, kriteriji za odabir i uključivanje referentnih pojedinaca u studiju se postavljaju prije uzorkovanja. *A posteriori* pristupom se referentni pojedinci odabiru iz laboratorijskih podataka dobivenih nakon njihove laboratorijske obrade. Odnosno, *a posteriori* pristup se potpuno oslanja na mogućnost razlikovanja „zdravih“ i „bolesnih“ pojedinaca na temelju kliničkih tehnika i metoda ili statističkih testova.

Prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) EP28-A3C:2010 Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, cijeli postupak izrade referentnog intervala *a priori* pristupom mora imati prethodno definirani protokol koji obuhvaća iduće korake i postupke:

- otkrivanje analitičkih interferencija i izvora bioloških varijabilnosti na temelju literaturnih podataka,
- definiranje kriterija uključenja i isključenja referentnih ispitanika na temelju kojih se sastavlja upitnik,
- izrada informiranog pristanka za sudjelovanje u studiji,
- razvrstavanje referentnih ispitanika u podskupine prema ispunjenom upitniku,
- isključivanje ispitanika koji ne pripadaju referentnoj populaciji prema ispunjenom upitniku,
- definiranje broja referentnih ispitanika koji će biti uključeni u studiju,

- informiranje i priprema referentnih ispitanika za pravilno uzorkovanje,
- uzorkovanje biološkog materijala referentnih ispitanika i postupanje s uzorcima sukladno dobroj laboratorijskoj praksi,
- analiza i određivanje referentnih vrijednosti analita u optimalnim uvjetima,
- analiza distribucije referentnih vrijednosti i priprema histograma raspodjele,
- identificiranje mogućih pogrešaka i vrijednosti koje odstupaju (engl. *outliers*),
- odabir metoda za izračun referentnog intervala i njegovih granica, a ako je potrebno podijeliti referentni interval u podskupine na temelju kriterija uključenja i
- dokumentiranje provedenih postupaka i koraka

1.4.1. Odabir referentnih pojedinaca

Zdravlje je relativan pojam kojeg je gotovo nemoguće jednoznačno definirati, a još veći problem predstavlja odabir zdravih pojedinaca za studiju izrade referentnog intervala. Prilikom odabira referentnih ispitanika važno je isključiti bolesti koje bi mogle utjecati na izmjerene vrijednosti analita. Kriteriji isključenja i uključenja koji se postavljaju prije početka uzorkovanja su jedan od načina preliminarnog razlikovanja „zdravih“ od „nezdravih“ pojedinaca. Kriteriji se navode u obliku pitanja u upitniku kojeg ispitanici ispunjavaju i na temelju kojih se okvirno procjenjuje zdravstveni status. Važno je naglasiti da različite studije izrade referentnog intervala ne moraju koristiti iste kriterije, ovisno o analitu i populaciji. Ono što u nekim studijama može biti smatrano kriterijem isključenja, u nekoj drugoj studiji može biti kriterij uključenja, i obrnuto.

Upitnik se sastavlja nakon jasnog određivanja kriterija uključenja i isključenja te sadržava sve navedene kriterije koji su oblikovani u pitanja. Pitanja moraju biti jasna, a predloženi odgovori na njih moraju biti jednostavni, npr. DA/NE. Uz upitnik se preporuča dodatno provesti pregled liječnika, laboratorijske testove ili druge dijagnostičke postupke.

Kriteriji isključenja su one navike ili bolesti pojedinca zbog kojih ispitanik neće biti uključen u studiju zato što se ne može smatrati „zdravim“, odnosno referentnim. Primjeri kriterija isključenja su konzumacija alkohola, pušenje, nedavna hospitalizacija, niski ili visoki krvni tlak, laktacija, pretilost, korištenje opojnih sredstava, korištenje oralnih kontraceptiva, terapija određenim lijekovima i pripravcima, nedavna operacija, i sl.

Kriteriji uključenja su one karakteristike koje odabrane referentne pojedince svrstavaju u podrazrede. Najvažniji kriteriji uključenja su dob i spol. Drugi kriteriji uključenja

prilagođavaju se zahtjevima studije. Neki primjeri su krvna grupa, geografska lokacija, rasa, prehrambene navike, faza menstrualnog ciklusa i tromjesečje trudnoće.

1.4.2. Predanalitički i analitički čimbenici

Rezultati analiza uzoraka odabrane referentne populacije moraju obuhvatiti sve predanalitičke i analitičke izvore varijabilnosti koje bi mogle utjecati na ishod testa. Njihovom pažljivom kontrolom (priprema ispitanika prije uzorkovanja, uzorkovanje, obrada uzorka, kvalitetni analitički sustav i metoda određivanja) poželjno je izvore varijabilnosti svesti na minimum i smanjiti utjecaj na donošenje medicinske odluke.

Analitička faza mora sadržavati detaljni opis metode s njenim karakteristikama (preciznost, točnost, linearnost, utjecaj interferencija, stabilnost) i opis ostalih sastavnih dijelova analitičkog procesa (oprema, reagensi, kalibratori). Kontrola kvalitete analitičkog dijela mora se provoditi isto kao u rutinskom radu, a dokumentiranjem cijelog procesa se osigurava ponovljivost za druge korisnike koji će primijeniti referentni interval u svom laboratoriju.

1.4.3. Statistička obrada rezultata

Referentni interval obuhvaća vrijednosti između donje i gornje referentne granice, uključujući i vrijednosti samih granica. Prema preporukama struke, najčešće upotrebljavani oblik referentnog intervala je 95%-tni interval. Središnjih 95% vrijednosti je omeđeno 2,5 i 97,5 percentilom, odnosno granicama referentnog intervala. Granice referentnog intervala označavaju one vrijednosti od kojih je 2,5% izmjerenih vrijednosti manje ili jednako donjoj granici i 2,5% veće ili jednako gornjoj granici.

Izrada histograma je prvi korak statističke obrade rezultata. Na apscisu se nanose izmjerene vrijednosti, na ordinatu učestalost ili frekvencija, a vizualnim pregledom histograma jednostavno se utvrđuju vrijednosti koje odstupaju (engl. *outliers*) koje mogu biti izvor pogrešaka u mjerenju. Idući korak je ispitivanje normalnosti raspodjele referentnih vrijednosti primjenom nekog od statističkih testova, a ako smatramo da interval treba razdvojiti u podskupine, za svaku podskupinu se ispituje normalnost raspodjele.

Ispitivanje vrijednosti koje značajno odstupaju se može provoditi metodom po Tukeyu ako vrijednosti prate normalnu razdiobu. U suprotnom, kada vrijednosti ne prate normalnu razdiobu što je najčešće slučaj, rezultati se obrađuju neparametrijskom metodom, a vrijednosti

koje odstupaju se utvrđuju Dixon-Reedovim pravilom (D/R pravilo). Prema pravilu, računa se omjer D/R gdje je D apsolutna razlika između potencijalne vrijednosti koja odstupa i sljedeće vrijednosti po veličini, a R je raspon svih mjerenja uključujući i vrijednosti koje odstupaju. Izmjerenu vrijednost za koju se sumnja da odstupa se može ukloniti ako je razlika D za jednu trećinu veća ili jednaka rasponu R. Nedostatak ove metode je nemogućnost otkrivanja ostalih vrijednosti koje odstupaju koje se nalaze na istoj strani raspodjele ako najudaljenija vrijednost koja odstupa nije statistički značajna. Ako se na istoj strani raspodjele nalazi više vrijednosti koje odstupaju, statistička značajnost odstupanja se provjerava za onu vrijednost koja je najbliža referentnoj granici pri čemu se privremeno uklanjaju ostale vrijednosti koje odstupaju. Ako se za tu vrijednost pokaže da je odstupanje statistički značajno, tada se i ostale privremeno uklonjene vrijednosti mogu smatrati *outlierima*.

CLSI smjernice preporučuju neparametrijsku metodu za izračun referentnih intervala. Prema smjernici, minimalni broj uzoraka bi trebao biti 120. Metoda ne uzima u obzir normalnost raspodjele, što je prednost budući da mala skupina analita prati normalnu raspodjelu. Neparametrijska metoda svakoj izmjerenoj vrijednosti dodjeljuje rang, primjerice najmanjoj izmjerenoj koncentraciji dodjeljuje se rang 1, sljedećoj koncentraciji po veličini rang 2 itd. Izračuna se rang koji se nalazi na 2,5 i 97,5 percentilu i pripadajuće izmjerene vrijednosti koje označavaju referentne granice. Metoda grube procjene (engl. *robust method*) nalikuje neparametrijskoj metodi, ali umjesto srednje vrijednosti koristi položajne mjere, najčešće medijan te apsolutnu devijaciju oko medijana kao mjeru raspršenja. Prema CLSI smjernicama, preporuka je koristiti ovu metodu kada je broj uzoraka manji od 120 i ako ne postoji kriterij za najmanji broj uzoraka. Intervali pouzdanosti referentnih granica koriste za procjenu je li broj uzoraka zadovoljavajući

Statističkim programima moguće je izračunati 90%-tne intervale pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) referentnih granica. Poželjno je da 90%-tni CI budu što uži zato što je širina intervala obrnuto proporcionalna preciznosti referentne granice. Preporučena širina 90%-tnog intervala pouzdanosti trebala bi biti barem 0,2 puta manja od širine samog referentnog intervala. Ako je CI referentnih granica preširok, potrebno je povećati broj uzoraka za postizanje veće preciznosti određivanja referentnih granica.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Široka primjena RI u laboratoriju omogućuje interpretaciju rezultata laboratorijskih pretraga i donošenje prikladne medicinske odluke. Rezultati laboratorijskih pretraga se uspoređuju s RI koji su dobiveni ispitivanjem „zdravih“ ili referentnih pojedinaca a usporedbom vrijednosti se procjenjuje i tumači nalaz. RI se mogu razlikovati među populacijama, stoga je važno odrediti pripadajući RI za svaku populaciju ako je on od kliničke važnosti.

Cilj ovog rada bio je izraditi RI za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće u Hrvatskoj koji još nije bio ustanovljen na ovom području. Žučne kiseline su trenutno najosjetljiviji i najspecifičniji biološki marker ICP, bolesti koja se očituje kao pruritus na dlanovima i tabanima u trećem tromjesečju trudnoće. Nepravovremena dijagnoza i početak liječenja mogu uzrokovati posljedice opasne po dijete: abnormalnosti srčanog ritma fetusa, fetalnu hipoksiju, prijevremeni porod i intrauterinu smrt. Budući da nije postojala jedinstvena laboratorijska pretraga za procjenu rizika i dijagnozu ICP, izradom RI za žučne kiseline u populaciji trudnica dijagnoza ICP i rizik bolesti mogu na vrijeme biti ustanovljeni. Specifični ciljevi validacije RI bili su odabrati referentne ispitanice na temelju kriterija uključenja i isključenja, prikupiti njihove uzorke seruma, odrediti koncentraciju ŽK u uzorcima, utvrditi vrijednosti koje odstupaju, napraviti statističku obradu rezultata i odrediti RI.

Koncentracija ŽK se nije određivala u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ prije početka validacije RI pa je bilo potrebno uvesti novu metodu u analitički sustav i provesti njenu verifikaciju. Specifični ciljevi verifikacije metode bili su ispitati stabilnost, preciznost, linearnost, točnost i interferenciju lipemije.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Verifikacija metode

Verifikacija stabilnosti, preciznosti, točnosti (usporedba metoda), linearnosti i referentnog intervala, te ispitivanje interferencije lipemije provodila se na automatskom analizatoru Siemens Atellica Solution CH 930 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Njemačka) u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u periodu od rujna 2021. do siječnja 2022.

Žučne kiseline su se određivale spektrofotometrijski pri 404 nm uz korištenje reagensa s pripadajućim kalibratorom Total Bile Acids Liquid (REF1700201 – 2.0/02, 2020/06/24, Sentinel CH. SpA, Milano, Italija), kontrolnog materijala Total Bile Acids Control Set (REF1600201 – 1.0/ 02, 2018/04/13, Sentinel CH. SpA, Milano, Italija), epruveta za uzorkovanje s aktivatorom zgrušavanja Vacutest 4 mL (Kima, Padova, Italija) i plastičnih epruveta zapremine 5 mL s čepom za pohranu alikvotiranih uzoraka seruma.

Unutarnja kontrola kvalitete (UKK) za metodu za određivanje koncentracije žučnih kiselina provodila se svakodnevno pomoću komercijalno dostupnog kontrolnog materijala (QC, engl. *quality control*) Total Bile Acids Control Set.

Pregledom dostupne literature nije bilo moguće pronaći podatke o biološkoj varijabilnosti žučnih kiselina. Stoga je odlučeno za kriterij prihvatljivosti koristiti arbitrarni kriterij od 10%, osim u slučaju ispitivanja preciznosti gdje je korišten kriterij od 7% koji je naveo proizvođač reagensa u deklaraciji za značajku preciznosti.

3.1.1. Stabilnost

Proizvođač navodi da je stabilnost ŽK u uzorcima seruma ili plazme 1 dan na 20 °C, 7 dana na 2-8 °C i 12 mjeseci na -20 °C. Prema navedenim podacima postavljen je vlastiti protokol za ispitivanje stabilnosti ŽK u uzorcima seruma – provedena je verifikacija stabilnosti 2 dana na 20 °C, 14 dana na 2-8 °C i 28 dana na -20 °C prema smjernicama Europske federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, EFLM): Checklist for Reporting Stability Studies (CRESS).

