

# Utjecaj heparina na rezultate acidobazne ravnoteže

---

Mosurović, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:120871>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Lana Mosurović**

**Utjecaj heparina na rezultate  
acidobazne ravnoteže**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Nore Nikolac Gabaj.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Acidobazna ravnoteža .....	1
1.2. Parametri acidobazne ravnoteže .....	2
1.3. Analiza acidobazne ravnoteže.....	3
1.3.1. Vrste uzoraka .....	4
1.3.2. Postupak uzorkovanja .....	5
1.3.3. Postupak analize.....	8
1.3.4. Rezultati analize.....	9
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1. Materijali.....	11
3.2. Heparin.....	11
3.3. Analizator RapidPoint 400/405.....	12
3.4. Metode analizatora.....	14
3.4.1. Amperometrija .....	14
3.4.2. Potenciometrija .....	16
3.4.3. Metoda s glukoza-oksidazom .....	17
3.5. Opis postupka.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže neposredno nakon uzorkovanja?.....	21
4.2. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru neposredno nakon uzorkovanja?.....	22

4.3. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže 25 minuta nakon uzorkovanja?.....	23
4.4. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru 25 minuta nakon uzorkovanja?.....	24
4.5. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina stabilan 25 minuta?.....	25
4.6. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?.....	26
4.7. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina stabilan 25 minuta?.....	27
4.8. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?.....	28
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>29</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>30</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>32</b>
<b>8. POPIS KRATICA.....</b>	<b>34</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Acidobazna ravnoteža

Analiza acidobazne ravnoteže je klinička pretraga koja uključuje analizu parametara acidobazne ravnoteže, oksigenacijskog statusa te elektrolita i metabolita. To je neizostavna pretraga koju koriste jedinice intenzivne njege i jedinice hitnog prijema, a pripada prvoj kategoriji hitnosti, što znači da se nalazi analize acidobazne ravnoteže izdaju unutar 30 minuta od uzorkovanja (Dukić i sur., 2016).

Analiza obuhvaća mjerenje plinova u krvi, odnosno oksigenacijskog statusa. Njega procjenjujemo pomoću parcijalnog tlaka kisika ( $pO_2$ ) koji se mjeri amperometrijski, i saturacije hemoglobina kisikom ( $sO_2$ ) koja se određuje kooksimetrijski ili se izračunava iz vrijednosti  $pO_2$  i drugih parametara ukoliko analizator nema ugrađen kooksimetar. Parcijalni tlak ugljičnog dioksida ( $pCO_2$ ) i pH određuju se potenciometrijski, dok se drugi parametri kao što su višak baza (engl. base excess, BE), koncentracija bikarbonata ( $cHCO_3^-$ ) i ukupni ugljični dioksid ( $tCO_2$ ) računaju iz vrijednosti izmjerenih parametara. Neki suvremeni uređaji mogu određivati metabolite poput glukoze, laktata, bilirubina i kreatinina, i elektrolite (natrij, kalij, kloridi, ionizirani kalcij, ionizirani magnezij) (Dukić i sur., 2016).

Obzirom na širinu primjene pretraga acidobazne ravnoteže i na to da nisu standardizirane, javljaju se brojne razlike u uzorkovanju, obradi i kontroli kvalitete, što može imati utjecaja na konačni rezultat. Preporučeni uzorak za određivanje acidobazne ravnoteže je arterijska krv, no često se u rutinskoj dijagnostici koristi uzorak kapilarne krvi zato što je takvo uzorkovanje najmanje invazivno za pacijenta. To je jednostavan i relativno bezbolan postupak i iako je arterijska krv vrsta uzorka iz kojeg se dobivaju najpouzdaniji rezultati acidobazne ravnoteže, kapilarna krv može biti odgovarajuća zamjena za arterijski uzorak ukoliko se uzorkovanje provodi na standardiziran način (Dukić i sur., 2016).

## 1.2. Parametri acidobazne ravnoteže

U ispitivanju acidobazne ravnoteže određuje se niz parametara koji upućuju na stanje u organizmu. Neki se od njih određuju izravno, a neki posredno tako što se računaju iz vrijednosti izmjerenih parametara (Čvorišćec i Čepelak, 2009):

1. pH – negativni logaritam koncentracije  $H^+$  iona. Određuje se izravno potenciometrijski, a izražava izravnu mjeru kiselosti izvanstanične tekućine. Obzirom da praktički nema razlike između krvi i same krvne tekućine, određuje se i u punoj krvi. Regulacija pH unutar uskih granica vrlo je važna za život organizma.
2.  $pCO_2$  - parcijalni tlak ugljikova dioksida u krvi.  $pCO_2$  u plinskoj fazi i u tekućini su u ravnoteži pa je  $pCO_2$  dobar pokazatelj parcijalnog tlaka ugljikova dioksida u plinskoj fazi iako se određuje u tekućini. Mjeri se izravno potenciometrijski.
3. BE (engl. base excess) – višak baza je mjera koja označava višak ili manjak baza izvanstanične tekućine. Definira se kao količina jake kiseline ili jake baze utrošene za titraciju izvanstanične tekućine do pH 7,4, pri  $pCO_2$  od 5,33 kPa i temperaturi od 37°C. Pozitivan BE pokazuje da u krvi postoji višak baza, odnosno manjak hlapljivih kiselina, a negativan BE na manjak baza, odnosno višak nehlapljivih kiselina.
4.  $HCO_3^-$  - standardni bikarbonati, odnosno koncentracija bikarbonata potpuno oksigenirane krvi pri  $pCO_2$  od 5,33 kPa, temperaturi od 37°C i potpunog zasićenosti hemoglobina.
5.  $tCO_2$  - koncentracija ukupnog ugljikovog dioksida u krvi koji može biti otopljen u krvi, slabo vezan za proteine, u obliku bikarbonatnog ( $HCO_3^-$ ) ili karbonatnog aniona ( $CO_3^{2-}$ ), te ugljične kiseline ( $H_2CO_3$ ).
6.  $pO_2$  - parcijalni tlak kisika. Odražava količinu kisika otopljenog u krvi. Mjeri se izravno amperometrijski.
7.  $sO_2$  - zasićenje hemoglobina kisikom. Predočuje postotak mogućih veznih točaka hemoglobina koje su zasićene kisikom te ne ovisi o koncentraciji hemoglobina.
8. elektroliti –  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  i  $Cl^-$  potenciometrijski, glukoza metodom s glukoza-oksidadom

### 1.3. Analiza acidobazne ravnoteže

Pripreme za uzorkovanje krvi za analizu acidobazne ravnoteže uključuju: identifikaciju pacijenta, uputnicu, odnosno zahtjev liječnika za određivanje acidobazne ravnoteže, procjenu stanja pacijenta, obrazloženje postupka uzorkovanja pacijentu, te točno i precizno označavanje uzoraka za analizu acidobazne ravnoteže (Dukić i sur., 2016).

Kako bi identificirali pacijenta koji je pri svijesti, odgovorni djelatnik mora od pacijenta zatražiti da kaže svoje ime, prezime i datum rođenja, te dobivene podatke usporediti sa podacima upisanima na uputnici. Sve nepravilnosti potrebno je razriješiti prije samog uzorkovanja. Prema postupku koji preporučuje radna grupa za predanalitiku HDMBLM (Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu). Za sigurnost pacijenta potrebna su minimalno 2 osobna podatka. Ako od pacijenta nije moguće dobiti osobne podatke izravno, iste je potrebno zamoliti od osobe odgovorne za pacijenta ili osobe u pratnji (za djecu), te dokumentirati ime osobe koja je identificirala pacijenta (Dukić i sur., 2016).

Uputnica za davanje analize acidobazne ravnoteže treba sadržavati (Dukić i sur., 2016):

- ime i prezime pacijenta,
- spol,
- datum rođenja,
- osobni identifikacijski broj ili broj zdravstvenog osiguranja,
- datum, vrijeme i mjesto uzorkovanja.

Uputnica također treba sadržavati ime osobe koja je zatražila analizu, te navedene kontakt podatke odgovorne osobe za potrebe javljanja kritičnih rezultata ili bilo kakvih nesukladnosti.

Pacijent treba biti detaljno obaviješten o postupku uzorkovanja, a uzorak za acidobaznu ravnotežu treba biti označen s punim imenom i prezimenom i dodatnim osobnim podatkom koji može biti datum rođenja, broj zdravstvenog osiguranja ili osobni identifikacijski broj. Ako uzorkujemo kapilarnu krv, kapilarni uzorak potrebno je označiti sa dva osobna podatka, odmah nakon uzorkovanja, u prisutnosti pacijenta (Dukić i sur., 2016).



