

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA NOVAK

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA NOVAK

**KORELACIJA REZULTATOV BILIRUBINA IN ŽOLČNIH KISLIN PRI
INTRAHEPATIČNI HOLESTAZI V NOSEČNOSTI**

**CORRELATION OF RESULTS OF BILIRUBIN AND BILE ACIDS IN
INTRAHEPATIC CHOLESTASIS IN PREGNANCY**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravila pod okriljem mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Meritve so bile opravljene na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za pomoč, nasvete in usmeritve pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem svojim domačim, ki so mi stali ob strani in me spodbujali v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, 2012

Lucija Novak

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar

VSEBINA

| | |
|--|----|
| VSEBINA..... | I |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA JETER | 1 |
| 1.2 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA ŽOLČNIKA | 2 |
| 1.3 VLOGA JETER..... | 3 |
| 1.3.1 Nastanek bilirubina..... | 4 |
| 1.3.2 Zlatenica | 5 |
| 1.3.2.1 Presnova bilirubina pri obstrukciji zlatenici oz. IHCP..... | 5 |
| 1.3.3 Laboratorijske vrednosti bilirubina | 6 |
| 1.4 NASTANEK ŽOLČNIH KISLIN | 6 |
| 1.4.1 Vloga in laboratorijska vrednost žolčnih kislin..... | 8 |
| 1.5 BOLEZNI JETER V NOSEČNOSTI, KI SE KAŽEJO S PATOLOŠKIMI IZVIDI JETRNIH TESTOV | 9 |
| 1.5.1 Intrahepatična holestaza v nosečnosti/nosečnostna holestaza | 10 |
| 1.5.1.1 Splošno | 10 |
| 1.5.1.2 Pojavnost intrahepatične holestaze v nosečnosti po svetu | 10 |
| 1.5.1.3 Etiologija | 11 |
| 1.5.1.4 Klinični znaki in diagnostika..... | 12 |
| 1.5.1.5 Izključitev ostalih bolezni | 13 |
| 1.5.1.6 Možnosti zdravljenja..... | 13 |
| 2 NAMEN DELA..... | 15 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 16 |
| 3.1 OPIS BOLNIC | 16 |
| 3.2 ODVZEM IN ANALIZA VZORCEV..... | 16 |
| 3.2.1 Metoda za določanje celokupnega bilirubina | 17 |
| 3.2.2 Metoda za določanje direktnega bilirubina | 18 |
| 3.2.3 Metoda za določanje žolčnih kislin | 18 |
| 3.2.4 Statistična obdelava podatkov | 19 |
| 3.2.4.1 Statistični podatki skupine z potrjeno diagnozo IHCP..... | 20 |
| 3.2.4.2 Statistični podatki skupine z nepotrjeno diagnozo IHCP..... | 21 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4 | REZULTATI..... | 28 |
| 4.1 | KLINIČNA SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST..... | 32 |
| 4.1.1 | Diagnostična ali klinična občutljivost..... | 32 |
| 4.1.2 | Diagnostična ali klinična specifičnost..... | 34 |
| 4.1.3 | Diagnostično razmerje obetov (DOR)..... | 36 |
| 4.2 | KORELACIJA REZULTATOV..... | 36 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 39 |
| 6 | SKLEP..... | 42 |
| 7 | LITERATURA..... | 43 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Jetrni režnjič | 1 |
| Slika 2: Obtok žolčnih kislin | 8 |
| Slika 3: Histogram podatkov za celokupni bilirubin za skupino s nepotrjeno diagnozo ICHP | 22 |
| Slika 4: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za celokupni bilirubin za skupino s nepotrjeno diagnozo ICHP | 22 |
| Slika 5: Histogram podatkov za direktni bilirubin za skupino s nepotrjeno diagnozo ICHP | 23 |
| Slika 6: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za direktni bilirubin za skupino s nepotrjeno diagnozo ICHP | 23 |
| Slika 7: Histogram podatkov za žolčne kisline za skupino s nepotrjeno diagnozo | 24 |
| Slika 8: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za žolčne kisline za skupino s nepotrjeno diagnozo ICHP | 24 |
| Slika 9: Razmerje med koncentracijo celokupnega bilirubina pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP | 31 |
| Slika 10: Razmerje med koncentracijo direktnega bilirubina pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP | 31 |
| Slika 11: Razmerje med koncentracijo žolčnih kislin pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP | 32 |
| Slika 12: Klinična občutljivost celokupnega bilirubina | 33 |
| Slika 13: Klinična občutljivost direktnega bilirubina..... | 33 |
| Slika 14: Klinična občutljivost žolčnih kislin | 34 |
| Slika 15: Klinična specifičnost celokupnega bilirubina | 35 |
| Slika 16: Klinična specifičnost direktnega bilirubina..... | 35 |
| Slika 17: Klinična specifičnost žolčnih kislin | 36 |
| Slika 18: Korelacija med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami..... | 37 |
| Slika 19: Korelacija med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami..... | 38 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Tabela I: Prikaz vrednosti žolčnih barvil pri posameznih vrstah zlatenice | 5 |
| Tabela II: Delitev žolčnih kislin | 7 |
| Tabela III: Pojavnost ICHP po državah..... | 11 |
| Tabela IV: Referenčne vrednosti za določanje celokupnega bilirubina | 17 |
| Tabela V: Statistični podatki skupine s potrjeno IHCP | 20 |
| Tabela VI: Statistični podatki za drugo (kontrolno) skupino | 21 |
| Tabela VII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za drugo (kontrolno) skupino po logaritmiranju (pretvorbi)..... | 25 |
| Tabela VIII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za skupino s potrjeno diagnozo ICHP po logaritmiranju (pretvorbi)..... | 26 |
| Tabela IX: T-test logaritmskih vrednosti..... | 26 |
| Tabela X: Rezultati, pridobljeni pri skupini žensk, ki so imele potrjeno diagnozo IHCP .. | 28 |
| Tabela XI: Rezultati, pridobljeni pri skupini žensk, ki niso imele potrjene diagnoze IHCP | 28 |
| Tabela XII: Razpredelnica za izračun občutljivosti ali specifičnosti | 34 |
| Tabela XIII: Korelacija rezultatov med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami | 37 |
| Tabela XIV: Korelacija rezultatov med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami | 38 |