Stabilnost se ispitivala u 30 uzoraka seruma, po 10 uzoraka pri svakoj temperaturi pohrane (20, 2-8 i -20 °C) koji su uzorkovani u optimalnim predanalitičkim uvjetima. Svaki uzorak seruma dobiven je uzorkovanjem krvi pacijenta iz kubitalne vene u epruvetu s aktivatorom zgrušavanja te je ostavljen da se krv zgruša pri sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta prije centrifugiranja.

Svaka skupina od 10 uzoraka za određenu temperaturu pohrane formirana je na način da koncentracija ŽK u uzorcima obuhvaća cijeli analitički mjerni raspon, odnosno prikupljeno je u prosjeku pet uzoraka pacijenata kod kojih se pretpostavljalo da imaju koncentraciju ŽK unutar referentnog intervala i pet uzoraka pacijenata kod kojih se očekivala koncentracija ŽK iznad gornje granice referentnog intervala. Uzorci s koncentracijama unutar referentnog intervala bili su odabrani iz ostalih uzoraka pacijenata koji su imali malu vjerojatnost povišenih vrijednosti žučnih kiselina u serumu, što je bilo utvrđeno pregledom povijesti bolesti i anamneze. Uzorci s koncentracijama žučnih kiselina iznad gornje granice referentnog intervala bili su ostali uzorci pacijenata Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ kod kojih se pregledom anamneze i povijesti bolesti utvrdilo da imaju veliku vjerojatnost povišenih koncentracija žučnih kiselina u serumu.

Svaki uzorak prve grupe od 10 alikvotiran je i pohranjen na sobnoj temperaturi (24,6 °C u prosjeku), a temperatura je praćena svaki dan termohidrometrom (Beurer GmbH, Söflinger, Njemačka). Iduća skupina od 10 ostalih uzoraka također je alikvotirana i pohranjena u hladnjak s integriranom automatskom kontrolom temperature (Smeg S.p.A, Guastalla, Italija). Temperatura hladnjaka evidentirana je dvaput dnevno svaki dan, a prosječna temperatura pohrane alikvotiranih uzoraka bila je 4,4 °C. Posljednja skupina od 10 uzoraka seruma alikvotirana je i pohranjena je na -17,8 °C u prosjeku u ledenicu (Infrico Medcare, Lucena, Španjolska) s integriranom automatskom kontrolom temperature. Kao u slučaju druge skupine, temperatura ledenice je evidentirana svakog dana dvaput dnevno. Koeficijenti varijacije (engl. *coefficient of variation*, CV%), odnosno preciznost UKK bila je 3,72% za prvu razinu kontrole i 3,63% za drugu tijekom perioda ispitivanja stabilnosti. Ciljna vrijednost prve razine kontrole bila je 12,7 μmol/L s dozvoljenim rasponom odstupanja od 10,4-15,0 μmol/L. Ciljna vrijednost druge razine kontrole bila je 101,6 μmol/L s dozvoljenim rasponom odstupanja od 83,3-119,9 μmol/L.

Koncentracija ŽK određivala se u svakom alikvotu seruma u duplikatu. U jednom alikvotu svakog uzorka određena je inicijalna koncentracija ŽK neposredno nakon uzorkovanja i centrifugiranja. U preostalim alikvotima je koncentracija određena nakon definiranog vremenskog perioda, ovisno o temperaturi pohrane: za procjenu stabilnosti na sobnoj temperaturi jednom dnevno tijekom dva dana, za procjenu stabilnosti uzoraka pohranjenih u hladnjaku svaka dva dana tijekom 14 dana, a za uzorke pohranjene u ledenici jednom u sedam dana tijekom 28 dana.

Prema CRESS smjernicama, rezultati ispitivanja stabilnosti predstavljeni su kao razlika izražena u postotcima (engl. *percentage difference*, PD%) između inicijalne koncentracije i

serije rezultata mjerenja napravljenih nakon određenog vremena u alikvotima seruma. Također, rezultati su prikazani jednadžbama nestabilnosti za svaku temperaturu pohrane.

3.1.2. Preciznost

Verifikacija preciznosti provodila se prema CLSI EP15-A3 User verification of precision and estimation of bias; approved guideline, third edition. Evaluacija preciznosti obuhvaćala je određivanje ponovljivosti (engl. *within-run*), međupreciznosti (engl. *between-run*) i ukupne preciznosti (engl. *within-laboratory*).

Ispitivanje preciznosti provodilo se u dva uzorka, jedan koncentracije ŽK unutar deklariranog RI i jedan koncentracije iznad gornje granice RI. Uzorak koncentracije ŽK unutar RI odabran je pregledom anamneze i povijesti bolesti pacijenta sa sistematskog pregleda, a uzorak patološke koncentracije BA bio je ostalni uzorak pacijenta sa Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ kod kojeg se pregledom anamneze i povijesti bolesti utvrdilo da ima veliku vjerojatnost povišene koncentracije ŽK u serumu.

Oba uzorka su bila podijeljena u pet alikvota koji su pohranjeni u hladnjaku na 2-8°C do analize. Preciznost metode provjeravala se mjerenjem koncentracije ŽK u alikvotima oba uzorka seruma pet uzastopnih dana u peteroplikatu. Dobiveni CV% za ponovljivost, međupreciznost i ukupnu nepreciznost uspoređeni su s deklariranim kriterijem od 7% od strane proizvođača reagensa.

Tijekom pet dana u kojima se ispitala preciznost metode CV% unutarnje kontrole kvalitete (engl. *quality control*, QC) bio je 1,13% za prvu razinu kontrolnog uzorka čija je ciljna vrijednost 12,7 μmol/L (10,4-15,0) i 1,17% za drugu razinu čija je ciljna vrijednost 101,6 μmol/L (83,3-119,9).

3.1.3. Linearnost

Verifikacija linearnosti provodila se prema smjernici CLSI EP06-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach, a analitički mjerni raspon koji propisuje proizvođač i koji se verificirao je 1,0-180 μmol/l.

Za ispitivanje linearnosti metode pripremljeno je pet uzoraka koji su dobiveni miješanjem dva uzorka – jedan koncentracije unutar RI (uzorak N) i jedan blizu gornje granice analitičkog raspona kojeg je propisao proizvođač (uzorak P). Miješanjem navedena dva uzorka

u točno određenim volumnim omjerima postignuta su ravnomjerno raspoređena razrjeđenja duž linearnog raspona metode, a u svakom razrjeđenju koncentracija ŽK se određivala u duplikatu. Dobivene koncentracije ŽK u pet razrjeđenja su uspoređene s očekivanim koncentracijama koje su izračunate na temelju inicijalnih koncentracija u uzorcima N i P.

Za svaku dilucijsku točku zatim je izračunat apsolutni i relativni bias (%), kako preporučuju smjernice, uz uvjet da relativni bias ne bude veći od 10% što je postavljeno kao arbitrarni kriterij. Odnos između dobivenih i očekivanih koncentracija ŽK dobiven je Passing-Bablok regresijskom analizom.

3.1.4. Verifikacija referentnog intervala

Verifikacija RI provodila se prema smjernici CLSI EP28-A3C:2010 Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, third edition. Referentni interval naveden u deklaraciji proizvođača iznosi 1,0 – 6,0 $\mu\text{mol/L}$ za odrasle osobe, neovisno o spolu.

Za potrebe verifikacije RI, odabrano je dvadeset odraslih referentnih ispitanika koji su u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ obavljali sistematski pregled i pacijenti iz ambulante Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku kod kojih se pregledom anamneze i povijesti bolesti nije utvrdila povijesti bolesti hepatobilijarnog trakta. Ispitivanje se provodilo tri dana tijekom kojih su CV% vrijednosti unutarnje kontrole kvalitete bile 1,57% za prvu razinu kontrole i 2,75% za drugu razinu. Ciljna vrijednost prve razine kontrole bila je 12,7 $\mu\text{mol/L}$ s dozvoljenim rasponom odstupanja od 10,4-15,0 $\mu\text{mol/L}$. Ciljna vrijednost druge razine kontrole bila je 101,6 $\mu\text{mol/L}$ s dozvoljenim rasponom odstupanja od 83,3-119,9 $\mu\text{mol/L}$.

3.1.5. Točnost – usporedba metoda

Verifikacija točnosti metode provodila se prema smjernici CLSI EP09-A3: Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, usporedbom dva analitička sustava koji koriste istu metodu određivanja ŽK (spektrofotometrija na 404 nm).

Šezdeset jedan uzorak koncentracija ŽK raspoređenih kroz cijeli mjerni raspon metode prvo su analizirani na automatskom biokemijskom analizatoru Abbot Architect (Abbot Laboratories, Chicago, Illinois, SAD) u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Uzorci su bili pohranjeni u hladnjaku na temperaturi od 2-8°C do

dopreme u Kliničku bolnicu „Sveti Duh“ unutar sedam dana gdje su analizirani na analizatoru Siemens Atellica Solution CH 930.

Analiza uzoraka u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ provedena je kroz tri tjedna u tri serije. Tijekom tog perioda je CV% za dvije razine unutarnje kontrole kvalitete bio 3,86%, odnosno 3,54%. Ciljna vrijednost prve razine kontrole bila je 12,7 $\mu\text{mol/L}$ s dozvoljenim rasponom odstupanja od 10,4-15,0 $\mu\text{mol/L}$. Ciljna vrijednost druge razine kontrole bila je 101,6 $\mu\text{mol/L}$ s dozvoljenim rasponom odstupanja od 83,3-119,9 $\mu\text{mol/L}$.

3.1.6. Interferencija lipemije

Interferencija lipemije ispitivala se u dva serumska pool-a koji su pripremljeni od ostatnih uzoraka pacijenata. Za prvi pool (pool N) odabrani su uzorci pacijenata za koje se pregledom anamneze i povijesti bolesti pretpostavljalo da imaju nisku koncentraciju ŽK u serumu. Drugi pool (pool P) nastao je miješanjem ostatnih uzoraka pacijenata koji su imali veliku vjerojatnost povišenih koncentracija ŽK u serumu. Dakle, dobivena krajnja koncentracija ŽK u pool-u N bila je unutar RI, a u pool-u P iznad gornje granice RI. Svaki pool je vorteksiran i podijeljen u 6 alikvota.

Alikvotima oba pool-a dodana je SMOFlipid® 20% emulzija (Fresenius Kabi, Toronto, Kanada) u određenim volumnim omjerima na način da je krajnji volumen smjese pool-a i emulzije 1 mL, a protokol je opisan u Tablici 1. Postignuta je rastuća koncentracija SMOFlipid® 20% emulzije u uzorcima, svaki uzorak analiziran je u triplikatu, a srednja vrijednost triplikata iskorištena je za statističku obradu podataka. Uz koncentraciju ŽK, u svakom uzorku određivala se koncentracija triglicerida (Tg) i indeks lipemije na automatskom analizatoru Atellica Solution CH 930.

Tablica 1. Protokol za miješanje alikvota pool-a seruma sa SMOFlipid® 20% emulzijom

| Broj uzorka: | Volumen pool-a seruma (μL): | Volumen SMOFlipid® emulzije (μL): | Koncentracija SMOFlipid® emulzije (g/L): |
|---------------------|--|--|---|
| 1 | 1000 | 0 | 0,0 |
| 2 | 995 | 5 | 1,0 |
| 3 | 990 | 10 | 2,0 |
| 4 | 975 | 25 | 5,0 |
| 5 | 950 | 50 | 10,0 |
| 6 | 900 | 100 | 20,0 |

3.1.7. Statistička obrada podataka

Rezultati stabilnosti, preciznosti, linearnosti i interferencije lipemije obrađeni su u računalnom programu Microsoft Office Excel 2021 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Podatci dobiveni usporedbom metoda analizirani su Bland-Altman i Passing-Bablok regresijskom analizom koja je dostupna u MedCalc 12.5.0.0. (Ostend, Belgija) statističkom softveru.

3.2. Validacija referentnog intervala

Validacija referentnog intervala za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće provodila se u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ prema smjernici CLSI EP28-A3C:2010 Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, third edition. Izrada referentnog intervala je provedena *a priori* pristupom. Tijekom navedenog perioda je prikupljeno 118 uzoraka zdravih, referentnih trudnica koje su zadovoljile postavljene kriterije.

3.2.1. Odabir referentnih ispitanica

Referentne ispitanice odabrane su iz populacije hrvatskih trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće u području Grada Zagreba i Zagrebačke županije u dobi od 20 do 43 godine. Ispitanice su nakon redovnog ginekološkog pregleda popunile upitnik Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ pod nazivom „Upitnik za odabir referentnih ispitanica“ koji se nalazi u Prilogu 9.1. i potpisale pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju.

Uredna i jednoplodna trudnoća bez dotadašnjih komplikacija utvrđena je redovnim ginekološkim pregledom u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“. Dodatno je provjerena povijest bolesti hepatobilijarnog trakta, a trudnice s poviješću bolesti nisu bile uključene u studiju. Nakon redovnog ginekološkog pregleda provedene su dodatne biokemijske i hematološke laboratorijske pretrage u Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“. Ispitanice sa značajno povišenim aktivnostima jetrenih enzima (AST, ALT i GGT) u serumu (tri puta iznad gornje granice RI) su bile isključene iz studije. Takvi nalazi su upućivali na postojanje jetrene lezije u preeklampsiji. Sve

ispitanice koje su imale normalan ishod trudnoće bez evidentiranih komplikacija kod majke i novorođenčeta su bile uključene u studiju.