### 1.3.1. Vrste uzoraka

Za analizu acidobazne ravnoteže mogu se koristiti: arterijska krv, „arterijalizirana“ kapilarna krv, „miješana“ venska krv i venska krv. Pri odabiru uzorka liječnik treba uzeti u obzir stanje pacijenta, te prednosti i ograničenja pojedinih vrsta uzoraka (Dukić i sur., 2016).

Arterijska krv se koristi za točnu procjenu izmjene plinova, funkcije pluća i oksigenacijskog statusa. Sastav arterijske krvi je jedinstven i ne ovisi o promjenama u sistemskoj ili lokalnoj cirkulaciji, te je uzorak izbora za procjenu acidobazne ravnoteže. Arterijska krv se može uzorkovati pomoću posebne štrcaljke, a mjesta uzorkovanja mogu biti radijalna, brahijalna i femoralna arterija. Najčešće se krv uzorkuje iz radijalne arterije. Uzorkovanje iz brahijalne arterije se provodi kada je potreban veći volumen krvi, a uzorkovanje iz femoralne arterije rijetko se koristi zbog slabe kolateralne cirkulacije i povećanog rizika od nastanka infekcije i hematoma. Arterijsku krv je mnogo teže uzorkovati nego vensku ili kapilarnu, pa uzorkovanje može biti bolno i potencijalno opasno po pacijenta. Stoga uzorkovanje arterijske krvi može provoditi zdravstveni djelatnik unutar pravnih okvira svoje struke, a koji je pokazao potrebne vještine nakon odgovarajuće edukacije. U Republici Hrvatskoj liječnici moraju biti osposobljeni za uzorkovanje arterijske krvi nakon završenog studija, a medicinske sestre se osposobljavaju za uzorkovanje arterijske krvi na zahtjev liječnika (Dukić i sur., 2016; Nikolac i sur., 2013).

Kapilarni uzorak može zamijeniti arterijski uzorak, ako je provedena tehnika arterijalizacije koja uključuje grijanje ubodnog mjesta korištenjem toplog, vlažnog ručnika temperature do 42°C, kojim se prekriva ubodno mjesto u trajanju od 3-5 minuta neposredno prije uboda. Koraci kapilarnog uzorkovanja uključuju dezinfekciju mjesta uboda, sušenje ubodnog mjesta na zraku, ubod i uklanjanje prve kapljice krvi, te anaerobno uzorkovanje iz središta druge spontano formirane kapljice krvi. Obzirom da je teže uzorkovati arterijsku krv, mnogi liječnici traže analizu acidobazne ravnoteže iz kapilarnog uzorka u sklopu svakodnevnog praćenja stanja pacijenata. Uzorkovanje kapilarne krvi je jednostavno i bezbolno i može se provoditi nakon minimalne edukacije zdravstvenih djelatnika. Postoje okolnosti u kojima nije moguće uzorkovati arterijsku krv, te se tada kapilarni uzorak smatra odgovarajućom zamjenom za arterijski, dok je u pedijatriji i neonatologiji uzorak izbora. Koristi se i za uzorkovanje odraslih bolesnika s teškim opeklinama, kod sklonosti trombozi, te kod pretilih i gerijatrijskih pacijenata (Dukić i sur., 2016; Nikolac i sur., 2013).

Uzorak miješane venske krvi koristi se za procjenu primitka kisika i srčanog minutnog volumena, a uzorkuje se iz plućne arterije pomoću katetera za plućnu arteriju (Dukić i sur., 2016).

Uzorak venske krvi je prikladan za određivanje različitih varijanti hemoglobina, elektrolita, pH, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i metabolita (Dukić i sur., 2016).

### **1.3.2. Postupak uzorkovanja**

U zdravstvenim ustanovama u Republici Hrvatskoj uzorkovanja arterijske krvi provode liječnik i medicinska sestra, a laboratorijski djelatnici trebaju informirati zdravstvene djelatnike zadužene za arterijsko uzorkovanje o ključnim elementima postupka uzorkovanja (Dukić i sur., 2016).

Ključni čimbenici za uzorkovanje arterijske krvi su (Dukić i sur., 2016):

- spremnik za uzorkovanje, odnosno plastična štrcaljka za jednokratnu upotrebu koja se sama puni,
- antikoagulans,
- označavanje uzoraka i sadržaj uputnice,
- transport,
- pohrana.

Kao antikoagulans se preporuča korištenje liofiliziranog balansirano litijevog heparina. Upotreba natrijevog heparina se ne preporuča jer može uzrokovati lažno povišene vrijednosti natrija, kao i tekući heparin zbog dilucijskog učinka na parametre acidobazne ravnoteže (Dukić i sur., 2016; Leniček Krleža i sur., 2016).

Ubodno mjesto potrebno je dezinficirati, te koristiti specifičan spremnik namijenjen arterijskom uzorkovanju (slika 1) kako bi se izbjegla slučajna kontaminacija arterijske krvi venskom. Kada je štrcaljka dovoljno napunjena krvlju, uklanja se i na ubodno mjesto se stavlja suha gaza, koja se čvrsto pritišće 3-5 minuta. Mjehuriće zraka treba odmah istisnuti iz štrcaljke laganim kuckanjem stjenki, pri čemu se mjehurići pomiču na vrh i istiskuju. Tako se sprječava kontaminacija uzorka zrakom. Nakon toga potrebno je lagano promiješati uzorak s

antikoagulansom kako ne bi nastali ugrušci. To se postiže rolanjem štrcaljke između dlanova i okretanjem po okomitoj osi. Snažno miješanje može dovesti do hemolize i promijenjenih rezultata acidobazne ravnoteže. Ukoliko se za uzorkovanje koristi arterijski kateter, prije uzorkovanja potrebno ga je prvo isprati sa minimalno tri mrtva volumena katetera kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka i lažno sniženih ili povišenih rezultata acidobazne ravnoteže (Dukić i sur., 2016; Leniček Krleža i sur., 2016).



Slika 1. Arterijska štrcaljka za acidobaznu ravnotežu ([www.radiometer.com](http://www.radiometer.com))

Arterijske uzorke treba analizirati unutar 30 minuta, a preporuča se transport uzoraka u ruci bez naglih pokreta, kako ne bi došlo do hemolize i kontaminacije uzorka zrakom. Ako vrijeme od uzorkovanja do dostave uzorka u laboratoriji prelazi 30 minuta, potrebno je kontaktirati osoblje odjela i zatražiti novo uzorkovanje. Vrijednosti acidobazne ravnoteže se mogu brzo i značajno promijeniti, stoga se preporuča brza analiza uzoraka, a uzorci za posebne analize trebaju se analizirati unutar 5 minuta (Dukić i sur., 2016, Leniček Krleža i sur., 2016).

Punkcija kapilarne krvi se provodi na površini distalnog segmenta (jagodica prsta), srednjeg prsta ili prstenjaka, kada je dlan okrenut prema gore (slika 2).



Slika 2. Preporuka za mjesto uboda kod kapilarnog uzorkovanja iz prsta. Mjesto uboda je distalni segment (jagodica prsta) srednjeg prsta ili prstenjaka sa strane dlana (lijevo). Ubod treba presijecati otiske prsta (desno) (Leniček Krleža i sur., 2016).

U neonatologiji se kapilarna krv uzorkuje iz bočnih strana pete. Ukoliko nije moguće uzorkovati arterijsku krv, ušna resica je znatno bolji izbor uzorkovanja od jagodice prsta jer krv pravilno uzorkovana iz ušne resice po sastavu više nalikuje arterijskoj krvi, nego krv uzorkovana iz jagodice prsta (Leniček Krleža i sur., 2016).

Koraci uzorkovanja kapilarne krvi uključuju (Leniček Krleža i sur., 2016):

- dezinfekciju mjesta uboda,
- sušenje ubodnog mjesta na zraku,
- ubod i uklanjanje prve kapljice krvi,
- anaerobno uzorkovanje iz središta druge, spontano formirane kapljice krvi.

Tiskanje ubodnog mjesta tijekom uzorkovanja treba izbjegavati jer može doći do hemolize i kontaminacije uzorka tkivnom tekućinom. Kapilarna krv se uzorkuje u kapilare koje odgovaraju uređaju za analizu acidobazne ravnoteže. Također treba voditi računa o minimalnom volumenu kapilarnog uzorka potrebnog za analizu. Kao preporučeni antikoagulans koristi se balansirani liofilizirani litijev heparin. Kapilare se pune anaerobno, te ih je neposredno nakon završetka punjenja potrebno zatvoriti čepićima, kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka atmosferskim zrakom. Nakon toga uzorak se mora lagano izmiješati s antikoagulansom kako ne bi došlo do

formiranja ugrušaka. Za miješanje uzorka koriste se metalni štapić i magnet (Leniček Krleža i sur., 2016).