POVZETEK

Intrahepatična holestaza v nosečnosti je specifična bolezen jeter, ki se kaže s srbečico v tretjem tromesečju, povišano koncentracijo žolčnih kislin in povečano možnostjo za okvaro ploda.

V naši diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kakšna je korelacija med rezultati celokupnega bilirubina ter žolčnih kislin in direktnega bilirubina ter žolčnih kislin v primeru, da ima ženska potrjeno diagnozo intrahepatične holestaze v nosečnosti. Analizirali smo vzorce 76 nosečih žensk z Ginekološke klinike v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana in jih razdelili v dve skupini: prva skupina, v kateri je bilo 9 žensk s potrjeno diagnozo intrahepatične holestaze, in druga skupina, ki je bila kontrolna s 67 ženskami z nepotrjeno diagnozo intrahepatične holestaze. S pomočjo Pearsonovega koeficienta smo izračunali korelacijo med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami, ki je bila 0,494, in korelacijo med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami, ki je bila 0,558. Izvedli smo tudi izračune za primerjavo obeh skupin s pomočjo t-testa, občutljivost in specifičnost.

Povzamemo lahko, da je korelacija v obeh primerih srednje visoka, kar pomeni, da lahko na podlagi pridobljene ene spremenljivke (celokupni oziroma direktni bilirubin) relativno solidno napovemo vrednost druge (vrednost žolčnih kislin).

ABSTRACT

Intrahepatic cholestasis of pregnancy is a specific liver disorder, manifested by itching in the third trimester, an increased concentration of bile acids and increased possibility of fetal damage.

In our research we wanted to determine what is the correlation between the results of total bilirubin and bile acid and direct bilirubin and bile acids.

We analyzed blood samples of 76 women of gynecological clinic Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, which are divided into two groups. In the first group was 9 women with a confirmed diagnosis of intrahepatic cholestasis and in the second group, which was the control, 67 women with unconfirmed diagnosis of intrahepatic cholestasis. By using Pearson correlation coefficients we calculated correlation between direct bilirubin and bile acids, which was 0,494. The correlation between direct bilirubin and bile acid was 0,558. We also calculated t-test, clinical sensitivity and clinical specificity for comparison both of groups.

We can conclude that the correlation in both cases is medium-high, which means that first variable (total or direct bilirubin) can be predicted a relatively decent for other value (bile acid).