Svi osobni podatci ispitanica su zabilježeni (broj godina, zanimanje, visina, težina, tjedan trudnoće i predviđeni termin poroda) na temelju odgovora iz upitnika. Ispitanice koje su navele da su nekada primale kemoterapiju, da imaju dijabetes, gestacijski dijabetes ili povijest bolesti hepatobilijarnog trakta bile su isključene iz studije. Nedavna hospitalizacija unutar 4 tjedna je bio još jedan od faktora isključenja.

3.2.2. Predanalitički i analitički čimbenici

Ispitanice su mirno sjedile barem 30 minuta prije vađenja krvi. Krv se vadila u razdoblju od 7 do 12 sati, a svaki uzorak seruma trudnice dobiven je uzorkovanjem krvi ispitanice iz kubitalne vene u epruvetu s aktivatorom zgrušavanja Vacutest 4 mL (Kima, Padova, Italija) te je ostavljen da se krv zgruša pri sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta prije centrifugiranja. Nakon centrifugiranja, serumu su alikvotirani u plastične epruvete zapremine 5 mL s čepom za pohranu alikvotiranih uzoraka seruma. Uz jednu epruvetu s aktivatorom zgrušavanja, dodatno je vađena krv u još jednu epruvetu s aktivatorom zgrušavanja i jednu s EDTA antikoagulansom (Kima, Padova, Italija) za rutinske laboratorijske pretrage.

Žučne kiseline su se određivale spektrofotometrijski pri 404 nm iz alikvota seruma iz prve epruvete uz korištenje reagensa s pripadajućim kalibratorom Total Bile Acids Liquid i kontrolnog materijala Total Bile Acids Control Set na automatskom analizatoru Siemens Atellica Solution CH 930. Koncentracija ŽK određivala se u duplikatu u svakom uzorku seruma, a srednja vrijednost duplikata korištena je za statističku obradu. UKK za metodu za određivanje koncentracije ŽK provodila se svakodnevno na dvije razine tijekom trajanja studije pomoću komercijalno dostupnog QC materijala Total Bile Acids Control Set.

Uz koncentraciju žučnih kiselina, određeni su redovni biokemijski i hematološki parametri. Aktivnost AST, ALT, GGT, ALP te koncentracija ukupnog i konjugiranog bilirubina u serumu od biokemijskih pretraga su određene na biokemijskom analizatoru Siemens Atellica Solution CH 930 nakon centrifugiranja druge epruvete s aktivatorom zgrušavanja. Iz epruvete s EDTA antikoagulansom su se određivale kompletna krvna slika (KKS) i diferencijalna krvna slika (DKS) na analizatoru Siemens Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Njemačka).

3.2.3. Statistička obrada podataka

Koncentracija ŽK, rezultati biokemijskih i hematoloških pretraga te podatci iz upitnika pohranjivani su u računalnom programu Microsoft Office Excel 2021 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Podatci za izradu RI su obrađeni pomoću statističkog softvera MedCalc 12.5.0.0. (Ostend, Belgija).

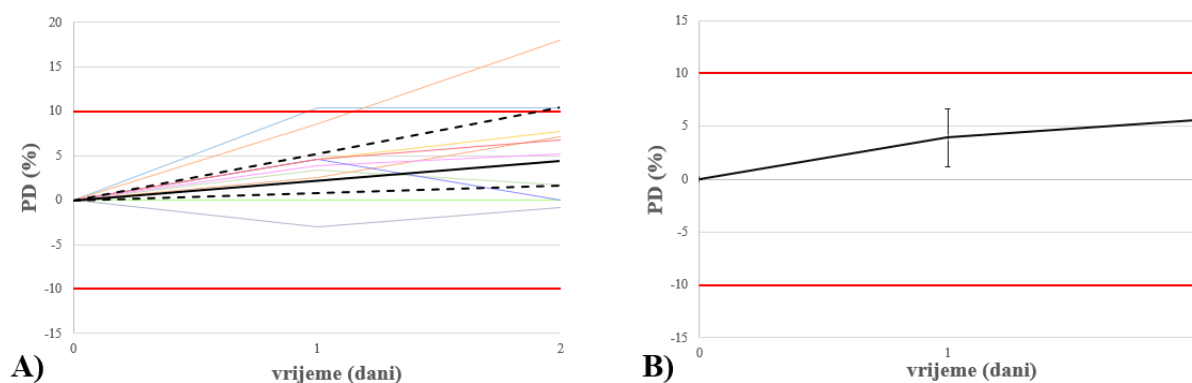
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Verifikacija metode

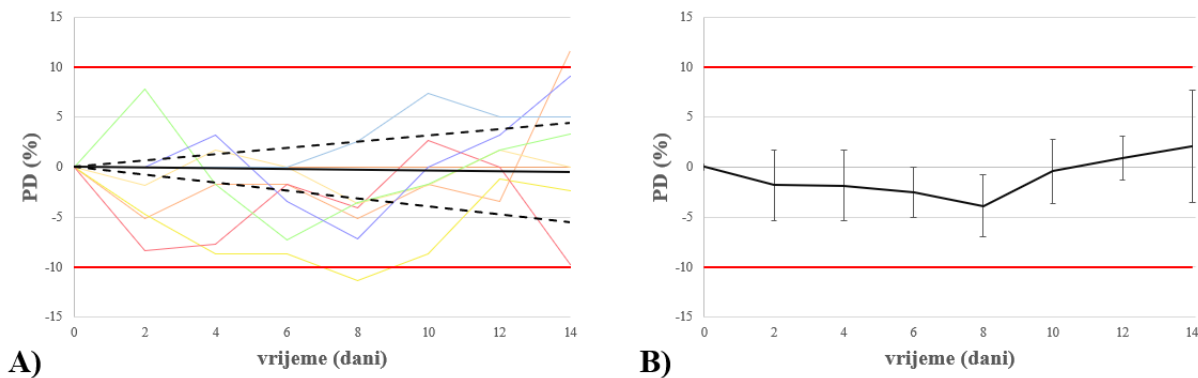
4.1.1. Stabilnost

Rezultati ispitivanja stabilnosti ŽK za svaku temperaturu pohrane prikazani su grafički jednadžbama nestabilnosti na Slikama 6, 7 i 8. U svakom uzorku pratila se koncentracija ŽK kroz vremenski period izražena kao PD% vrijednosti, a u svakoj vremenskoj točki prosječna PD% vrijednost korištena je za izračun jednadžbi nestabilnosti.

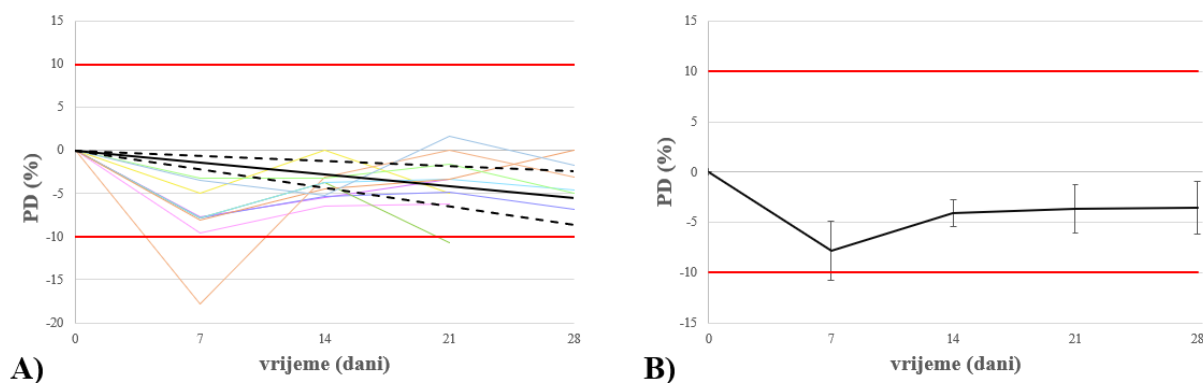
Za svaku temperaturu pohrane priložena su dva grafa s rezultatima, na grafu A) je jednadžba nestabilnosti opisana jednadžbom pravca uz prikaz stabilnosti svakog uzorka pacijenta, a na grafu B) je stabilnost u svakoj vremenskoj točki prikazana s 95%-tnim intervalom pouzdanosti prosječnih PD% vrijednosti koji bi se trebao nalaziti unutar intervala od -10% do 10% prema definiranom kriteriju prihvatljivosti.



Slika 6. Stabilnost ŽK u uzorcima seruma pohranjenim u plastičnim začepljenim epruvetama zapremine 5 mL na sobnoj temperaturi (prosječna izmjerena temperatura 24,6 °C). Na osi x je označeno vrijeme (duljina) pohrane u danima, a na osi y PD% tj. postotak odstupanja koncentracije izmjerene u određenoj vremenskoj točki u odnosu na izmjerenu inicijalnu koncentraciju. **A)** Jednadžba nestabilnosti (crna puna linija) izračunata je metodom najmanjih kvadrata ($y = 2,205 \times \text{vrijeme [dani]}$, $r = 0,963$). 95%-tni interval pouzdanosti označen je crnom isprekidanom linijom. Grafički prikazi kretanja izmjenjenih koncentracija za svaki pojedinačni uzorak seruma pacijenta su označeni obojenim linijama. **B)** Prikaz jednadžbe nestabilnosti koja je izračunata kao prosjek dobivenih rezultata uzoraka u određenoj vremenskoj točki (crna puna linija), te 95%-tni interval pouzdanosti za svaku vremensku točku (okomite crte). Kao maksimalna dozvoljena razlika je korišten arbitrarni kriterij od 10% što je prikazano crvenim punim linijama.



Slika 7. Stabilnost žučnih kiselina u uzorcima seruma pohranjenim u plastičnim začepljenim epruvetama zapremine 5 mL na temperaturi hladnjaka 4-8°C (prosječna izmjerena temperatura 4,4 °C). Na osi x je označeno vrijeme (duljina) pohrane u danima, a na osi y PD% tj. postotak odstupanja koncentracije izmjerene u određenoj vremenskoj točki u odnosu na izmjerenu inicijalnu koncentraciju. **A)** Jednadžba nestabilnosti (crna puna linija) izračunata je metodom najmanjih kvadrata ($y = -0,038 \times \text{vrijeme [dani]}$, $r = -0,234$). 95%-tni interval pouzdanosti označen je crnom isprekidanom linijom. Grafički prikazi kretanja izmjerenih koncentracija za svaki pojedinačni uzorak seruma pacijenta su označeni obojenim linijama. Rezultati za jedan od deset uzoraka su izbačeni iz obrade zbog niske inicijalne koncentracije žučnih kiselina. **B)** Prikaz jednadžbe stabilnosti koja je izračunata kao prosjek dobivenih rezultata uzoraka u određenoj vremenskoj točki (crna puna linija), te 95%-tni interval pouzdanosti za svaku vremensku točku (okomite linije). Kao maksimalna dozvoljena razlika je korišten arbitrarni kriterij od 10% što je prikazano crvenim punim linijama.



Slika 8. Stabilnost žučnih kiselina u uzorcima seruma pohranjenim u plastičnim začepljenim epruvetama zapremine 5 mL na temperaturi ledenice -20°C (prosječna izmjerena temperatura $-17,8^{\circ}\text{C}$). Na osi x je označeno vrijeme (duljina) pohrane u danima, a na osi y PD%, tj. postotak odstupanja koncentracije izmjerene u određenoj vremenskoj točki u odnosu na izmjerenu inicijalnu koncentraciju. **A)** Jednadžba nestabilnosti (crna puna linija) izračunata je metodom najmanjih kvadrata ($y = -0,190 \times \text{vrijeme [dani]}$, $r = -0,474$). 95%-tni interval pouzdanosti označen je crnom isprekidanom linijom. Grafički prikazi kretanja izmjerenih koncentracija za svaki pojedinačni uzorak seruma pacijenta su označeni obojenim linijama. **B)** Prikaz jednadžbe stabilnosti koja je izračunata kao prosjek dobivenih rezultata uzoraka u određenoj vremenskoj točki (crna puna linija), te 95%-tni interval pouzdanosti za svaku vremensku točku (okomite linije). Kao maksimalna dozvoljena razlika je korišten arbitrarni kriterij od 10% što je prikazano crvenim punim linijama.

Verificirana je stabilnost ŽK u serumu 2 dana na sobnoj temperaturi, 14 dana na temperaturi hladnjaka i 28 dana na temperaturi ledenice.

Pri sobnoj temperaturi primijećen je blagi porast koncentracije ŽK tijekom vremena, a 95%-tni intervali pouzdanosti su u svakoj vremenskoj točki ostali unutar granica prihvatljivosti (Slika 6B). Dakle, ŽK su stabilne u uzorcima seruma koji su pohranjeni 2 dana na sobnoj temperaturi.

Nije primijećena značajna promjena koncentracije ŽK u uzorcima koji su pohranjeni na temperaturi hladnjaka što je prikazano na Slici 7. Trend prosječnih PD% vrijednosti ne odstupa od nule značajno (Slika 7B), a 95% intervali pouzdanosti su u potpunosti u intervalu prihvatljivosti u svakoj vremenskoj točki. Koncentracija ŽK u uzorcima seruma ostaje stabilna u serumu koji je pohranjen u hladnjaku na temperaturi od $2-8^{\circ}\text{C}$ 14 dana.