Kapilarni uzorak potrebno je analizirati odmah, odnosno unutar 10 minuta, a uzorke do analize treba pohraniti na sobnoj temperaturi. Ako pohrana traje duže uzorci trebaju biti uzeti u staklene kapilare i trebaju se pohraniti u vodoravnom položaju na temperaturi 0 do 4°C (kako ne bi došlo do hemolize) do maksimalno 30 minuta (Dukić i sur., 2016; Leniček Krleža i sur., 2016).

### **1.3.3. Postupak analize**

Analizu acidobazne ravnoteže treba izvoditi educirano medicinsko osoblje, a svi edukacijski zahtjevi trebaju biti navedeni u službenoj laboratorijskoj dokumentaciji. Kompetencije novih djelatnika uključenih u analizu acidobazne ravnoteže trebaju se ocijeniti, a kompetencije svih djelatnika provjeravati jednom godišnje. Zapisi o edukaciji i kompetencijama laboratorijskog osoblja trebaju biti pohranjeni prema standardima dobre laboratorijske prakse (Dukić i sur., 2016).

Prije same analize potrebno je provjeriti kvalitetu uzorka, odnosno obratiti pozornost na mjehuriće zraka i vidljive ugruške na uzorku, jer takvi uzorci nisu prihvatljivi za analizu. Krv prije analize treba promiješati. U slučaju prisutnosti mjehurića zraka, ugrušaka, nedovoljnog volumena uzorka ili neke druge nesukladnosti, uzorak se ne analizira i traži se ponavljanje uzorkovanja. Ugrušci mogu blokirati put uzorka uređaju i onesposobiti uređaj ili dati lažne rezultate analize. Prije uvođenja uzorka u uređaj potrebno je ukloniti zaostali zrak iz uzorka, nakon čega se kapilara postavlja na uređaj i pokreće se analiza prema uputama proizvođača za korištenje pojedinog uređaja. Također je potrebno unijeti podatke o pacijentu izravno u uređaj ili u laboratorijski informacijski sustav i zabilježiti vrijeme analize uzorka (Dukić i sur., 2016).

#### 1.3.4. Rezultati analize

Nakon analize potrebno je pregledati rezultate i usporediti s prethodnim rezultatima pacijenta, a u slučaju neslaganja ili sumnjivih rezultata analizu treba ponoviti na drugom uređaju u što kraćem vremenu, kako se ne bi bitno promijenila kvaliteta uzorka. Sumnjive rezultate treba prijaviti odgovornoj osobi. Za optimalan rad uređaja, laboratorij treba slijediti preporuke proizvođača o održavanju uređaja, redovito kalibrirati i provoditi kvalitetu uređaja (Dukić i sur., 2016).

Potpuni nalaz treba sadržavati informacije o (Dukić i sur., 2016):

- pacijentu
- vrijednostima plinova u krvi i/ili vezanih mjerenja,
- vremenu uzorkovanja,
- vremenu dostave uzorka,
- vremenu analize,
- vremenu izdavanja rezultata,
- vrsti uzorka, načinu uzorkovanja,
- ventilacijskom statusu,
- načinu ventiliranja i dopremi kisika,
- vrsti i mjestu davanja infuzije,
- mjestu uzorkovanja,
- broju udisaja u minuti,
- tjelesnoj temperaturi,
- posebne napomene o stanju pacijenta.

Također treba navesti komentare vezane uz kvalitetu uzorka, produljeni transport i nepravilnu pohranu uzorka (Dukić i sur., 2016).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Analiza acidobazne ravnoteže je jedna od najčešće korištenih pretraga na jedinicama intenzivne njege te kod hitnog prijema pacijenata. Obzirom na učestalost i brzinu uzorkovanja i analize uzorka, laboratorijsko osoblje odgovorno za uzorkovanje svakodnevno se susreće sa mnogim izazovima održavanja odgovarajuće kvalitete uzorka. Uzorak je u pojedinim slučajevima teško dopremiti od mjesta uzorkovanja do mjesta analize unutar nekoliko minuta. Laboratorijski djelatnici odgovorni za uzorkovanje često moraju hitno obići nekoliko mjesta uzorkovanja i ne mogu dopremiti svaki uzorak u istom vremenu u laboratorij na analizu. Stoga se događa da pojedini uzorci stoje neanalizirani i po 25 minuta dok laboratorijski djelatnik ne sakupi preostale uzorke i u isto ih vrijeme dopremi u laboratorij na analizu. Kako uzorci stoje neanalizirani neko vrijeme, može doći do pojave ugrušaka i uzorak se ne smije analizirati, a uzorkovanje se mora ponoviti. Da bi se to izbjeglo, laboratorijski djelatnici neposredno prije uzorkovanja u kapilare stavljaju nekoliko kapi tekućeg (terapijskog) heparina, s kojim lagano promiješaju kapilarnu krv nakon uzorkovanja, kako bi se smanjila pojava nastajanja ugrušaka.

Tekući (terapijski) heparin može imati dilucijski učinak na parametre acidobazne ravnoteže i vezana mjerenja, te je sposoban vezati elektrolite, pogotovo kalcij, a posljedica mogu biti pogrešni rezultati analize. U ovome radu se uspoređuju laboratorijski nalazi acidobazne ravnoteže kapilarnog uzorka uzorkovanog iz jagodice prstenjaka sa dodatkom tekućeg heparina i onoga bez tekućeg heparina, analizirani 5 minuta, odnosno 25 minuta nakon samog uzorkovanja. Cilj rada je utvrditi mijenjaju li se rezultati acidobazne ravnoteže u ovisnosti o dodatku heparina i vremenu do analize uzorka, i da li je ta promjena klinički značajna, odnosno može li se i dalje koristiti u laboratorijskoj praksi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

1. Analizatori za acidobaznu ravnotežu RapidPoint 405/400 (Siemens Healthcare, Erlangen, Njemačka)
2. Reagensi za Rapid Point 400/405, kapilare i čepići (Siemens Healthcare, Erlangen, Njemačka)
3. MiniCollect® sigurnosne lancete, 2,0 mm (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija)
4. 70% otopina etanola za dezinfekciju
5. Tekući heparin

#### **3.2. Heparin**

Heparin je aktivni sastojak koji sprječava zgrušavanje krvi i djeluje fibrinolitički, pripada skupini antikoagulsansa. Ima strukturu glikozaminoglikana, formira ga sam organizam ali se može dodatno uzimati u svrhu terapije. Antikoagulantni heparin povećava djelovanje antitrombina koji je najvažniji endogeni inhibitor zgrušavanja krvi. Antitrombin inaktivira trombin pa se fibrinogen otopljen u krvi ne može nakupiti u čvrsti fibrin. Heparin proizvodi ljudsko tijelo i pohranjuje se u mastocitima i bazofilnim granulocitima ([hr.the-health-site.com](http://hr.the-health-site.com); [hr.healthandmedicineinfo.com](http://hr.healthandmedicineinfo.com)).

Terapeutski korišteni heparini dijele se na nefrakcionirani heparin (UFH, heparin velike molekulske mase) i frakcionirani heparin (NMH-heparin male molekulske mase). Heparin niske molekularne mase proizvodi se od nefrakcioniranog heparina. Njegova prednost je ta što djeluje duže i bolje se apsorbira u tijelu, odnosno ima veću bioraspodjivost, što znači pojačani učinak heparina i manji rizik od nuspojava heparina ([hr.the-health-site.com](http://hr.the-health-site.com); Turkalj, 2019.).

Kapilare koje se koriste za uzorkovanje kapilarne krvi su iznutra obložene liofiliziranim balansiranim litijevim heparinom kako bi se spriječio nastanak ugrušaka u kapilari. Za potrebe ovoga rada se koristio i dodatak tekućeg (terapijskog) heparina.



### 3.3. Analizator RapidPoint 400/405

Analizator RapidPoint 400 i RapidPoint 405 su analizatori na kojima se određuju parametri acidobazične ravnoteže i ionizirani kalcij (slika 3).



Slika 3. RapidPoint 400/405 ([www.selectscience.net](http://www.selectscience.net))

Analizatori su preko UPS uređaja (uređaj za rezervno napajanje) trajno uključeni u električnu mrežu i ne smiju se gasiti. UPS uređaj omogućuje analizatoru rad bez struje u periodu do 2 sata. Analizatori su umreženi u LIS (laboratorijski informacijski sustav). Da bi prijenos rezultata s analizatora funkcionirao, moraju biti uključeni povezači. Kod uključivanja računala na kojem su povezači automatski se nudi upis korisničkog imena i lozinke laboratorijskog djelatnika i prijava na svakom od povezača. Otvaranjem preglednika bilo kojeg analizatora na bilo kojem računalu moguć je uvid u rezultate sa svih analizatora (Miler i Božović, 2017).