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|----------------|---|
| 3 α HSD | 3 α hidroksisteroid dehidrogenaze |
| AFLP | Akutna steatoza v nosečnosti |
| ALT | Alanin aminotransferaza |
| AST | Aspartat aminotransferaza |
| ATP | Adenozin tri-fosfat |
| BIL | Bilirubin |
| BSEP | Sekretorni prenašalec žolčnih kislin - Bile Salt Export Pump |
| EDTA | Etilen-diaminotetraocetna kislina |
| IHCP | Intrahepatična holestaza v nosečnosti-Intrahepatic cholestasis of pregnancy |
| MDR3 | Protein rezistenten na več učinkovin - 3-MultiDrug Resistance Protein |

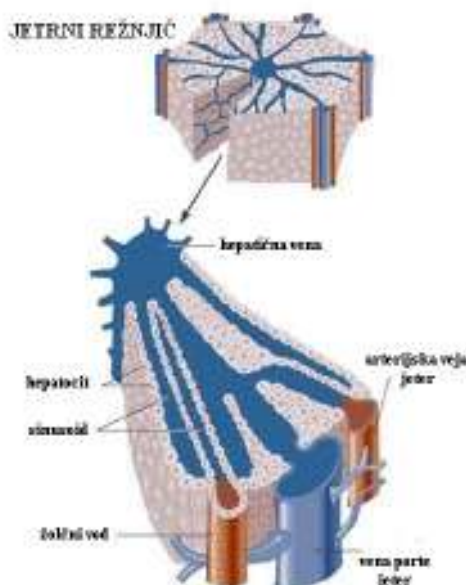
1 UVOD

1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA JETER

Jetra so največja žleza in poleg kože tudi največji organ v telesu. Ležijo v zgornjem desnem kvadrantu trebušne votline in pri odraslem človeku tehtajo približno 1500 gramov. So rdeče-rjave barve, kar kaže na dobro dvojno oskrbo s krvjo.

Portalna vena dovaja v jetra vensko kri iz želodca, črevesja in vranice. S tem dobijo jetra tudi do 75 % kisika. Drugi dovod krvi do jeter pa predstavlja hepatična arterija, ki priskrbi preostalih 25 % kisika. Portalna vena in hepatična arterija vstopata v jetra skozi jetrno lino (porto hepatis). Tam se razdelita v dve veji za levi in desni reženj. Žilam se pridružita tudi levi in desni hepatični žolčni vod, kar imenujemo skupni hepatični (jetrni) vod.

Osnovna strukturna enota je **jetrni režnjič** oz. acinus (Slika 1). To je del jetrnega parenhima, ki obdaja centralno veno in ima obliko šesterokotnika. Na obrobju režnjiča ležijo tako imenovana portalna polja oz. portalne triade, ki jih sestavljajo portalna vena, hepatična arterija in žolčni vod. Osnovni gradniki v jetrnem režnjiču so jetrne celice (**hepatocite**), ki so žarkasto razporejene v gredice, navzven od portalne vene. Med gredicami so sinusoidi oz. jetrne kapilare. (1)



Slika 1: Jetrni režnjič

Običajno delimo acinus v tri funkcionalne cone. Cono ena sestavljajo celice okoli portalne triade, cono tri sestavljajo parenhimske celice, cono dve pa sestavljajo hepatocite med

obema conama. Celice v coni 1 so prve preskrbljene s krvjo, bogato s kisikom in hranljivimi snovmi, zato so bolj odporne proti strupom kot celice iz cone 2 in 3, ki so bolj oddaljene od aferentnih žil. Celice iz cone 2 in 3 prve podležejo nekrozi in se regenerirajo počasneje.

Parenhimske celice imajo tri funkcijsko različne površine, po katerih se imenujejo:

- **Sinusoidna površina** je v direktnem stiku s krvjo in je pomembna za prevzem snovi iz krvi in izločanje krvnih sestavin, ki jih tvorijo jetra.
- **Kanalikularna površina** dveh sosednjih hepatocitov omejuje žolčni kanikul in je pomembna pri izločanju žolča.
- **Lateralna površina** pa tvori tesen medsebojni stik med hepatociti.

Steno sinusoida sestavlja mreža endotelijskih in Kupfferjevih celic. Med njimi in hepatocitom leži Dissejev prostor, v katerem so še Itojeve celice. Le te tvorijo majhen del jetrnega parenhima, vendar pa so ključnega pomena za shranjevanje vitamina A ter za proces fibroze.

Izločevalni oziroma ekskrecijski del jeter se začneja z žolčnimi kanalikuli. Vanj hepatociti izločajo žolč, ki teče v žolčne duktule in se zbira v večje interlobularne žolčne vode, ki so v portalnih poljih. Žolč zapuša jetra v sistemu žolčnih izvodil, ki po velikosti narašča in se v porti hepatis združi v ekstrahepatalna žolčna izvodila. (1, 2)

1.2 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA ŽOLČNIKA

Žolčnik je votli organ, hruškaste oblike, ki leži v jamici desnega jetrnega režnja. Pri odraslem človeku meri 10 cm v dolžino in od 2 do 4 cm v širino in ima prostornino od 40 do 70 ml. Slep konec (fundus) se nadaljuje v osrednje žolčnikovo telo, le-ta pa v žolčnikov – cistični vod. Žolčnikov cistični vod se pridruži skupnemu hepaticnemu vodu.