Prosječne PD% vrijednosti za uzorke pohranjene u ledenici pokazale su blagi pad tijekom vremena iako su vrijednosti 95%-tnih intervala pouzdanosti uglavnom unutar dozvoljenih granica. U samo jednoj vremenskoj točki 95%-tni interval iskače izvan dozvoljenih granica (Slika 8B) zbog čega se može tvrditi da je riječ o *outlier* vrijednosti. Na Slici 8A vidljivo je da je u istoj vremenskoj točki PD% jednog uzorka značajno pao ispod donje dozvoljene granice što je uzrok odstupanja 95%-tnog intervala pouzdanosti. Stabilnost ŽK u uzorcima koji su pohranjeni u ledenici pada tijekom vremena vrlo sporo, a ŽK su stabilne 28 dana u uzorcima koji su pohranjeni u ledenici prema rezultatima ispitivanja.

4.1.2. Preciznost

Ispitivanje stabilnosti provodilo se u dva uzorka seruma pet dana u peteroplikatu, jedan prosječne koncentracije ŽK 5,0 $\mu\text{mol/L}$ i drugi prosječne koncentracije 123,5 $\mu\text{mol/L}$. Statističkom obradom podataka dobivene su vrijednosti ponovljivosti, međupreciznosti i ukupne preciznosti kako je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Rezultati ispitivanja preciznosti u dva uzorka seruma

| | Srednja vrijednost ($\mu\text{mol/L}$) | Ponovljivost (CV <i>within-run</i>) (%) | Međupreciznost (CV <i>between-run</i>) (%) | Ukupna preciznost (CV <i>within-laboratory</i>) (%) |
|-----------------|--|--|---|--|
| Uzorak 1 | 5,0 | 2,0 | 1,0 | 2,2 |
| Uzorak 2 | 123,5 | 0,9 | 1,5 | 1,7 |

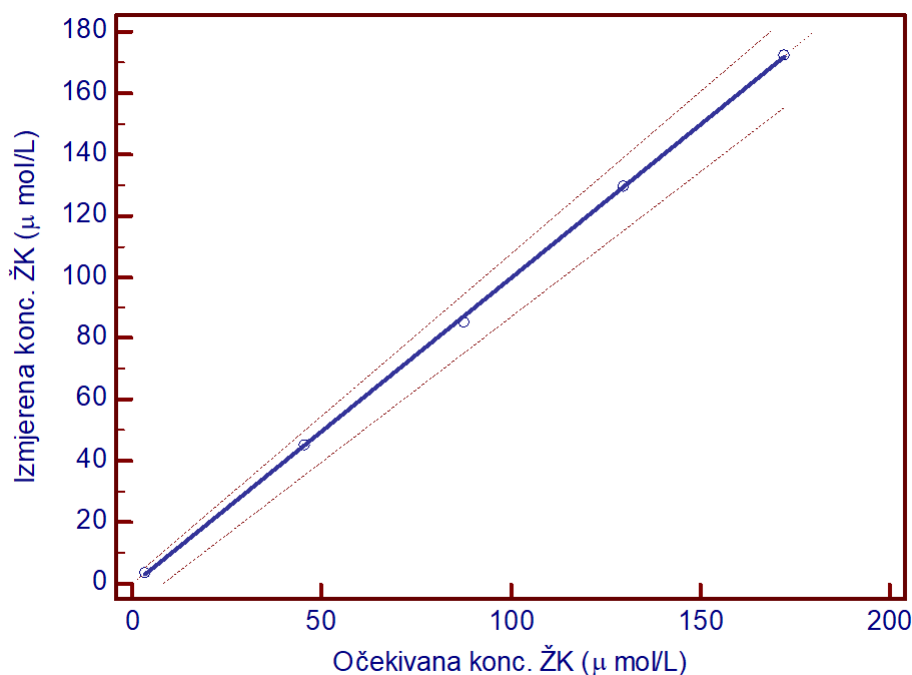
Prema rezultatima ispitivanja, sva tri parametra preciznosti su zadovoljili kriterij od 7% kojeg je deklarirao proizvođač reagensa na obje razine. Rezultati preciznosti se kreću od 0,9% za ponovljivost u uzorku s patološkom koncentracijom ŽK (uzorak 2), do 2,2% za ukupnu preciznost u uzorku 1.

4.1.3. Linearnost

Linearnost metode ispitivala se u pet dilucijskih točaka koje su pripremljene miješanjem dva uzorka seruma. Koncentracije ŽK u uzorcima koji su korišteni za pripremu razrjeđenja bile su 3,5 $\mu\text{mol/L}$ za prvi uzorak (uzorak N) i 172,1 $\mu\text{mol/L}$ za drugi (uzorak P), a uzorci su se

miješali u volumnim omjerima koji su naznačeni u Tablici 3. Uzorci 1 i 5 su čisti uzorci N i P, dok su uzorci 2, 3 i 4 smjese uzoraka N i P u ravnomjerno raspoređenim volumnim omjerima.

Rezultati ispitivanja linearnosti prikazani su grafički i tablično. Rezultati Passing-Bablok regresijske analize očekivanih i izmjerenih koncentracija ŽK prikazani su na Slici 9. Ovako obrađeni podatci pokazali su da je metoda linearna u rasponu koncentracija od 3,5 $\mu\text{mol/L}$ do 172,1 $\mu\text{mol/L}$.



Slika 9. Rezultati ispitivanja linearnosti dobiveni miješanjem dva uzorka seruma (jedan koncentracije 3,5 $\mu\text{mol/L}$ i drugi koncentracije 172,1 $\mu\text{mol/L}$) u različitim omjerima (3:1, 1:1 i 1:3) te mjerenjem koncentracije ŽK u čistim uzorcima dva navedena seruma i pripremljenim smjesama. Rezultati su obrađeni Passing-Bablok regresijskom analizom. Na osi x je prikazana izračunata očekivana koncentracija ŽK za svako razrjeđenje, a na osi y je prikazana izmjerena koncentracija ŽK. Regresijska linija je označena punom linijom, a interval pouzdanosti dugačkim crvenim isprekidanim linijama. Linija idealnog preklapanja izmjerenih koncentracija ($x=y$, engl. *identity line*) prikazana je kratkom crvenom isprekidanom linijom. Jednadžbom regresijske linije: $y = -0,5 (-7,7-1,1) + 1,0 (0,9-1,1) x$ verificirana je linearnost, odnosno očekivane i izmjerene koncentracije ŽK su usporedive zato što 95%-tni interval pouzdanosti za odsječak obuhvaća vrijednost 0, a za nagib pravca obuhvaća vrijednost 1. Prema Cusumovom testu linearnosti, P vrijednost je 0,93 i nije pokazano značajno odstupanje od linearnosti.

Uz linearnu regresijsku analizu, za svaku točku razrjeđenja izračunati su apsolutni i relativni (%) bias izmjerene i očekivane koncentracije prema CLSI smjernicama (Tablica 3). Relativni (%) bias zadovoljava postavljeni kriterij od 10% u svakoj točki razrjeđenja i varira od -0,3% u uzorku 4 do -3,0% u uzorku 3. Postoji blagi trend negativnih vrijednosti relativnog bias-a (%) što upućuje na to da automatski analizator mjeri nešto niže koncentracije ŽK od očekivanih.

Tablica 3. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

| Broj uzorka | Volumni omjer uzorka N i P | Očekivana konc. ŽK ($\mu\text{mol/L}$) | Izmjerena konc. ŽK ($\mu\text{mol/L}$) | Apsolutni bias | Relativni bias (%) |
|-------------|----------------------------|--|--|----------------|--------------------|
| 1 | N | 3,5 | 3,5 | / | / |
| 2 | N:P = 3:1 | 45,6 | 45,1 | -0,6 | -1,2 |
| 3 | N:P = 1:1 | 87,8 | 85,1 | -2,7 | -3,0 |
| 4 | N:P = 1:3 | 129,9 | 129,6 | -0,4 | -0,3 |
| 5 | P | 172,1 | 172,1 | / | / |

4.1.4. Verifikacija referentnog intervala

Prema CLSI smjernicama, referentni interval za određenu populaciju je verificiran ukoliko 18 od 20 referentnih ispitanika ima koncentraciju analita unutar intervala. Referentni interval za žučne kiseline od 1,0 do 6,0 $\mu\text{mol/L}$ ne zadovoljavaju dvije od dvadeset odabranih osoba koje su vadile krv u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ za koje je pregledom bolesti i anamneze zaključeno da nemaju povijest bolesti hepatobilijarnog trakta, te da su referentni ispitanici. Koncentracija ŽK u serumima svih ispitanika prikazane su u Tablici 4 s posebno istaknutim vrijednostima koje su izvan deklariranog referentnog intervala.

Tablica 4. Rezultati verifikacije referentnog intervala

| Redni broj ispitanika | Koncentracija ŽK ($\mu\text{mol/L}$) |
|-----------------------|--|
| 1 | 1,2 |
| 2 | 4,2 |
| 3 | 4,6 |
| 4 | 1,5 |

| | |
|----|------------|
| 5 | 2,3 |
| 6 | 6,7 |
| 7 | <1,0 |
| 8 | 1,8 |
| 9 | 2,2 |
| 10 | 1,7 |
| 11 | 2,2 |
| 12 | 2,2 |
| 13 | 6,7 |
| 14 | 2,5 |
| 15 | 1,7 |
| 16 | <1,0 |
| 17 | 2,3 |
| 18 | 2,3 |
| 19 | 4,3 |
| 20 | 1,1 |

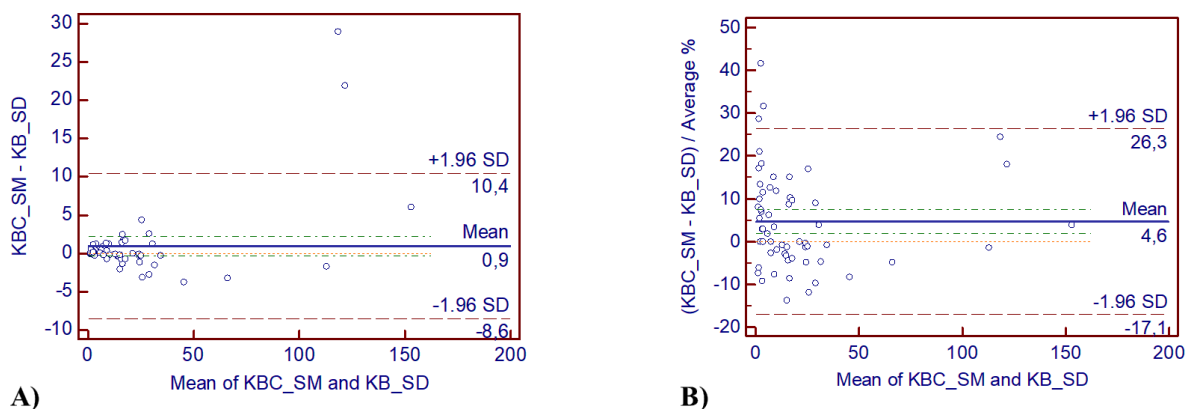
Prema tome, u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ verificiran je referentni interval za odrasle osobe kojeg navodi proizvođač budući da je koncentracija ŽK u serumima 18 od 20 ispitanika unutar referentnog intervala.

4.1.5. Točnost – usporedba metoda

Rezultati ispitivanja usporedbe dva analitička sustava koji su obrađeni Bland-Altman i Passing-Bablok analizama prikazani su na Slikama 10 i 11. Ukupno 61 uzorak seruma prvo je analiziran na automatskom analizatoru Abbot Architect u Kliničkom bolničkom centru „Sestre milosrdnice“ (KBC_SM), a potom na automatskom analizatoru Siemens Atellica Solution u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ (KB_SD). Obuhvaćeni raspon koncentracija ŽK u uzorcima bio je od 1,2 do 155,8 $\mu\text{mol/L}$.