Na početnom ekranu za analizu uzoraka postavljen je kapilarni uzorak kao uzorak izbora. Ukoliko se izvodi analiza arterijskog uzorka iz štrcaljke, potrebno je izabrati štrcaljku dodirrom na sliku štrcaljke postavljenu iznad slike kapilare na ekranu. Uzorak se postavlja horizontalno u ležište u sample port-u (ležište u koje se stavlja štrcaljka/kapilara). Poseban oprez je potreban kod postavljanja kapilare. Kapilara se ne smije postavljati u sample port pod kutom, jer može doći do pucanja kapilare, ulaska krhotina u mjerni umetak i propadanja umetka (Miler i Božović, 2017).

Crtični kod na uputnici se postavi pred čitač crtičnog koda koji je smješten na stalku lijevo od analizatora. Kada čitač registrira kod, začuje se zvučni signal, a na ekranu se pojavljuje deseteroznamenasti broj koji se sastoji od datuma, broja protokola uzorka i vrste uzorka. Deseteroznamenasti broj predstavlja ID identifikacijski broj pacijenta kod očitavanja pomoću čitača crtičnog koda. Slijedi analiza. Po završetku analize uzorka pisač će ispisati rezultate analize. Svaki ispis sadrži podatke o analizatoru na kojem je provedena analiza, serijskom broju analizatora, ID identifikacijskom broju pacijenta i, ukoliko je unesen i taj podatak, prezime pacijenta (Miler i Božović, 2017).

S analizatora Rapidpoint moguć je prijenos brojki i nekih znakova u LIS. Ovo je važno kada je neki analit izvan mjernog raspona analizatora (tablica 1.). Stoga je važno svaki rezultat pregledati na ekranu analizatora Rapidpoint ili na ispisu iz analizatora. Ukoliko je rezultat iznad ili ispod mjernog raspona, u pregledniku se pojavljuje oznaka kraj parametra. U tom slučaju je potrebno upisati u rezultat „veći“ od gornje granice, odnosno „manji“ od donje granice mjernog raspona analizatora. Za računske parametre se upisuje kosa crta kraj rezultata i u napomeni navodi da ih analizator ne može izdati. Nakon završetka analize i potvrde rezultata kapilare se bacaju u spremnik za biološki otpad, a štrcaljke u spremnik za 24-satnu pohranu (Miler i Božović, 2017).

Tablica 1. Mjerni rasponi analizatora Rapidpoint 405/400 (Miler i Božović, 2017)

<b>PARAMETAR</b>	<b>MJERNI RASPON</b>
pH	6,500-7,800
pCO <sub>2</sub>	0,66-26,66 kPa
pO <sub>2</sub>	1,33-93,32 kPa
Ca <sup>2+</sup>	0,20-5,00 mmol/L
Na <sup>+</sup>	100,0-200,0 mmol/L
K <sup>+</sup>	0,50-15,00 mmol/L
Cl <sup>-</sup>	65-140 mmol/L
Glukoza	1,1-41,6 mmol/L
Saturacija kisika	15-100%

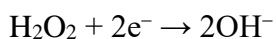
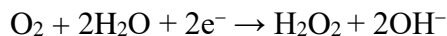
Kada se mjerni umetak stavi u analizator provodi se automatska kalibracija senzora koja traje 20 minuta. Nakon automatski provedene kalibracije, analizator samostalno provodi periodično kalibriranje sustava u trajanju od 6 minuta tijekom kojih nije moguće analizirati uzorke. Kalibracija se provodi korištenjem integriranih otopina koje se nalaze u mjernom umetku (Miler i Božović, 2017).

### 3.4. Metode analizatora

Analizator RapidPoint za analizu acidobazne ravnoteže i elektrolita koristi metodu potenciometrije za mjerenje pH, pCO<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>, metodu amperometrije za mjerenje pO<sub>2</sub> i metodu s glukoza-oksidadom za mjerenje glukoze u uzorku kapilarne krvi. Ostali parametri se računaju iz izmjerenih parametara.

#### 3.4.1. Amperometrija

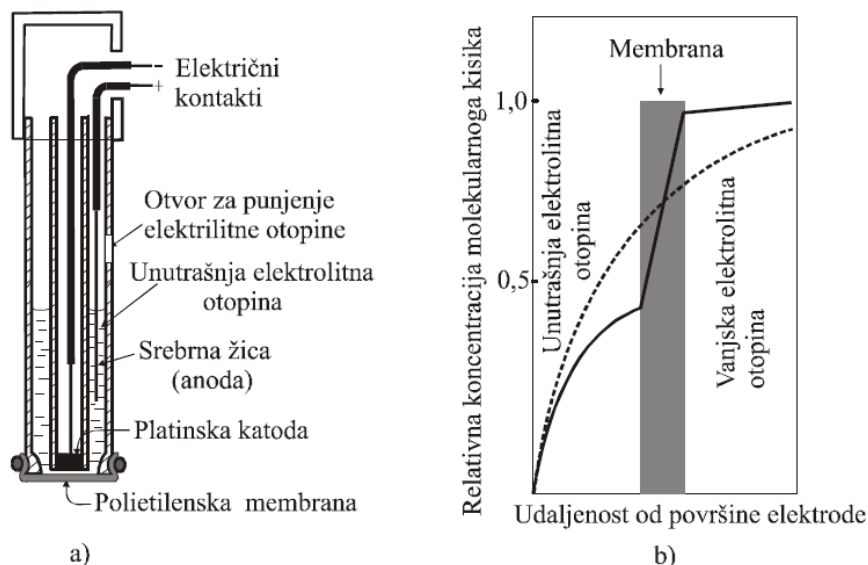
Amperometrija je elektrokemijska tehnika pri kojoj se mjeri struja koja prolazi kroz elektrolitsku ćeliju pri konstantnom potencijalu. Mjeri se promjena struje kao funkcija koncentracije elektroaktivne vrste, a najčešće se primjenjuje kisikova (Clarkova) elektroda. Elektrokemijski senzori za mjerenje koncentracije kisika temelje se na elektrokemijskoj reakciji: (Piljac, 2010)



Redukcija molekularnoga kisika odvija se u dva stupnja.

Na drugim elektrodama (Pt, Au ili C) javlja se jedan 4-elektronski redukcijski val koji odgovara ukupnoj redukciji molekule kisika u 4OH<sup>-</sup> ione. Granična struja redukcije (difuzijska struja) postiže se pri potencijalu elektrode od -600 do -900 mV prema Ag/AgCl referentnoj elektrodi. Za čistu površinu elektrode uvjeti prijenosa molekularnoga kisika iz otopine do elektroda veće površine jednaki su već opisnim uvjetima za bilo koju elektroaktivnu vrstu. Prednost imaju elektrode male površine (mikroelektrode) u kojih granična struja nije ovisna o trajanju mjerenja i

hidrodinamičkim uvjetima u mjernej ćeliji. Suvremena kisikova elektroda zapravo je malena elektrokemijska ćelija u kojoj su obje elektrode (katoda i anoda) i elektrolitna otopina smještene iza, za molekule kisika, propusne membrane (slika 4). Tanki hidrofilni film, u pravilu, nema mehaničku čvrstoću, što može predstavljati problem pri mjerenju u kojem se elektroda utiskuje u medij (npr. tkivo). Pad osjetljivosti tijekom mjerenja može se ukloniti smanjenjem radne površine elektrode do mikronskih dimenzija (Piljac, 2010).



Slika 4. Clarkova kisikova elektroda (a) i koncentracijski profil molekularnoga kisika u osiromašenom sloju uz površinu elektrode u uvjetima granične struje redukcije u prisutnosti membrane (puna krivulja) i bez membrane (isprekidana krivulja) (b) (Piljac, 2010).

Nekoliko vrsta materijala rabi se u izradi membrana (teflon, polietilen, silikonska guma i dr.). Izborom materijala i veličinom pora membrana može se ostvariti i stanovita selektivnost u specifičnim uvjetima mjerenja. Uvjeti prijenosa (difuzija) molekularnoga kisika kroz strukturu membrane i otopinu do površine katode složeni su (Piljac, 2010).