Notranjo površino žolčnika prekriva sluznica z globokimi gubami, ki se lahko širijo in ožijo pri vnetju. Žolčnik ima tudi sloj gladkih mišic, ki je prepleten s prožnimi vlakni, krvnimi žilami, živci in gangliji. Z jeter prehaja na žolčnik peritonej, ki predstavlja zunanjo površino žolčnika.

Glavna naloga žolčnika in sistema žolčnih izvodil je shranjevanje, koncentriranje in sproščanje žolča v dvanajstnik preko Oddijeve zapiralke, ki leži nekaj centimetrov pod želodcem.

Normalen žolč je vodna raztopina soli **žolčnih kislin** (67 %), fosfolipidov (15–20 %), **holesterola** (4 %), **bilirubina** (0,3 %), in beljakovin (4,5 %). Najpomembnejša sestavina

so žolčne soli, ki so po svoji kemijski zgradbi detergenti. Žolčne soli in fosfolipidi so v vodi topni, medtem ko holesterol v vodi ni topen. Velikokrat se zgodi, da se poruši topilna sposobnost žolča zaradi prenasičenosti s holesterolom oziroma na drugi strani zaradi zmanjšane koncentracije žolčnih soli ali fosfolipidov. V teh primerih je izpolnjen pogoj za nastanek žolčnih kamnov.

Iz jeter se s stalno hitrostjo izlije od 800 do 1000 ml jetrnega žolča. 20 % ga nespremenjenega odteče v dvanajstnik, 80 % pa ga vstopi v žolčnik. Epitelijske celice ga z aktivnim transportom natrijevih ionov vzpostavijo osmozni gradient, ki omogoči da se voda premakne skozi bazalno membrano v kapilare. Tako epiteljske celice odstranijo 90 % vode iz jetrnega žolča in ga s tem koncentrirajo.

Polnjenje žolčnika in praznjenje preko Oddijeve zapiralke usklajujejo hormoni in živčevje. Naloga peptidnega hormona **holecistokinina**, ki se sprosti iz dvanajstnikovih celic po vstopu želodčne kisline, maščob in aminokislilin iz hrane, je da skrči in izprazni žolčnik. Holecistokinin se veže na receptorje na gladkih mišicah v žolčnikovi steni pa tudi na receptorje na postganglijskem vagusnem nitju, pri čemer so potrebni kalcijevi in magnezijevi ioni. Naslednji hormoni, ki vplivajo na polnjenje žolčnika, so **peptidni hormoni**, in sicer: vazoaktivni interstinalni polipeptid, motilin in pankreatični polipeptid. Vsi trije tudi zavirajo sproščanje holecistokinina, tako da se žolčnik lahko napolni. Ritmično praznjenje in polnjenje žolčnika nadzira motilin in s tem omogoča, da je žolčnik nenehno v gibanju. S tem prepreči sesedanje holesterolovih kristalov in tvorbo žolčnih kamnov. (1)

1.3 VLOGA JETER

Jetra imajo osrednjo vlogo v različnih presnovnih procesih, kot so presnova ogljikovih hidratov, maščob in aminokislilin, presnova hormonov in zdravil. Imajo tudi izločevalno funkcijo, saj s pomočjo žolča omogočajo prebavo in absorbcijo maščob, izločanje žolčnih kislin, odvečnega holesterola, bilirubina in ostalih komponent, ki jih vsebuje žolč. Jetra so velika shramba vitaminov, topnih v maščobah, ter železa v obliki feritina.

Poleg vseh zgoraj naštetih življenjsko pomembnih funkcij, v katere so vpletena jetra, je zelo pomembna tudi pretvorba bilirubina v topno obliko. (5)

1.3.1 Nastanek bilirubina

Glavna sestavina eritrocitov je hemoglobin, kar predstavlja kar 98 % vseh beljakovin v citoplazmi. (1) Življenjska doba eritrocitov je od 100 do 120 dni, zato jih vsak dan veliko razpade. Ostarele eritrocite fagocitirajo makrofagi. Pri tem se sprosti hemoglobin, ki se v makrofagu razgradi na globin in hem. Hem je sestavljen iz protoporfirinskega obroča, v katerem je vezan atom dvovalentnega železa. Pri razpadu se v nizu reakcij obroč razpre in nastane zeleni biliverdin, sprosti pa se tudi železo, ki se skladišči v obliki feritina. Zaradi svoje zgradbe je biliverdin zelo neobstojna molekula in se s pomočjo biliverdin-reduktaze hitro reducira v rumenkasto oranžni **bilirubin** (BIL). (3)