Statističkom obradom Bland-Altman analizom, što je prikazano na Slici 10, utvrđeno je odsustvo konstantnog odstupanja i prisustvo blagog proporcionalnog odstupanja. Prema Bland-Altman statističkoj obradi, konstantno odstupanje je prisutno ukoliko 95%-tni interval

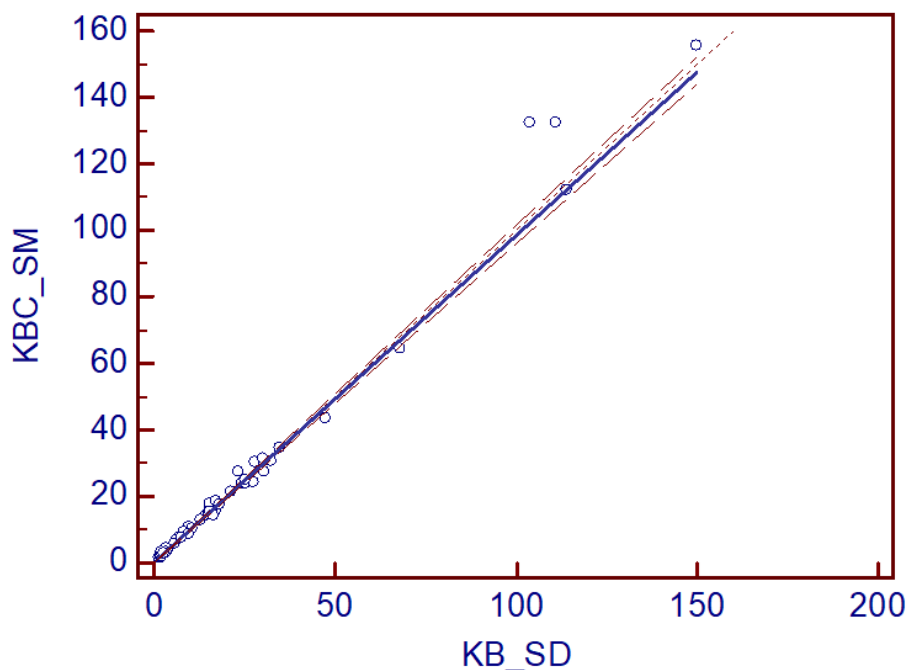
pouzdanosti ne obuhvaća nulu na dijagramu ovisnosti apsolutne razlike mjerenja na dva analitička sustava. Na Slici 10A vidljivo je da 95%-tni interval pouzdanosti obuhvaća nulu što znači da ne postoji konstantno odstupanje prilikom usporedbe analitičkog sustava KBC_SM i KB_SD. Osim konstantnog odstupanja, prisustvo proporcionalnog odstupanja utvrđuje se na dijagramu ovisnosti relativne razlike mjerenja na dva analitička sustava. Analogno prethodnom opisu, proporcionalno odstupanje usporedbe analitičkih sustava je prisutno ako 95%-tni interval pouzdanosti ne obuhvaća nulu. Budući da prema rezultatima provedene usporedbe metode 95%-tni interval pouzdanosti na grafu ovisnosti relativne razlike mjerenja ne obuhvaća nulu, kao na Slici 10B, zaključujemo da proporcionalno odstupanje postoji. Donja granica intervala pouzdanosti je blizu nule pa je moguće tvrditi da je postojeće proporcionalno odstupanje gotovo zanemarivo, a analitički sustavi usporedivi.



Slika 10. Prikaz rezultata Bland-Altmanove analize gdje je 95%-tni interval pouzdanostina oba grafa omeđen dvjema isprekidanim zelenim linijama. **A)** Dijagram ovisnosti apsolutne razlike mjerenja na analizatoru Abbot Architect (KBC_SM) i na analizatoru Siemens Atellica Solution (KB_SD), izraženo u mjernim jedinicama, o aritmetičkoj sredini (engl. *mean*) dva mjerenja. **B)** Dijagram ovisnosti relativne razlike mjerenja na analizatoru Abbott Architect (KBC_SM) i na analizatoru Siemens Atellica Solution (KBC_SD), izraženo kao postotak, o aritmetičkoj sredini dva mjerenja.

Obradom podataka usporedbe metoda Passing-Bablok regresijskom analizom također se utvrđuje prisustvo konstantnog i proporcionalnog odstupanja. Rezultati priloženi u Slici 11 pokazali su prisustvo blagog konstantnog i odsustvo proporcionalnog odstupanja. Jednadžba pravca dobivena Passing-Bablok analizom je $y = 0,2 (0,1-0,4) + 1,0 x$. Ukoliko 95%-tni interval pouzdanosti odsječka pravca ne obuhvaća nulu, kao u ovom slučaju, postoji konstantno

odstupanje. Analogno, 95%-tni interval pouzdanosti nagiba pravca treba obuhvaćati vrijednost 1 ukoliko je proporcionalno odstupanje odsutno, što je također slučaj.



Slika 11. Pasing-Bablok regresijska analiza dvije metode za određivanje ukupnih žučnih kiselina, N=61; koncentracijsko područje 1,2-155,8 $\mu\text{mol/L}$. Dijagram prikazuje izmjerene koncentracije žučnih kiselina na analizatoru Siemens Atellica Solution prikazan na x-osi (KB_SD), te izmjerene koncentracije na analizatoru Abbott Architect, prikazane na y-osi (KBC_SM). Regresijska linija je označena punom linijom, a interval pouzdanosti dugačkim crvenim isprekidanim linijama. Linija idealnog preklapanja izmjerenih koncentracija ($x=y$, engl. *identity line*) prikazana je kratkom crvenom isprekidanom linijom. Jednadžba regresijske linije: $y = 0,2 (0,1-0,4) + 1,0 x$ ukazuje na prisustvo blagog konstantnog odstupanja i odsustvo proporcionalnog odstupanja. Cusum-ov test linearnosti pokazuje da ne postoji značajno odstupanje od linearnosti ($P > 0.10$).

4.1.6. Interferencija lipemije

Rezultati ispitivanja interferencije lipemije u pool-ovima seruma N i P prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija u Tablicama 5 i 6. Dodatno su navedeni indeksi lipemije i koncentracija triglicerida u svakom alikvotu. Uz tablični prikaz, rezultati ispitivanja

prikazani su i grafički u priloženim interferogramima (Slika 12). Inicijalna koncentracija ŽK u pool-u N bila je 5,8 μmol/L, a u pool-u P 20,8 μmol/L.

Odstupanje (engl. *bias*) (%) koncentracije ŽK u odnosu na nativni alikvot uzorka izračunat je za sve lipemične alikvote pool-ova N i P prema idućoj formuli:

$$bias (\%) = \frac{c_x - c_n}{c_n} \times 100\%$$

gdje je c_x srednja vrijednost triplikata koncentracije ŽK u lipemičnom alikvotu, a c_n srednja vrijednost triplikata koncentracije ŽK u nativnom uzorku.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja interferencije lipemije u nativnom i lipemičnim alikvotima pool-a N (pool u kojem je koncentracija ŽK unutar RI)

| Broj alikvota | Indeks lipemije | Koncentracija Tg (mmol/L) | Koncentracija ŽK (μmol/L): | Bias ŽK u odnosu na nativni uzorak (%) |
|---------------|-----------------|---------------------------|----------------------------|--|
| 1 | 0 | 0,9 | 5,8 ± 0,1 | / |
| 2 | 1 | 4,3 | 6,0 ± 0,1 | 2,3 |
| 3 | 1 | 7,0 | 6,0 ± 0,1 | 2,9 |
| 4 | 3 | >12,4 | 6,0 ± 0,2 | 2,9 |
| 5 | 5 | >12,4 | 6,4 ± 0,1 | 10,3 |
| 6 | 5 | >12,4 | 7,2 ± 0,3 | 24,0 |

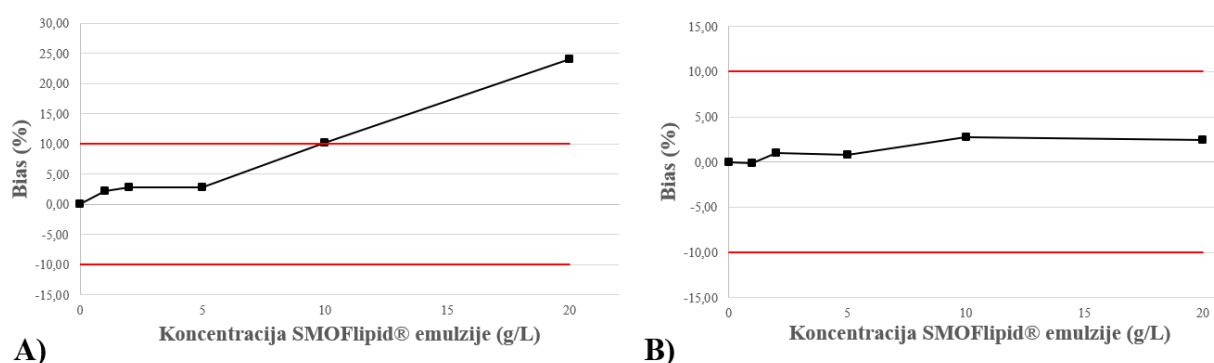
Tablica 6. Rezultati ispitivanja interferencije lipemije u nativnom i lipemičnim alikvotima pool-a P (pool u kojem je koncentracija ŽK iznad gornje granice RI)

| Broj alikvota | Indeks lipemije | Koncentracija Tg (mmol/L) | Koncentracija ŽK (μmol/L): | Bias ŽK u odnosu na nativni uzorak (%) |
|---------------|-----------------|---------------------------|----------------------------|--|
| 1 | 0 | 1,8 | 20,8 ± 0,3 | / |
| 2 | 1 | 4,6 | 20,8 ± 0,5 | -0,2 |
| 3 | 1 | >12,4 | 21,0 ± 0,3 | 1,0 |
| 4 | 3 | 7,7 | 21,0 ± 0,1 | 0,8 |
| 5 | 5 | >12,4 | 21,4 ± 0,2 | 2,7 |
| 6 | 5 | >12,4 | 21,3 ± 0,3 | 2,4 |

Rezultati ispitivanja pokazali su konstantan pozitivan bias (%) koncentracije ŽK u oba slučaja porastom koncentracije SMOFlipid® 20% emulzije. Razlog ovakvog ponašanja žučnih

kiselina može biti ukoncentriravanje žučnih kiselina u lipidnom sloju budući da je steroidni dio strukture izrazito lipofilan.

U alikvotu 5 pool-a N koji ima nižu inicijalnu koncentraciju ŽK, bias (%) prelazi dozvoljenu granicu od 10% što znači da je utjecaj interferencije lipemije zanemariv samo do koncentracije SMOFlipid® 20% emulzije od 5 g/L. U pool-u P interferencija lipemije nije značajna, odnosno sve bias (%) vrijednosti su unutar dozvoljenih granica iako postoji trend rastućih bias (%) vrijednosti, osim u zadnjem alikvotu u kojem je zabilježen blagi pad bias-a (%) u odnosu na prethodni alikvot.



Slika 12. Interferogrami utjecaja lipemije na koncentraciju ŽK prikazani su crnom punom linijom. Na x-osi nalazi se bias (%) koncentracije ŽK u odnosu na koncentraciju u nativnom uzorku, a na y-osi nalazi se koncentracija SMOFlipid® 20% emulzije u alikvotu. Kao maksimalni dozvoljeni bias (%) korišten arbitrarni kriterij od 10% što je prikazano crvenim punim linijama. **A)** Interferogram dobiven ispitivanjem utjecaja lipemije u pool-u N inicijalne koncentracije ŽK 5,8 $\mu\text{mol/L}$. **B)** Interferogram dobiven ispitivanjem utjecaja lipemije u pool-u P inicijalne koncentracije ŽK 20,8 $\mu\text{mol/L}$.

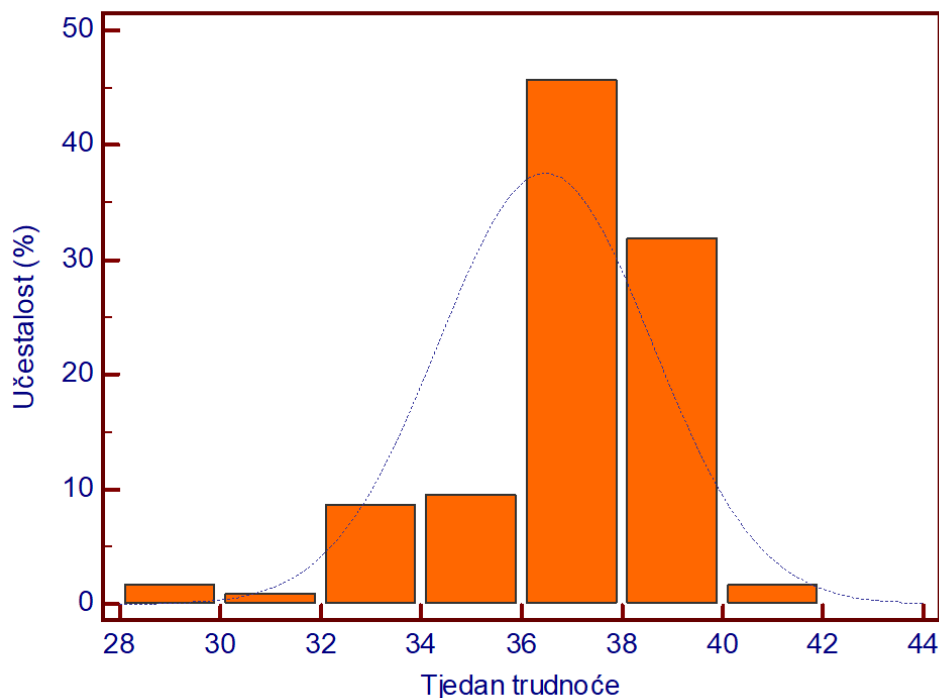
Porast bias (%) vrijednosti je izraženiji porastom koncentracije lipidne emulzije u pool-u N nego što je to zabilježeno u pool-u P, a razlog je vjerojatno niža inicijalna koncentracija ŽK pool-a N (Slika 12).

4.2. Validacija referentnog intervala

Inicijalni broj trudnica od 28. do 41. tjedna trudnoće bio je 118. Prema postavljenim kriterijima iz studije su isključene dvije trudnice. Obje trudnice su isključene zbog aktivnosti ALT u serumu preko tri puta iznad gornje granice RI što je upućivalo na postojanje jetrenih lezija preeklampsije. Preostalih 116 trudnica smatrane su referentne prema postavljenim kriterijima i usključene su u studiju. Njihovi uzorci seruma korišteni su za izradu referentnog intervala za žučne kiseline.