Kisikova elektroda rabi se u uvjetima u kojima je molekularni kisik otopljen u mediju (elektrolitna otopina u dodiru sa zrakom). Pri tom prijenos molekularnoga kisika do površine elektrode može biti samo difuzijom ili se odvija difuzijskom konvekcijom, dakle uz hidrodinamičke uvjete. Rabi se u uvjetima u kojima se u reakcijskom sloju molekularni kisik oslobađa (biosenzori) ili troši (u biološkim tkivima). Za mjerenje u medicini i fiziologiji rabe se “kateter” elektrode s vanjskim promjerom od 2 mm (Piljac, 2010).

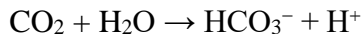
### 3.4.2. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda u kojoj se mjeri razlika potencijala između elektroda elektrokemijske ćelije uz ravnotežne uvjete. Mjerenje napona ćelije provodimo tako da kroz ćeliju ne teče struja, odnosno teče tako malena električna struja da ne utječe mjerljivo na stanje ravnoteže na elektrodama. Uz uvjet da su reakcije na elektrodama elektrokemijski reverzibilne, potenciometrija omogućuje određivanje promjene slobodne entalpije i konstante ravnoteže kemijskih reakcija te aktiviteta odnosno koncentracija i koeficijenta aktiviteta velikoga broja molekularnih vrsta u otopinama (Geber, 2020; Piljac, 2010).

Razliku potencijala između elektroda ćelije mjerimo pomoću osjetljivih mjernih uređaja potenciometara i voltmetara s velikom ulaznom impedancijom, tzv. pH-metara odnosno pIon-metara. Te mjerne naprave omogućuju mjerenje razlike potencijala uz minimalni tok struje kroz elektrokemijsku ćeliju. Potenciometrijska mjerenja provodimo uz uporabu dviju elektroda. Najčešće je jedna od njih referentna elektroda. Potencijal referentne elektrode ne ovisi o aktivitetima aktivnih molekularnih vrsta u potenciometrijskoj ćeliji. Zato se potencijal referentne elektrode tijekom mjerenja ne mijenja. Druga je elektroda indikatorska elektroda, a njezin potencijal ovisi o aktivitetu (koncentraciji) jedne ili više molekularnih vrsta u ćeliji (Geber, 2020; Piljac, 2010).

Određivanje aktiviteta vodikovih iona odnosno negativnog logaritma aktiviteta ( $\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$ ) najviše je rabljeni potenciometrijski postupak u znanstvenoj i analitičkoj praksi. Široki raspon aktiviteta vodikovih iona u vodenim otopinama od 14 pH jedinica i znatni utjecaj aktiviteta vodikovih iona na mnoge kemijske reakcije u otopinama nameće potrebu poznavanja, a time i mjerenja aktiviteta  $\text{H}^+$  iona. Za potenciometrijsko određivanje aktiviteta vodikovih iona u otopinama odnosno određivanje pH otopina primjenjujemo nekoliko vrsta indikatorskih elektroda, a najviše korištena indikatorska elektroda za ione  $\text{H}^+$  je staklena elektroda, koja je praktično istisnula iz uporabe sve ostale vrste indikatorskih elektroda za mjerenje pH (Geber, 2020; Piljac, 2010).

Elektrode za plinove se koriste za mjerenje koncentracije ili parcijalnoga tlaka  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{HCN}$ . Rad im se temelji na reakciji plinova s vodom. Reakcijom ionizacije molekula plina s vodom nastaju ioni, mjeri se aktivitet jednog od nastalih iona i na temelju toga određuje koncentracija plina.



Aktivitet iona utvrđuje se s pomoću odgovarajuće ion-selektivne elektrode. Najčešće se koristi staklena elektroda za ione  $\text{H}^+$  kojom se mjeri promjena pH otopine kao funkcija reakcije ionizacije (Geber, 2020; Piljac, 2010).

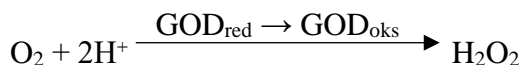
Za mjerenje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  iona koriste se ion-selektivne elektrode. Staklena elektroda selektivna je za ione  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , Ag/AgCl elektroda se koristi kao referentna elektroda i kao potenciometrijski senzor za  $\text{Cl}^-$  ione, a najpoznatija komercijalna elektroda s tekućom membranom je elektroda selektivna za  $\text{Ca}^{2+}$  ione (Geber, 2020; Piljac, 2010).

### 3.4.3 Metoda s glukoza-oksidadom

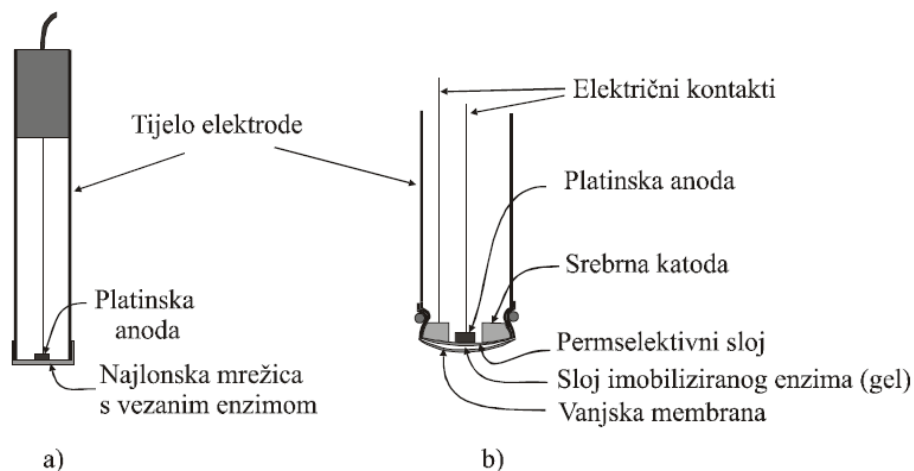
Za mjerenje koncentracije glukoze koriste se amperometrijski biosenzori. Amperometrijski biosenzori temelje se na imobilizaciji biološki osjetljivoga sloja, npr. enzima, antitijela, DNA, na površinu radne elektrode. Mehanizmom prepoznavanja aktivna tvar stupa u interakciju s ciljanim analitom i omogućuje nastajanje elektrokemijskog analitičkog odzivnoga signala. U mnogim slučajevima enzim odnosno suspenzija drže se uz površinu elektrode pomoću propusne polimerne membrane, npr. membrane za dijalizu. Imobilizacija aktivne tvari na površinu elektrode može se učiniti uklapanjem u gel, adsorpcijom, kovalentnim (unakrsnim) vezanjem i stvaranjem ovojnice (kapsule). Mnogi biosenzori su amperometrijski senzori zasnovani na selektivnim biokemijskim reakcijama kojima se ostvaruje visoka selektivnost senzora (Piljac, 2010).

Biosenzori za glukozu najuspješniji su amperometrijski biosenzori. Koriste se za mjerenje koncentracije glukoze u prehrambenim proizvodima, u kliničkoj analizi plazme i krvi, odnosno u biološkim tkivima. Malene naprave za mjerenje glukoze služe kao osobni pribor za dijabetičare. Različiti su načini mjerenja koncentracije glukoze amperometrijskim sensorima, a većina se temelji na katalitičkoj reakciji oksidacije glukoze pomoću enzima glukoza-oksidade (GOD) u prisutnosti molekularnoga kisika (Piljac, 2010; Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Reakcija s glukoza-oksidadom se temelji na parcijalnoj reakciji oksidacije aldehidne skupine glukoze u karboksilnu skupinu, i parcijalne reakcije redukcije molekularnoga kisika. Glukoza-oksida u katalitičkoj reakciji prelazi iz oksidiranog oblika u reducirani oblik i natrag.



Za kvantifikaciju koncentracije glukoze u uzorku može se elektrokemijski mjeriti koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao produkta reakcije ili promjena (smanjenje) koncentracije kisika u reakcijskom sloju. Mjerenjem jakosti struje anodne oksidacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri potencijalu elektrode od oko +600 mV prema Ag/AgCl referentnoj elektrodi, utvrđuje se koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ona je u relaciji s koncentracijom glukoze u ispitivanom mediju. To se može učiniti tako da se enzim kemijski veže na površinu najlonske mrežice kojom se prekrije površina platinske elektrode (anoda) ili uklapanjem enzima u polimerni gel (slika 5) (Piljac, 2010, Čvorišćec i Čepelak, 2009).



Slika 5. Biosenzori za glukozu zasnovani na anodnoj oksidaciji  $\text{H}_2\text{O}_2$ , s imobiliziranim enzimom na površini najlonske mrežice (a) i u polimernom gelu (b) (Piljac, 2010).