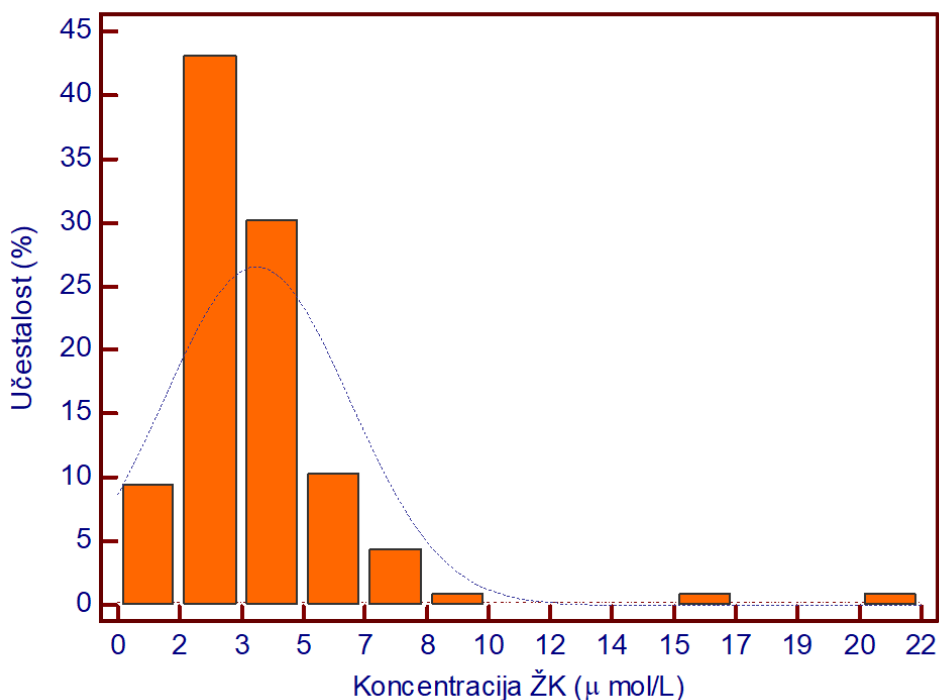
4.2.1. Raspodjela podataka

Dobiveni rezultati prikazani su histogramima raspodjele na način da su na apscisu nanosene izmjerene vrijednosti, a na ordinatu učestalost. Ovakvim prikazom moguće je vizualnim pregledom utvrditi vrijednosti koje odstupaju i koje treba dodatno ispitati. Histogram raspodjele učestalosti tjedana trudnoće 116 referentnih ispitanica prikazan je na Slici 13. Većina trudnica, njih preko 80%, bila je na kraju trećeg tromjesečja od 36. do 40. tjedna trudnoće.



Slika 13. Učestalost tjedana trudnoće referentnih ispitanica, N=116; raspon tjedana trudnoće je od 28. do 41. Histogram prikazuje relativne frekvencije, odnosno učestalost tjedana trudnoće referentnih ispitanica u trećem tromjesečju. Srednja vrijednost tjedna trudnoće je 36,5. Isprekidanom plavom linijom prikazana je normalna raspodjela.

Histogram raspodjele koncentracija ŽK u 116 uzoraka prikazan je na Slici 14. U većini uzoraka seruma koncentracija ŽK je bila između 1 i 7 $\mu\text{mol/L}$. Vizualnim pregledom histograma raspodjele koncentracija ŽK jasno je da vjerojatno dvije vrijednosti odstupaju, jedna u koncentracijskom rasponu od 15 do 17 $\mu\text{mol/L}$, a druga u rasponu od 20 do 22 $\mu\text{mol/L}$. Prema izgledu, raspodjela je pozitivno asimetrična (engl. *right-skewed*) i odstupa od normalne. U tom slučaju podatci moraju biti obrađeni neparametrijskom ili robustnom metodom, ovisno o broju uzoraka i širini intervala pouzdanosti referentnih granica.



Slika 14. Učestalost koncentracija ŽK u uzorcima seruma referentnih ispitanica; N=116, koncentracijsko područje ŽK je od 1,0 do 20,4 $\mu\text{mol/L}$. Srednja vrijednost mjerenja je 3,9 $\mu\text{mol/L}$. Isprekidanom plavom linijom prikazana je normalna raspodjela.

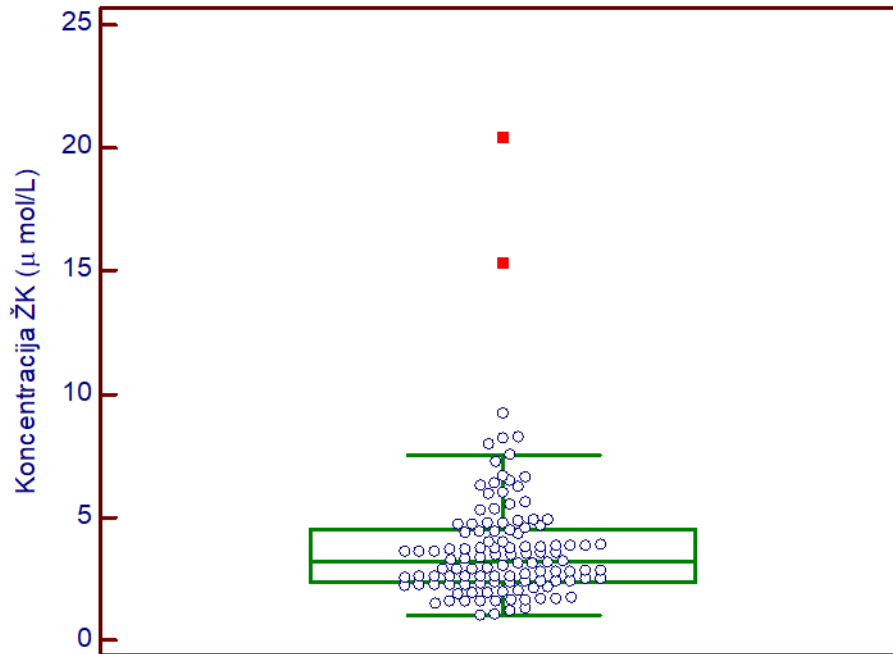
Normalnost raspodjele koncentracije ŽK ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Raspodjela koncentracija ŽK ne prati normalnu razdiobu, a parametri deskriptivne statistike prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Deskriptivna statistika raspodjele koncentracija $\check{Z}K$ u svim uzorcima referentnih ispitanica

| Parametar: | Vrijednost: |
|--|---|
| broj uzoraka | 116 |
| najmanja koncentracija $\check{Z}K$ | 1,0000 |
| najveća koncentracija $\check{Z}K$ | 20,4000 |
| aritmetička sredina | 3,8047 |
| 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine | 3,3367-4,2728 |
| medijan | 3,2250 |
| 95%-tni interval pouzdanosti medijana | 2,8483-3,6033 |
| varijanca | 6,4774 |
| standardna devijacija | 2,5451 |
| relativna standardna devijacija | 0,6689 (66,89%) |
| standardna pogreška aritmetičke sredine | 0,2363 |
| <i>Skewness</i> koeficijent | 3,4626 (P<0,0001) |
| Kurtosis koeficijent | 17,9986 (P<0,0001) |
| D'Agostino-Pearsonov test normalne distribucije | odbijena normalnost razdiobe (P<0,0001) |

4.2.2. Ispitivanje vrijednosti koje odstupaju

Prije određivanja RI, potrebno je odrediti i ukloniti vrijednosti koje odstupaju iz skupa dobivenih podataka. Potencijalne vrijednosti koje odstupaju su prethodno detektirane vizualnim pregledom histograma. Dodatna potvrda potencijalnih vrijednosti koje odstupaju utvrđena je prikazom svih izmjerenih koncentracija $\check{Z}K$ dijagramom kutije s ručicama (engl. *box-and-whiskers plot*) na Slici 15.



Slika 15. Dijagram kutije s ručicama (engl. *box-and-whiskers plot*) koncentracija ŽK. Dijagram se sastoji od pravokutnika koji prikazuje podatke od donjeg (Q1) do gornjeg kvartila (Q3). Crta po sredini pravokutnika označava medijan. Donje i gornje horizontalne linije se nazivaju *whiskers* ili ručice. Predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalaze unutar 1,5 puta interkvartilni raspon gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila. Sve izmjerene koncentracije ŽK obilježene su plavim kružićima, a crveni kvadratići predstavljaju vrijednosti koje odstupaju.

Prema dijagramu kutije s ručicama sa Slike 15, potrebno je ispitati dvije vrijednosti koje odstupaju Dixon-Reedovim pravilom. Vrijednost bliža maksimumu se ispituje prva. Ona se pokazala statistički značajnom zbog čega se druga vrijednost koja odstupa također smatra statistički značajnom. Nakon ispitivanja Dixon-Reedovim pravilom, uklonjene su dvije vrijednosti koje su na Slici 15 prikazane crvenim kvadratićima, a preostala statistička obrada rezultata rađena je na 114 uzoraka.

4.2.3. Izrada referentnog intervala

Kliničku važnost imaju samo koncentracije ŽK iznad gornje granice RI, stoga se izradio jednostrani 95%-tni RI u desno. Odnosno, određivala se samo gornja granica referentnog intervala i pripadajući 90%-tni interval pouzdanosti. Kao donja granica RI odabrana je donja

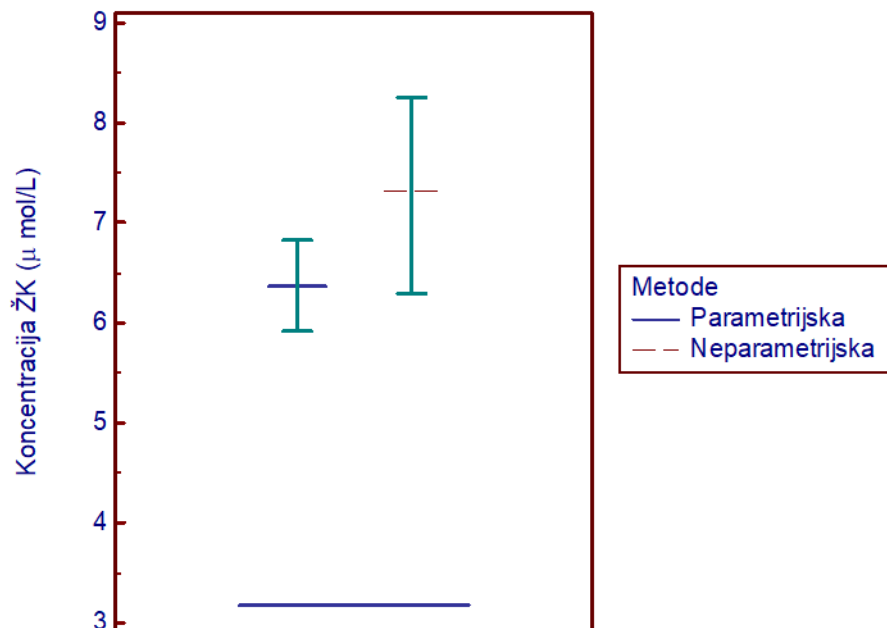
granica mjernog raspona metode koju navodi proizvođač (1,0 $\mu\text{mol/L}$) budući da ona nema kliničko značenje.

Ukupni broj uzoraka nakon isključivanja dvije vrijednosti koje odstupaju bio je 114 i njihova deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 8. Podatci ne prate normalnu razdiobu prema D'Agostino-Pearsonovom testu.

Tablica 8. Deskriptivna statistika raspodjele koncentracija $\check{Z}K$ u uzorcima referentnih ispitanica nakon uklanjanja vrijednosti koje odstupaju

| Parametar: | Vrijednost: |
|---|---|
| broj uzoraka | 114 |
| najmanja koncentracija $\check{Z}K$ | 1,0000 |
| najveća koncentracija $\check{Z}K$ | 9,2000 |
| aritmetička sredina | 3,5583 |
| medijan | 3,1750 |
| standardna devijacija | 1,7100 |
| <i>Skewness</i> koeficijent | 1,0952 (P<0,0001) |
| Kurtosis koeficijent | 0,9608 (P=0,0704) |
| D'Agostino-Pearsonov test normalne distribucije | odbijena normalnost razdiobe (P<0,0001) |

Iako je broj uzoraka nešto manji od 120, a podatci ne prate normalnu razdiobu, jednostrani 95%-tni RI u desno je izrađen neparametrijskom metodom. Slika 16 grafički prikazuje izrađeni RI za $\check{Z}K$ parametrijskom i neparametrijskom metodom kako je zadano u statističkom softveru MedCalc.



Slika 16. Gornje granice RI s odgovarajućim 90%-tnim intervalima pouzdanosti dobivene parametrijskom i neparometrijskom metodom. Medijan vrijednosti iznosi 3,1750 $\mu\text{mol/L}$ i prikazan je dugom plavom linijom. Gornja granica RI dobivena parametrijskom metodom prikazana je kratkom plavom linijom, a odgovarajući 90%-tni interval pouzdanosti prikazan je zelenim ručicama. Gornja granica RI dobivena neparometrijskom metodom prikazana je isprekidanom crvenom linijom, a odgovarajući 90%-tni interval pouzdanosti prikazan je zelenim ručicama.