### 3.5. Opis postupka

Za potrebe ovoga rada je korišteno 88 uzorka kapilarne krvi dobivenih dobrovoljno od djelatnika Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, po 4 kapilare od svake osobe, uzorkovane po Nacionalnim preporukama za kapilarno uzorkovanje krvi (Dukić i sur., 2016).

Nakon dezinfekcije ruku označavaju se kapilare prikladnim malim naljepnicama. Nakon stavljanja jednokratnih rukavica odabire se mjesto uboda. Osoba mora biti u sjedećem položaju tijekom uzorkovanja. Mjesto uboda mora biti na distalnom segmentu (jagodica prsta) srednjeg prsta ili prstenjaka sa strane dlana, s bočne strane prsta gdje je debljina tkiva dovoljna da se spriječi ozljeda kosti. Ubod bi trebao presijecati otiske prsta, a ne ići paralelno s njima. Dezinficira se mjesto uboda 70%-tnom otopinom etanola i vatom, koje se osuši na zraku, nakon čega se pritiskom na automatsku lancetu učini ubod. Koristile su se lancete duljine 2,0 mm, obzirom da se radilo o odraslim osobama za koje je preporučena dubina uboda za kapilarno uzorkovanje 2,4 mm. Koristi se nešto kraća lanceta nego što je preporučena dubina uboda.

Nakon uboda se uklanja prva kapljica krvi pomoću čistog i suhog pamučnog jastučića zato što prva kapljica krvi sadrži međustaničnu i staničnu tekućinu koja može kontaminirati uzorak. Formira se druga kapljica krvi, vrh kapilare se stavlja u doticaj sa drugom kapljicom i kapilara se puni pomoću kapilarnih sila. Mjesto uboda se ne smije tiskati ili masirati jer može doći do hemolize, kontaminacije uzorka međustaničnom i/ili staničnom tekućinom ili prekida strujanja krvi iz ubodnog mjesta. Lancete i ostali pribor se odmah nakon korištenja uklanja i odlaže na sigurno i za to predviđeno mjesto. Napunjena kapilara se zatvara odgovarajućim čepićima, lagano promiješa sa antikoagulansom te odloži na sigurno mjesto i potom analizira. Mjesto uboda se pritisne suhim čistim pamučnim jastučićem, lagano se podigne ruka i drži pamučni jastučić na mjestu uboda, 1-3 minute. Skidaju se rukavice i operu ruke.

Uzorkovane su 4 kapilare po osobi. Dvije kapilare su sadržavale samo liofilizirani heparin kao antikoagulans, dok je u preostale dvije dodan tekući heparin, oko 0,5 cm u kapilari što je ekvivalent jednoj manjoj kapljici krvi. Dvije kapilare, jedna sa dodanim heparinom i jedna bez dodanog heparina, su analizirane odmah, a druge dvije kapilare su analizirane nakon 25 minuta. Kapilare su se punile principom slučajnog odabira. Vrijeme od 25 minuta je odabrano nakon



razgovora sa laboratorijskim djelatnicima odgovornima za uzorkovanje, kao prosječno vrijeme koje protekne između uzorkovanja i analize nekih uzoraka.

Obzirom da znamo kako tekući heparin ima dilucijski učinak na uzorak i da može promijeniti rezultate analize acidobazne ravnoteže, u ovom radu odgovaramo na pitanja:

1. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže neposredno nakon uzorkovanja?
2. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru neposredno nakon uzorkovanja?
3. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže 25 minuta nakon uzorkovanja?
4. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru 25 minuta nakon uzorkovanja?
5. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina stabilan 25 minuta?
6. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?
7. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina stabilan 25 minuta?
8. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?

Za potrebe rada korišteni su programi MedCalc i Microsoft®Excel®. Parametri su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Wilcoxonov test i test usporedbe proporcija su korišteni za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina. Odabrana razina značajnosti iznosi 0,05.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže neposredno nakon uzorkovanja?

Tablica 2. Prikaz rezultata uzoraka sa i bez heparina nakon 0 minuta

	Kapilara (0 minuta) N=22	Kapilara + heparin (0 minuta) N=22	P	Dopušteno odstupanje (%)	Izračunato odstupanje (%)
pH (pH jedinice)	7,432 (7,413-7,449)	7,440 (7,417-7,463)	0,702	-	-
pCO <sub>2</sub> (kPa)	4,9 (4,4-5,1)	4,4 (3,8-4,8)	<b>0,033</b>	4,08	<b>10,20</b>
BE	-0,1 (-1,3-0,8)	-1,9 (-2,7-(-0,6))	<b>0,0004</b>	-64,82	<b>-85,71</b>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	23,7 (22,2-24,5)	21,5 (20,4-22,7)	<b>0,003</b>	-6,32	<b>-8,43</b>
tCO <sub>2</sub> (mmol/L)	24,9 (23,2-25,7)	22,5 (21,3-23,7)	<b>0,003</b>	-6,82	<b>-9,63</b>
pO <sub>2</sub> (kPa)	11,22 (9,65-12,10)	11,44 (9,88-12,19)	0,898	-	-
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	96,7 (95,1-97,4)	96,8 (95,0-97,3)	0,927	-	-
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	1,24 (1,22-1,27)	0,77 (0,62-0,89)	<b>&lt;0,001</b>	-1,61	<b>-37,90</b>
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	142,7 (140,9-144,6)	146,8 (145,5-150,1)	<b>&lt;0,001</b>	1,33	<b>2,87</b>
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4,39 (4,11-4,59)	3,59 (3,47-4,03)	<b>&lt;0,001</b>	-6,37	<b>-18,22</b>
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	107 (106-108)	109 (107-111)	<b>0,001</b>	0,93	<b>1,86</b>
Glukoza (mmol/L)	5,5 (5,1-6,0)	5,1 (4,6-5,4)	<b>&lt;0,001</b>	-7,27	<b>-7,27</b>

Dodavanje tekućeg heparina u kapilaru statistički značajno mijenja sljedeće rezultate pretraga za ABS neposredno nakon uzorkovanja: pCO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tCO<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i glukoza.

Klinički značajne su promjene: pCO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tCO<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i glukoza.

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom.

Wilcoxonov test je korišten za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina.

Razina značajnosti je 0,05.

#### **4.2. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru neposredno nakon uzorkovanja?**

Tablica 3. Prikaz broja zgrušanih i nezgrušanih uzoraka sa i bez heparina nakon 0 minuta

	Kapilara (0 minuta) N=22	Kapilara + heparin (0 minuta) N=22	P
Broj zgrušanih	1	1	0,489
Broj nezgrušanih	21	21	

Nema statistički značajne razlike u učestalosti pojave zgrušanih uzoraka u kapilari bez heparina i kapilari s dodanim heparinom neposredno nakon uzorkovanja.

Korišten je test usporedbe proporcija.

### 4.3. Mijenja li dodavanje tekućeg heparina u kapilaru rezultate pretraga acidobazne ravnoteže 25 minuta nakon uzorkovanja?

Tablica 4. Prikaz rezultata uzoraka sa i bez heparina nakon 25 minuta

	Kapilara (25 minuta) N=22	Kapilara + heparin (25 minuta) N=22	P	Dopušteno odstupanje (%)	Izračunato odstupanje (%)
pH (pH jedinice)	7,432 (7,420-7,452)	7,437 (7,426-7,469)	0,145	-	-
pCO <sub>2</sub> (kPa)	4,6 (4,5-5,1)	4,1 (3,9-4,7)	<b>0,0003</b>	-2,13	<b>-10,86</b>
BE	-0,1 (-1,7-1,1)	-2,1 (-3,2-(-0,9))	<b>0,0007</b>	-55,17	<b>-70,96</b>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	23,8 (22,2-24,9)	21,2 (19,6-22,0)	<b>0,0002</b>	-6,72	<b>-10,92</b>
tCO <sub>2</sub> (mmol/L)	24,9 (23,3-26,0)	22,1 (20,5-23,1)	<b>0,0002</b>	-6,42	<b>-11,24</b>
pO <sub>2</sub> (kPa)	10,58 (9,97-11,10)	11,49 (10,59-12,21)	<b>0,004</b>	4,91	<b>8,60</b>
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	96,1 (95,4-96,8)	97,1 (96,1-97,6)	<b>0,005</b>	0,72	<b>1,04</b>
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	1,24 (1,19-1,27)	0,63 (0,58-0,71)	<b>0,001</b>	-4,03	<b>-49,19</b>
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	143,7 (141,3-145,8)	149,3 (146,9-150,8)	<b>0,006</b>	1,46	<b>3,89</b>
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4,20 (3,88-4,33)	3,51 (3,23-3,89)	<b>0,001</b>	-7,61	<b>-16,42</b>
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	107 (105-108)	109 (108-111)	<b>0,005</b>	0,93	<b>1,86</b>
Glukoza (mmol/L)	5,4 (5,1-5,9)	5,0 (4,4-5,5)	<b>0,001</b>	-5,55	<b>-7,40</b>

Dodavanje tekućeg heparina u kapilaru statistički značajno mijenja rezultate slijedećih pretraga za ABS 25 minuta nakon uzorkovanja: pCO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, saturacija O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i glukoza.

Klinički značajne su promjene: pCO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, saturacija O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i glukoza.

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom.

Wilcoxonov test je korišten za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina.

Razina značajnosti je 0,05.

#### **4.4. Je li veća učestalost zgrušanih uzoraka ako heparin nije dodan u kapilaru 25 minuta nakon uzorkovanja?**

Tablica 5. Prikaz broja zgrušanih i nezgrušanih uzoraka sa i bez heparina nakon 25 minuta

	Kapilara (25 minuta) N=22	Kapilara + heparin (25 minuta) N=22	P
Broj zgrušanih	3 (0,13)	1 (0,05)	0,689
Broj nezgrušanih	19 (0,87)	21 (0,95)	

Nema statistički značajne razlike u učestalosti pojave zgrušanih uzoraka u kapilari bez heparina i kapilari s dodanim heparinom 25 minuta nakon uzorkovanja.

Korišten je test usporedbe proporcija.

**4.5. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina stabilan 25 minuta?**

Tablica 6. Prikaz rezultata uzoraka bez heparina nakon 0 minuta i nakon 25 minuta

	Kapilara (0 minuta) N=22	Kapilara (25 minuta) N=22	P	Dopušteno odstupanje (%)	Izračunato odstupanje (%)
pH (pH jedinice)	7,432 (7,413-7,449)	7,432 (7,420-7,452)	0,832	-	-
pCO <sub>2</sub> (kPa)	4,9 (4,4-5,1)	4,6 (4,5-5,1)	1,000	-	-
BE	-0,1 (-1,3-0,8)	-0,1 (-1,7-1,1)	0,495	-	-
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	23,7 (22,2-24,5)	23,8 (22,2-24,9)	0,963	-	-
tCO <sub>2</sub> (mmol/L)	24,9 (23,2-25,7)	24,9 (23,3-26,0)	0,932	-	-
pO <sub>2</sub> (kPa)	11,22 (9,65-12,10)	10,58 (9,97-11,10)	0,246	-	-
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	96,7 (95,1-97,4)	96,1 (95,4-96,8)	0,442	-	-
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	1,24 (1,22-1,27)	1,24 (1,19-1,27)	0,098	-	-
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	142,7 (140,9-144,6)	143,7 (141,3-145,8)	0,145	-	-
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4,39 (4,11-4,59)	4,20 (3,88-4,33)	0,054	-	-
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	107 (106-108)	107 (105-108)	0,301	-	-
Glukoza (mmol/L)	5,5 (5,1-6,0)	5,4 (5,1-5,9)	<b>0,048</b>	-7,27	-1,8

U uzorku kapilarne krvi bez dodatka tekućeg heparina nije stabilna samo glukoza.

Nestabilnost nije klinički značajna.

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom.

Wilcoxonov test je korišten za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina.

Razina značajnosti je 0,05.

#### **4.6. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru bez dodatka tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?**

Tablica 7. Prikaz broja zgrušanih i nezgrušanih uzoraka bez heparina nakon 0 minuta i nakon 25 minuta

	Kapilara (0 minuta) N=22	Kapilara (25 minuta) N=22	P
Broj zgrušanih	1 (0,05)	3 (0,13)	0,689
Broj nezgrušanih	21 (0,95)	19 (0,87)	

Nema statistički značajne razlike u učestalosti pojave zgrušanih uzoraka u kapilari bez heparina neposredno nakon uzorkovanja i 25 minuta nakon uzorkovanja.

Korišten je test usporedbe proporcija.

**4.7. Je li uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina stabilan 25 minuta?**

Tablica 8. Prikaz rezultata uzoraka sa heparinom nakon 0 minuta i nakon 25 minuta

	Kapilara + heparin (0 minuta) N=22	Kapilara + heparin (25 minuta) N=22	P	Dopušteno odstupanje (%)	Izračunato odstupanje (%)
pH (pH jedinice)	7,440 (7,417-7,463)	7,437 (7,426-7,469)	<b>&lt;0,0001</b>	-0,3	-0,04
pCO <sub>2</sub> (kPa)	4,4 (3,8-4,8)	4,1 (3,9-4,7)	0,374	-	-
BE	-1,9 (-2,7-(-0,6))	-2,1 (-3,2-(-0,9))	0,766	-	-
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	21,5 (20,4-22,7)	21,2 (19,6-22,0)	0,515	-	-
tCO <sub>2</sub> (mmol/L)	22,5 (21,3-23,7)	22,1 (20,5-23,1)	0,465	-	-
pO <sub>2</sub> (kPa)	11,44 (9,88-12,19)	11,49 (10,59-12,21)	0,922	-	-
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	96,8 (95,0-97,3)	97,1 (96,1-97,6)	0,709	-	-
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	0,77 (0,62-0,89)	0,63 (0,58-0,71)	0,134	-	-
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	146,8 (145,5-150,1)	149,3 (146,9-150,8)	<b>0,039</b>	2,24	1,70
K <sup>+</sup> (mmol/L)	3,59 (3,47-4,03)	3,51 (3,23-3,89)	0,798	-	-
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	109 (107-111)	109 (108-111)	0,702	-	-
Glukoza (mmol/L)	5,1 (4,6-5,4)	5,0 (4,4-5,5)	0,891	-	-

U uzorku kapilarne krvi uz dodatak tekućeg heparina nakon 25 minuta nisu stabilni pH i Na<sup>+</sup>. Nestabilnost nije klinički značajna.



Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom.

Wilcoxonov test je korišten za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina.

Razina značajnosti je 0,05.

#### **4.8. Hoće li se uzorak kapilarne krvi izvađen u kapilaru uz dodatak tekućeg heparina zgrušati nakon 25 minuta?**

Tablica 9. Prikaz broja zgrušanih i nezgrušanih uzoraka sa heparinom nakon 0 minuta i nakon 25 minuta

	Kapilara + heparin (0 minuta) N=22	Kapilara + heparin (25 minuta) N=22	P
Broj zgrušanih	1 (0,05)	1 (0,05)	0,489
Broj nezgrušanih	21 (0,95)	21 (0,95)	

Nema statistički značajne razlike u učestalosti pojave zgrušanih uzoraka u kapilari s dodanim heparinom neposredno nakon uzorkovanja i 25 minuta nakon uzorkovanja.

Korišten je test usporedbe proporcija.

## 5. ZAKLJUČAK

U kliničkoj praksi je glavni problem održati kvalitetu uzorka od trenutka uzorkovanja, preko transporta do analize. Kako bi sačuvali kvalitetu uzorka, zdravstveni djelatnici posežu za rješenjima koja mogu promijeniti rezultate pretraga.

Svrha ovog istraživanja je bila dokazati utječe li dodatak tekućeg heparina na rezultate pretraga acidobazne ravnoteže, je li uzorak stabilan 25 minuta od uzorkovanja do analize te ima li potrebe za dodavanjem tekućeg heparina u kapilaru.

Rezultati su pokazali kako dodatak heparina mijenja rezultate pretraga acidobazne ravnoteže. Također pokazali su kako uzorak ostaje stabilan i da se krv neće zgrušati 25 minuta od uzorkovanja do analize, što ukazuje na to da nema potrebe za dodavanjem tekućeg heparina u kapilaru te da je liofilizirani heparin kojim su obložene kapilare dovoljan kako bi se sačuvala kvaliteta uzorka.