Vizualnim pregledom primjećen je širi 90%-tni interval pouzdanosti gornje granice dobiven neparometrijskom metodom u odnosu na parametrijsku (Slika 16). Odnosno, preciznost određene referentne granice je veća parametrijskom metodom. Parametrijska metoda nije metoda izbora u ovom slučaju zato što podatci ne prate normalnu razdiobu. Stoga je potrebno je procijeniti preciznosti određene referentne granice dobivene neparometrijskom metodom na temelju omjera 90%-tnog intervala pouzdanosti gornje granice i širine RI koji bi trebao biti najviše 0,2 prema smjernicama. Rezultati procjene preciznosti određene referentne granice prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. 95%-tni RI u desno izrađen neparametrijskom metodom i procjena preciznosti gornje granice RI

| Parametar: | Vrijednost: |
|---|--------------------|
| donja referentna granica | 1,0000 |
| gornja referentna granica | 7,3250 |
| širina RI | 6,3250 |
| 90%-tni interval pouzdanosti gornje referentne granice | 6,3000-8,25000 |
| omjer 90%-tnog intervala pouzdanosti gornje granice i širine RI | 0,3083 |

Gornja granica RI dobivena neparametrijskom metodom iznosi 7,3250 $\mu\text{mol/L}$, dok je donja granica zapravo donja granica mjernog područja metode koju propisuje proizvođač i iznosi 1,0000 $\mu\text{mol/L}$. Širina RI korištena za određivanje preciznosti gornje granice je 6,3250 $\mu\text{mol/L}$.

Prema rezultatima omjera 90%-tnog intervala pouzdanosti gornje granice i širine RI, preciznost gornje granice je gotovo zadovoljila kriterije. Omjer iznosi 0,3, a poželjna vrijednost je 0,2. Vizualnim pregledom prikaza gornjih granica s pripadajućim intervalima pouzdanosti (Slika 16) bilo je moguće utvrditi da je interval pouzdanosti u neparametrijskoj metodi širok i da vjerojatno neće zadovoljiti postavljeni kriterij od 0,2 za omjer. Prema podacima iz literature (Williamson i sur., 2011), fetus je sposoban sintetizirati ŽK u trećem tromjesečju što uzrokuje blagi porast koncentracija ŽK u majčinom krvotoku. Razlozi širokog 90%-tnog intervala pouzdanosti gornje granice RI mogu biti široko područje gestacijskih tjedana referentnih ispitanica, različite gestacijske dobi fetusa i njihove sposobnosti sintetiziranja ŽK te drugačija sposobnost majčinog krvotoka da preuzme ŽK iz fetalnog krvotoka. Iako je omjer nešto veći od 0,2, može se tvrditi da je pogreška određivanja gornje granice zanemariva i da je preciznost gornje granice zadovoljavajuća.

Donja referentna granica zaokružena na jednu značajnu znamenku iznosi 1,0 $\mu\text{mol/L}$, a gornja 7,3 $\mu\text{mol/L}$. Dakle, RI za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće koji je definiran je od 1,0 do 7,3 $\mu\text{mol/L}$.

5. ZAKLJUČAK

Verificirana je metoda određivanja ŽK na automatskom analizatoru Siemens Atellica CH 930. Utvrđeno je da su ŽK stabilne 2 dana pri 20 °C, 14 dana pri 4-8 °C i 22 dana pri -20 °C. Preciznost metode zadovoljava kriterij proizvođača koji iznosi 7%. Ukupna preciznost (CV *within-laboratory*) (%) uzorka koncentracije ŽK unutar RI je 2,2%, a ukupna preciznost uzorka koncentracije ŽK iznad gornje granice RI je 1,7%. Rezultati usporedbe dva analitička sustava analizirani su Bland-Altman i Passing-Bablok analizom. Bland-Altmanovom analizom utvrđeno je da je konstantno odstupanje zanemarivo, a proporcionalno odstupanje postoji, ali nije klinički značajno. Passing-Bablok analizom dobivena je jednadžba pravca $y = 0,2 (0,1-0,4) + 1,0 x$ iz kojeg se može iščitati da postoji blago konstantno odstupanje dok proporcionalno odstupanje nije prisutno. Linearnost metode je verificirana u koncentracijskom području 3,5-172,1 $\mu\text{mol/l}$. Kriterij verifikacije deklariranog RI je zadovoljen budući da je u 18 od 20 uzoraka izmjerena koncentracija žučnih kiselina unutar RI, što čini 90% ukupnog broja uzoraka. Ispitivanjem interferencije lipemije pokazano je da postoji pozitivan bias (%) koncentracije ŽK porastom koncentracije Tg u uzorcima seruma. Lipemija uzrokuje nepouzdanu rezultate izvan definiranih kriterija pri koncentraciji SMOFlipid® 20% emulzije od 10 g/L ili pri koncentraciji Tg iznad 12,4 mmol/L u uzorcima niske inicijalne koncentracije ŽK.

Referentni interval za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće je izrađen na populaciji od 116 ispitanica neparametrijskom metodom i iznosi od 1,0 do 7,3 $\mu\text{mol/L}$. Omjer 90%-tnog intervala pouzdanosti gornje granice i širine RI, kao mjera preciznosti određivanja gornje granice RI, iznosi 0,3. Kriterij zadovoljavajuće preciznosti bio je 0,2 prema smjernicama. Iako je omjer nešto veći od postavljenog kriterija, može se tvrditi da je pogreška određivanja gornje granice zanemariva i da je preciznost zadovoljavajuća.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

| | |
|--------------------------------|---|
| ŽK | žučne kiseline |
| HMG-CoA | 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA |
| FXR | nuklearni farnezoid receptor |
| CA | kolna kiselina (engl. <i>cholic acid</i>) |
| CDCA | kenodeoksikolna kiselina (engl. <i>chenodeoxycholic acid</i>) |
| DCA | deoksikolna kiselina (engl. <i>deoxycholic acid</i>) |
| UDCA | ursodeoksikolna kiselina (engl. <i>ursodeoxycholic acid</i>) |
| LCA | litokolna kiselina (engl. <i>lithocholic acid</i>) |
| IgA | imunoglobulin A |
| ROS | reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| ICP | intrahepatička kolestaza u trudnoći (engl. <i>intrahepatic cholestasis of pregnancy</i>) |
| MRP3 | transporter za fosfolipide (engl. <i>multi-drug resistance protein 3</i>) |
| BSEP | efluksna pumpa za žučne kiseline (engl. <i>bile salt export pump</i>) |
| MRP2 | transporter za fosfolipide (engl. <i>multi-drug resistance protein 2</i>) |
| CŽS | centralni živčani sustav |
| ALT | alanin aminotransferaza |
| AST | aspartat aminotransferaza |
| GGT | γ-glutamil aminotransferaza |
| LOD | limit detekcije (engl. <i>limit of detection</i>) |
| LOQ | limit kvantifikacije (engl. <i>limit of quantification</i>) |
| NAD ⁺ /NADH | nikotinamid adenin dinukleotid |
| tio-NAD ⁺ /tio-NADH | tionikotinamid adenin dinukleotid |
| 3α-HSD | 3α-hidroksisteroid dehidrogenaza |
| CLSI | Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>) |
| RI | referentni interval |
| CI | interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>) |
| UKK | unutarnja kontrola kvalitete |
| QC | kontrolni materijal (engl. <i>quality control</i>) |

| | |
|--------|---|
| EFLM | Europska federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. <i>European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>) |
| CV% | koeficijent varijacije (engl. <i>coefficient of variation</i>) |
| PD% | razlika izražena u postotcima (engl. <i>percentage difference</i>) |
| Tg | trigliceridi |
| KKS | kompletna krvna slika |
| DKS | diferencijalna krvna slika |
| KBC_SM | Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“ |
| KB_SD | Klinička bolnica „Sveti Duh“ |

7. LITERATURA

- Angellon LB. Metabolism and function of bile acids. U: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Vance DE, Vance JE, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2008, 423-438.
- Angueira AR, Ludvik AE, Reddy TE, Wicksteed B, Lowe WL Jr, Layden BT. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes*, 2015, 64, 327-334.
- Anwer MS, Meyer DJ. Bile acids in the diagnosis, pathology, and therapy of hepatobiliary diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1995, 25, 503-517.
- Bacq Y, Myara A, Brechot MC, Hamon C, Studer E, Trivin F, Metman E. Serum conjugated bile acid profile during intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol*, 1995, 22, 66-70.
- Barth A, Klinger G, Rost M. Influence of ethinyloestradiol propanolsulphonate on serum bile acids in healthy volunteers. *Exp Tox Pathol*, 2003, 54, 381-386.
- Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29, 625-651.
- Berg B, Helm G, Petersohn L, Tryding N. Cholestasis of pregnancy. Clinical and laboratory studies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1986; 65, 107-113.
- Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res*, 2005, 589, 47-65.
- Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 1991, 266, 7774-7778.
- Carey MC, Small DM. Micelle Formation by Bile Salts: Physical-Chemical and Thermodynamic Considerations, *Arch Intern Med*, 1972, 130, 506-527.
- Castaño G, Lucangioli S, Sookoian S, et al. Bile acid profiles by capillary electrophoresis in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110, 459-465.
- Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol*, 2013, 3, 1191-1212.

- CLSI and IFCC. EP06-A dokument: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline, 2003, 23, 1-60.
- CLSI and IFCC. EP09-A3 dokument: Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; approved guideline, 2013, 33, 1-80.
- CLSI and IFCC. EP15-A3 dokument: User verification of precision and estimation of bias; approved guideline, 3. izd., 2014, 34, 1-106.
- CLSI and IFCC. EP28-A3C:2010 dokument: Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, 3. izd., 2010, 28, 1-76.
- Colombo C, Roda A, Roda E, Buscaglia M, dell'Agnola CA, Filippetti P, Ronchi M, Sereni F. Correlation between fetal and maternal serum bile acid concentrations. *Pediatr Res*, 1985, 19, 227-231.
- Cornes M, Simundic AM, Cadamuro J, Costelloe SJ, Baird G, Kristensen GBB, von Meyer A, Nybo M and Gómez Rioja R, on behalf of the Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). The CRESS checklist for reporting stability studies. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 1-11.
- Dixon PH, Williamson C. The molecular genetics of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Med*, 2008, 1, 65-71.
- Fisk NM, Bye WB, Storey GN. Maternal features of obstetric cholestasis: 20 years experience at King George V Hospital. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 1988, 28, 172-176.
- Floreani A, Gervasi MT. New Insights on Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Clin Liver Dis*, 2016, 20, 177-189.
- Geenes V, Chappell LC, Seed PT, Steer PJ, Knight M, Williamson C. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study. *Hepatology*, 2014, 59, 1482-1491.
- Geenes V, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol*, 2009, 15, 2049-2066.

- Gerard, P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens*, 2013, 3, 14-24.
- Germain AM, Kato S, Carvajal JA, Valenzuela GJ, Valdes GL, Glasinovic JC. Bile acids increase response and expression of human myometrial oxytocin receptor. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189, 577-582.
- Gonzalez MC, Reyes H, Arrese M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol*, 1989, 9, 84-90.
- Grüner N, Mattner J. Bile Acids and Microbiota: Multifaceted and Versatile Regulators of the Liver–Gut Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 1397.
- Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci*, 1999, 14, 24-29.
- Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet*, 1999, 353, 210-211.
- Kauppila A, Korpela H, Mäkilä UM, Yrjänheikki E. Low serum selenium concentration and glutathione peroxidase activity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Br Med J*, 1987, 294, 150–152.
- Kawakita T, Parikh LI, Ramsey PS, et al. Predictors of adverse neonatal outcomes in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213, 570.e1-570.e5708.
- Keitel V, Dröge C, Stepanow S, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP): case report and review of the literature. Intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP): Kasuistik und Übersicht über die Literatur. *Z Gastroenterol*, 2016, 54, 1327-1333.
- Kenyon AP, Piercy CN, Girling J, Williamson C, Tribe RM, Shennan AH. Obstetric cholestasis, outcome with active management: a series of 70 cases. *BJOG*, 2002, 109, 282-288.
- Kolić V, Feher Turković L, Šegulja D, Matišić D. Referentni intervali u laboratorijskoj medicini. *JAHS*, 2017, 3, 107-114.

- Kondrackiene J, Kupcinskas L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems. *World J Gastroenterol*, 2008, 14, 5781-5788.
- Koop I, Schindler M, Bosshammer A, Scheibner J, Stange E, Koop H. Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut*, 1996, 39, 661-667.
- Kremer AE, Bolier R, Dixon PH, Geenes V, Chambers J, Tolenaars D, Ris-Stalpers C, Kaess BM, Rust C, Van der Post JA, Williamson C, Beuers U, Oude Elferink RPJ. Autotaxin activity has a high accuracy to diagnose intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol*, 2014, 62, 897-904.
- Lang C, Meier Y, Stieger B, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17, 47-60.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366, 177-196.
- Maher JJ, Friedman SL. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. *Semin Liver Dis*, 1993, 13, 13-20.
- McIlvride S, Dixon PH, Williamson C. Bile acids and gestation. *Mol Aspects Med*, 2017, 56, 90-100.
- Meng LJ, Reyes H, Axelson M, et al. Progesterone metabolites and bile acids in serum of patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology*, 1997, 26, 1573-1579.
- Milkiewicz P, Gallagher R, Chambers J, Eggington E, Weaver J, Elias E. Obstetric cholestasis with elevated gamma glutamyl transpeptidase: incidence, presentation and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18, 1283-1286.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 2009, 15, 804-816.

- Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*, 2009, 15, 1677-1689.
- Piechota J, Jelski W. Intrahepatic Cholestasis in Pregnancy: Review of the Literature. *J Clin Med*, 2020, 9, 1361.
- Reyes H, Sjövall J. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann Med*. 2000, 32, 94-106.
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72, 137-174.
- Sanyal AJ, Hirsch JJ, Moore EW. Premicellar taurocholate enhances calcium uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology*, 1994, 106, 866-874.
- Sentinel, Total Bile Acids Liquid, REF1700201 – 2.0/02, 2020/06/24
- Serrano MA, Macias RI, Vallejo M, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305, 515-524.
- Shaw D, Frohlich J, Wittmann BA, Willms M. A prospective study of 18 patients with cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1982, 142, 621-625.
- Smolarczyk R, Wójcicka-Jagodzińska J, Piekarski P, Romejko E, Czajkowski K. The biochemical functions of the renal tubules and glomeruli in the course of intrahepatic cholestasis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000, 89(1), 35-39.
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*, 2000, 118(2), 422-430.
- Šimundić AM. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Zagreb. Medicinska naklada, 2013.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(8), 678-693.

- Wikström Shemer E, Marschall HU. Decreased 1,25-dihydroxy vitamin D levels in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010, 89, 1420-1423.
- Williamson C, Geenes V. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2014, 124(1), 120-133.
- Williamson C, Miragoli M, Sheikh Abdul Kadir S, et al. Bile acid signaling in fetal tissues: implications for intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Dis*, 2011, 29, 58-61.
- Zhang GH, Cong AR, Xu GB, Li CB, Yang RF, Xia TA. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *BBRC*, 2004, 326, 87-92.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

Usporedba laboratorijskih nalaza pacijenata s referentnim intervalima jedan su od najprimjenjivijih alata za interpretaciju nalaza, postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka bolesti. Cilj ovog rada bio je uvesti metodu za određivanje žučnih kiselina u analitički sustav i verificirati njene parametre, te izraditi referentni interval za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće. U populaciji trudnica žučne kiseline kao specifični biomarker služe za postavljanje dijagnoze intrahepatičke kolestaze u trudnoći, bolesti koja se javlja u trećem tromjesečju i ispoljava kao pruritus, a može biti fatalna za dijete.

Verifikacijom metode je utvrđeno da su žučne kiseline stabilne 2 dana pri 20 °C, 14 dana pri 4-8 °C i 22 dana pri -20 °C. Verificirana je preciznost metode, a ukupna preciznost je iznosila 2,2%, odnosno 1,7% za koncentraciju žučnih kiselina unutar i iznad gornje granice referentnog intervala. Linearnost je verificirana u koncentracijskom području od 3,5-172,1 μmol/l, a verifikacija referentnog intervala za odrasle je zadovoljila kriterije. Ispitivanje interferencije lipemije pokazalo je blagi pozitivan bias (%) koncentracije žučnih kiselina porastom koncentracije triglicerida u serumu. Lipemija uzrokuje nepouzdanu rezultate pri koncentraciji SMOFlipid® 20% emulzije 10 g/L, odnosno pri koncentraciji triglicerida iznad 12,4 mmol/L u uzorcima niske inicijalne koncentracije ŽK.

Izrada referentnog intervala za žučne kiseline provodila se *a priori* pristupom. Određene su koncentracije žučnih kiselina u 116 uzoraka seruma referentnih ispitanica koje su odabrane temeljem prethodno postavljenih kriterija isključenja i uključivanja. Statistička obrada rezultata je provedena prema CLSI smjernicama. Referentni interval za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće izrađen je neparametrijskom metodom i iznosi od 1,0 do 7,3 μmol/L.

ključne riječi: referentni interval, žučne kiseline, intrahepatička kolestaza u trudnoći, verifikacija metode, validacija, *a priori*

8.2. Summary

Comparison of the patient's laboratory results with reference intervals is one of the most fundamental tools for interpreting laboratory results, making a clinical decision and monitoring the course of the disease. The aim of this study was to introduce a method for determining bile acids into the analytical system, to verify its parameters, and to establish a reference interval for bile acids for the population of pregnant women from the 28th to the 42nd week of pregnancy. Bile acids as a specific biomarker are used to diagnose intrahepatic cholestasis of pregnancy, a disease that usually occurs in the third trimester and manifests itself as pruritus while being potentially fatal for the child.

Verification of the method showed that bile acids are stable in serum samples for 2 days at 20 °C, 14 days at 4-8 °C, and 22 days at -20 °C. The precision study met the criteria. Within-laboratory precision was 2.2% and 1.7% for the concentration of bile acids within the reference range and above the upper limit, respectively. Linearity was verified for the concentration range of 3.5-172.1 µmol/l, and the verification of the reference interval for adults met the criteria. The lipemia interference test showed a positive bias (%) of bile acid concentration with an increase in serum triglyceride concentration. Lipemia causes unreliable results at a SMOFlipid® 20% emulsion concentration of 10 g/L, i.e. at a triglycerides concentration above 12.4 mmol/L in samples with a low initial concentration of bile acids.

Reference interval for bile acids was determined *a priori*. Total bile acids concentration was determined in 116 serum samples of the reference pregnant women who were selected based on the previously set exclusion and inclusion criteria. Statistical analysis of the results was carried out according to CLSI guidelines. The reference interval of 1.0 to 7.3 µmol/L for the population of pregnant women from the 28th to the 42nd week of pregnancy was determined using the non-parametric method.

key words: reference interval, bile acids, intrahepatic cholestasis of pregnancy, verification of the method, validation, *a priori*

9. PRILOZI

9.1. Upitnik za validaciju referentnog intervala

| | |
|--|--|
| MBO: | |
| Adresa: | Broj mobitela: |
| Datum rođenja (broj godina): | Zanimanje: |
| Visina: | Težina: |
| Tjedan trudnoće: | Predviđeni termin poroda: |
| 1. Uzimate li ikakve lijekove? | (DA) (NE) |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koliko često? | (1) redovito (redovna terapija) (2) povremeno (3) rijetko |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koji su to lijekovi? | (1) aspirin (2) analgetici (3) lijekovi za prehladu (4) lijekovi za alergije (5) antacidi (6) drugo: _____ |
| 2. Jeste li ikada primali kemoterapiju? | (DA) (NE) |
| Ako je Vaš odgovor (DA), kada i za liječenje kojeg malignog oboljenja? | _____ |
| 3. Pijete li alkoholna pića? | (DA) (NE) |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koliko često? | (1) 1-2 čaše dnevno (2) 1-2 čaše tjedno (3) 1-2 čaše mjesečno |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koja su to alkoholna pića? | (1) pivo (2) vino (3) viski (4) vodka (5) gin (6) rakija (7) drugo: _____ |
| 4. Konzumirate li duhanske proizvode (cigarete)? | (DA) (NE) |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koliko cigareta dnevno u prosjeku? | _____ |
| 5. Uzimate li ikakve dodatke prehrani poput vitamina i biljnih pripravaka? | (DA) (NE) |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koliko često? | (1) često (2) povremeno (3) rijetko |
| Ako je Vaš odgovor (DA), koje? | _____ |

| | | | |
|--|------|------|-------|
| 6. Postoje li posebnosti u Vašim prehranbenim navikama (npr. ketodijeta, vegetarijanska dijeta, veganska dijeta i sl.)? Ako je Vaš odgovor (DA), možete li opisati Vaše prehrambene navike? | (DA) | (NE) | _____ |
| 7. Jeste li nedavno imali neko oboljenje? Ako je Vaš odgovor (DA), koje? | (DA) | (NE) | _____ |
| 8. Imate li hipertenziju? | (DA) | (NE) | |
| 9. Imate li šećernu bolest? | (DA) | (NE) | |
| 10. Imate li trudnički šećer? | (DA) | (NE) | |
| 11. Jeste li na svom poslu izloženi utjecaju toksičnih kemikalija? | (DA) | (NE) | |
| 12. Jeste li nedavno bili hospitalizirani? Ako je Vaš odgovor (DA), kada i zašto? | (DA) | (NE) | _____ |
| 13. Postoji li povijest nasljednih bolesti u Vašoj obitelji? Ako je Vaš odgovor (DA), koje su to bolesti? | (DA) | (NE) | _____ |
| 14. Imate li povijest bolesti jetre i žuči (masna jetra, kolestaza, žutica i sl.)? Ako je Vaš odgovor (DA), koje su to bolesti? | (DA) | (NE) | _____ |

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“
Ulica Sveti Duh 64, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Validacija referentnog intervala za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće

Lara Zorić

SAŽETAK

Usporedba laboratorijskih nalaza pacijenata s referentnim intervalima jedan su od najprimjenjivijih alata za interpretaciju nalaza, postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka bolesti. Cilj ovog rada bio je uvesti metodu za određivanje žučnih kiselina u analitički sustav i verificirati njene parametre, te izraditi referentni interval za žučne kiseline za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće. U populaciji trudnica žučne kiseline kao specifični biomarker služe za postavljanje dijagnoze intrahepatičke kolestaze u trudnoći, bolesti koja se javlja u trećem tromjesečju i ispoljava kao pruritus, a može biti fatalna za dijete.

Verifikacijom metode je utvrđeno da su žučne kiseline stabilne 2 dana pri 20 °C, 14 dana pri 4-8 °C i 22 dana pri -20 °C. Verificirana je preciznost metode, a ukupna preciznost je iznosila 2,2%, odnosno 1,7% za koncentraciju žučnih kiselina unutar i iznad gornje granice referentnog intervala. Linearnost je verificirana u koncentracijskom području od 3,5-172,1 μmol/l, a verifikacija referentnog intervala za odrasle je zadovoljila kriterije. Ispitivanje interferencije lipemije pokazalo je blagi pozitivan bias (%) koncentracije žučnih kiselina porastom koncentracije triglicerida u serumu. Lipemija uzrokuje nepouzdanu rezultate pri koncentraciji SMOFlipid® 20% emulzije 10 g/L, odnosno pri koncentraciji triglicerida iznad 12,4 mmol/L u uzorcima niske inicijalne koncentracije ŽK.

Izrada referentnog intervala za žučne kiseline provodila se a priori pristupom. Određene su koncentracije žučnih kiselina u 116 uzoraka seruma referentnih ispitanica koje su odabrane temeljem prethodno postavljenih kriterija isključenja i uključivanja. Statistička obrada rezultata je provedena prema CLSI smjernicama. Referentni interval za populaciju trudnica od 28. do 42. tjedna trudnoće izrađen je neparametrijskom metodom i iznosi od 1,0 do 7,3 μmol/L.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 65 stranica, 16 grafičkih prikaza, 9 tablica i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: referentni interval, žučne kiseline, intrahepatička kolestaza u trudnoći, verifikacija metode, validacija, *a priori*

Mentor: **Dr. sc. Lora Dukić**, *docentica Hrvatskog katoličkog sveučilišta Medicinskog fakulteta.*

Dr. sc. Vladimir Blagaić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lora Dukić**, *docentica Hrvatskog katoličkog sveučilišta Medicinskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ana-Maria Šimundić, *naslovna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department for Medical Laboratory Diagnostics, University Hospital „Sveti Duh“
Ulica Sveti Duh 64, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Validation of reference interval for bile acids for the population of pregnant women from 28th to 42nd week of pregnancy

Lara Zorić

SUMMARY

Comparison of the patient's laboratory results with reference intervals is one of the most fundamental tools for interpreting laboratory results, making a clinical decision and monitoring the course of the disease. The aim of this study was to introduce a method for determining bile acids into the analytical system, to verify its parameters, and to establish a reference interval for bile acids for the population of pregnant women from the 28th to the 42nd week of pregnancy. Bile acids as a specific biomarker are used to diagnose intrahepatic cholestasis of pregnancy, a disease that usually occurs in the third trimester and manifests itself as pruritus while being potentially fatal for the child.

Verification of the method showed that bile acids are stable in serum samples for 2 days at 20 °C, 14 days at 4-8 °C, and 22 days at -20 °C. The precision study met the criteria. Within-laboratory precision was 2.2% and 1.7% for the concentration of bile acids within the reference range and above the upper limit, respectively. Linearity was verified for the concentration range of 3.5-172.1 µmol/l, and the verification of the reference interval for adults met the criteria. The lipemia interference test showed a positive bias (%) of bile acid concentration with an increase in serum triglyceride concentration. Lipemia causes unreliable results at a SMOFlipid® 20% emulsion concentration of 10 g/L, i.e. at a triglycerides concentration above 12.4 mmol/L in samples with a low initial concentration of bile acids.

Reference interval for bile acids was determined a priori. Total bile acids concentration was determined in 116 serum samples of the reference pregnant women who were selected based on the previously set exclusion and inclusion criteria. Statistical analysis of the results was carried out according to CLSI guidelines. The reference interval of 1.0 to 7.3 µmol/L for the population of pregnant women from the 28th to the 42nd week of pregnancy was determined using the non-parametric method.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 65 pages, 16 figures, 9 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: reference interval, bile acids, intrahepatic cholestasis of pregnancy, verification of the method, validation, *a priori*

Mentor: **Lora Dukić, Ph.D.** Assistant Professor, Catholic University of Croatia School of Medicine.
Vladimir Blagaić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb School of Medicine.

Reviewers: **Lora Dukić, Ph.D.** Assistant Professor, Catholic University of Croatia School of Medicine.
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Ana-Maria Šimundić, Ph.D. Full Professor (nominal title), University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: August 2022.