## 6. LITERATURA

1. Baird G. Preanalytical considerations in blood gas analysis. *Biochem Med*, 2013, 23, 19–27.
2. Arterijska štrcaljka za acidobaznu ravnotežu, <https://www.radiometer.com/en/products/samplers/safepico-syringe>, pristupljeno 18.09.2021.
3. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 65-81, 83-97, 118-121.
4. Dukić L, Milevoj Kopčinović L, Dorotić A, Baršić I. Blood gas testing and related measurements. *Biochem Med*, 2016, 26, 318-36.
5. Potencijometrija, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:479770>, pristupljeno 01.09.2021.
6. Heparin, <https://hr.the-health-site.com/heparin-421>, pristupljeno 02.09.2021.
7. Heparin, <https://hr.healthandmedicineinfo.com/heparin-LJW>, pristupljeno 02.09.2021.
8. Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001, str. 212-223.
9. Leniček Krleža J, Dorotić A, Grzunov A, Maradin M. Capillary blood sampling. *Biochem Med*, 2015, 25, 335-58.
10. Miler M, Božović M. Radna uputa za RapidPoint 400/405, RU-5.3-032-4/7. Zagreb, 2017.
11. Vodič za praktičnu primjenu novih oralnih antikoagulansa, <http://www.kardio.hr/wp-content/uploads/2015/12/Vodic-za-oralne-antikoag.pdf>, pristupljeno 30.08.2021.
12. MiniCollect® Safety Lancet, <https://shop.gbo.com/en/row/products/preanalytics/safety-products/safety-products-capillary-blood-collection/safety-lancets/450429.html>, pristupljeno 02.09.2021.
13. Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. National recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med*, 2013, 23, 242-54.
14. Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Mediaprint, 2010, str. 221-289, 447-464.

15. RapidPoint 500, <https://pep.siemens-info.com/en-us/rapidpoint-500e-blood-gas-system-replacing-the-sample-port>, pristupljeno 02.09.2021.
16. RapidPoint 400/405, <https://www.selectscience.net/products/rapidpoint-400+405-blood-gas-systems/?prodID=173110>, pristupljeno 18.09.2021.
17. Sertić J. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str 235-244.
18. Smjernice za korištenje niskomolekularnog heparina u trudnoći, 2019, <https://repositorij.mef.unizg.hr/islandora/object/mef%3A2318/datastream/PDF/view>, pristupljeno 16.09.2021.
19. Wilcoxon Test, <https://www.investopedia.com/terms/w/wilcoxon-test.asp>, pristupljeno 01.09.2021.

## 7. SAŽETAK

Pretrage acidobazne ravnoteže su laboratorijske pretrage koje uključuju određivanja plinova u krvi, pH, elektrolita i metabolita. Jedne su od najčešćih pretraga na hitnim prijemima i u jedinicama intenzivne njege. Za točnu procjenu acidobazne ravnoteže se koristi arterijska krv, no nekad to nije moguće pa se umjesto arterijske krvi uzorkuje kapilarna krv. Uzorkovanje kapilarne krvi je brže, jednostavnije i manje invazivno za pacijenta, no u kliničkoj se praksi zdravstveni djelatnici odgovorni za uzorkovanje suočavaju sa problemom kako održati kvalitetu uzorka.

Jedno od rješenja je dodavanje tekućeg heparina u kapilare neposredno prije uzorkovanja kako se uzorak ne bi zgrušao dok se ne analizira, iako on može imati dilucijski učinak i promijeniti rezultate pretraga acidobazne ravnoteže.

U ovom je diplomskom radu prikazano kako dodatak tekućeg heparina u kapilaru prije uzorkovanja mijenja rezultate pretraga acidobazne ravnoteže. Također je prikazano kako se uzorak bez dodatka tekućeg heparina neće zgrušati ako između uzorkovanja i analize prođe 25 minuta.

## **SUMMARY**

Blood gas tests are laboratory tests that include measuring gases in blood, pH, electrolytes and metabolites. They are one of the most common tests that are used in emergency rooms or intensive care units. Arterial blood is used for accurate estimation of gas blood testing, but in some cases that is not possible, so capillary blood can be used instead. Blood sampling of capillary blood is faster, more simple and less invasive for the patient. In clinical practice, some of the healthcare professionals responsible for blood sampling are dealing with the problem of how to maintain the quality of the sample.

One way to maintain the quality of the sample is to add liquid heparin into capillary just before blood sampling to avoid forming clots, although it can dilute the sample and change the results of blood gas tests.

This diploma thesis shows how the addition of liquid heparin into capillary just before blood sampling changes the results of blood gas testing, and that clots will not form after 25 minutes in the capillary if liquid heparin is not added.

## 8. POPIS KRATICA

ABS – acidobazni status

Ag/AgCl – referentna srebrov-klorid elektroda

BE (engl. base excess) – višak baza

DNA (engl. Deoxyribonucleic acid) - deoksiribonukleinska kiselina

GOD (engl. glucose oxidase) – glukoza oksidaza

GOD<sub>oks</sub> – (engl. glucose oxidase oxidized) - glukoza oksidaza u oksidiranom obliku

GOD<sub>red</sub> – (engl. glucose oxidase reduced) – glukoza oksidaza u reduciranom obliku

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - standardni bikarbonati

HDMBLM – Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

ID (engl. identity document) – identifikacijski dokument

LIS – laboratorijski informacijski sustav

N – broj uzoraka

NMH – niskomolekularni heparin

P – razina značajnosti

pCO<sub>2</sub> (engl. partial) - parcijalni tlak ugljikova dioksida u krvi

pH (lat. potentia hydrogenii) - negativni logaritam koncentracije vodikovih iona

pO<sub>2</sub> (engl. partial) - parcijalni tlak kisika

Sample port (engl.) - ležište u koje se stavlja štrcaljka/kapilara

sO<sub>2</sub> (engl. saturation) – zasićenje hemoglobina kisikom

tCO<sub>2</sub> (engl. total) - ukupni ugljični dioksid

UFH (engl. unfractionated heparin) – nefrakcionirani heparin

UPS (engl. Uninterruptible Power Supply) – uređaj za neprekidno napajanje

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za Medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ HEPARINA NA REZULTATE ACIDOBAZNE RAVNOTEŽE

Lana Mosurović

#### SAŽETAK

Pretrage acidobazne ravnoteže su laboratorijske pretrage koje uključuju određivanja plinova u krvi, pH, elektrolita i metabolita. Jedne su od najčešćih pretraga na hitnim prijemima i u jedinicama intenzivne njege. Za točnu procjenu acidobazne ravnoteže se koristi arterijska krv, no nekad to nije moguće pa se umjesto arterijske krvi uzorkuje kapilarna krv. Uzorkovanje kapilarne krvi je brže, jednostavnije i manje invazivno za pacijenta, no u kliničkoj se praksi zdravstveni djelatnici odgovorni za uzorkovanje suočavaju sa problemom kako održati kvalitetu uzorka.

Jedno od rješenja je dodavanje tekućeg heparina u kapilare neposredno prije uzorkovanja kako se uzorak ne bi zgrušao dok se ne analizira, iako on može imati dilucijski učinak i promijeniti rezultate pretraga acidobazne ravnoteže.

U ovom je diplomskom radu prikazano kako dodatak tekućeg heparina u kapilaru prije uzorkovanja mijenja rezultate pretraga acidobazne ravnoteže. Također je prikazano kako se uzorak bez dodatka tekućeg heparina neće zgrušati ako između uzorkovanja i analize prođe 25 minuta.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 5 grafičkih prikaza, 9 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Acidobazna ravnoteža, heparin, kapilarna krv

Mentor: **Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj**, *Voditeljica odjela za medicinsku biokemiju sa analitičkom toksikologijom, Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj**, *Voditeljica odjela za medicinsku biokemiju sa analitičkom toksikologijom, Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice*  
**Dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Rujan, 2021.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical biochemistry and hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE EFFECT OF HEPARIN ON BLOOD GAS TESTING

**Lana Mosurović**

#### SUMMARY

Blood gas tests are laboratory tests that include measuring gases in blood, pH, electrolytes and metabolites. They are one of the most common tests that are used in emergency rooms or intensive care units. Arterial blood is used for accurate estimation of gas blood testing, but in some cases that is not possible, so capillary blood can be used instead. Blood sampling of capillary blood is faster, more simple and less invasive for the patient. In clinical practice, some of the healthcare professionals responsible for blood sampling are dealing with the problem of how to maintain the quality of the sample.

One way to maintain the quality of the sample is to add liquid heparin into capillary just before blood sampling to avoid forming clots, although it can dilute the sample and change the results of blood gas tests.

This diploma thesis shows how the addition of liquid heparin into capillary just before blood sampling changes the results of blood gas testing, and that clots will not form after 25 minutes in the capillary if liquid heparin is not added.

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

Thesis includes: 34 pages, 5 figures, 9 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Blood gas testing, heparin, capillary blood

Mentor: **Nora Nikolac Gabaj, Ph.D.** *Head of the Department for Medical Biochemistry and Analytical Toxicology, University Department of Chemistry, Medical School University Hospital Sestre Milosrdnice*

Reviewers: **Nora Nikolac Gabaj, Ph.D.** *Head of the Department for Medical Biochemistry and Analytical Toxicology, University Department of Chemistry, Medical School University Hospital Sestre Milosrdnice*  
**Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Suzana Inić, Ph.D.** *Docent, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September, 2021.