Dnevno nastane približno od 250 do 400 mg bilirubina. Približno 80 % hemoglobina nastane iz ostarelih eritrocitov, preostalih 20 % pa ga nastane v jetrnih celicah iz hemoproteinov (citokromi, katalaza, peroksidaza). BIL je topen v maščobah in netopen v vodi pri fiziološkem pH krvi, zato se po krvi prenaša vezan na albumin. Kompleks BIL – albumin je topen v vodi in zaradi svoje velikosti preprečuje BIL prehod skozi celične membrane v tkiva, kjer bi se lahko vezal na celične strukture in deloval toksično. Prevelik je tudi, da bi prehajal skozi membrano v glomerulu in od tu naprej v urin, zato od tu potuje po krvi do jeter. Tam prek membranskega prenašalca vstopi v hepatocit, kjer se s pomočjo encima glukuronil-transferaze, nemudoma konjugira z glukuronsko kislino v vodotopne in nestrupene spojine:

- Bilirubin-diglukuronid (BIL zaestren z dvema molekulama glukuronske kisline);
- Bilirubin-monoglukuronid (BIL zaestren z eno molekulo glukuronske kisline);
- Bilirubin-triglukuronid (BIL zaestren s tremi molekulami glukuronske kisline).

Po končani konjugaciji se bilirubinski kompleks z žolčem izloči v prebavni kanal. Izločanje poteka proti višjemu koncentracijskemu gradientu z aktivnim procesom vezanim na anionski membranski prenašalec. V tankem črevesu se od kompleksa s pomočjo bakterijskega encima glukuronidaze beta odcepi glukuronska kislina in nastane urobilinogen. Večina urobilinogena se izloča z blatom, okoli 20 % se ga reabsorbira nazaj v jetra in ponovno izloči z žolčem, del pa se ga reducira do sterkobilinogena. Od 2 % do 5% urobilinogena pa ostane v krvnem obtoku in prehaja skozi glomerule v urin, zato je urobilinogen normalno prisoten v urinu. Za razliko od urobilinogena se sterkobilinogen nikoli ne reabsorbira, zato se skupaj z urobilinogenom izloča v blato. Spontana oksidacija urobilinogena in sterkobilinogena v debelem črevesu privede do tvorbe urobilina in

sterkobilina. Slednje dve spojini sta oranžnorjave barve in dajeta blatu značilno barvo. (4, 5)

1.3.2 Zlatenica

Zlatenica je definirana kot obarjanje kože in sluznic zaradi kopičenja BIL v plazmi, kar imenujemo hiperbilirubinemija. Zlatenica ni bolezen, temveč je simptom bolezni. Pri človeku jo zaradi velike vezivnosti bilirubina na elastin najhitreje opazimo kot rumeno obarvanost beločnice in kože.

Ker je BIL toksičen, lahko poškoduje možgane, predvsem pri novorojenčkih, ker nimajo še povsem razvite hematoencefalne bariere in lahko bilirubin nemoteno prehaja v likvor.

Glede na vzroke hiperbilirubinemije ločimo tri vrste zlatenic:

1. hemolitična ali prehepatična,
2. hepatocelularna ali hepaticna,
3. obstruktivska ali posthepatična.

Tabela I: Prikaz vrednosti žolčnih barvil pri posameznih vrstah zlatenice

| VRSTA ZLATENIC | SERUM | | BLATO | URIN | |
|------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|------------------|-----------------------|
| | celokupni bilirubin | razmerje med konjugiranim in nekonjugiranim bilirubinom | barva blata | urobilinogen | konjugirani bilirubin |
| hemolitična | blago povišan | znižano | temna | povšan | negativen |
| obstruktivska | močno povišan | zvišano | aholično oz. brez barve | negativen | pozitiven |
| hepatocelularna | sorazmerno s stopnjo poškodbe | zvišano | varira | povišan | pozitiven |

1.3.2.1 Presnova bilirubina pri obstruktivski zlatenici oz. IHCP

Pri obstruktivski zlatenici je zaradi zapore žolčevoda oviran prehod konjugiranega BIL iz žolča v tanko črevo. Zapora je lahko popolna ali delna.

Večji del konjugiranega BIL se začne izločati nazaj v kri. Ker je topen v vodi, se lahko izloča skozi ledvica in mi dokažemo direktni BIL, ki normalno ni prisoten v urinu. Črevesne bakterije v črevesju ne morejo reducirati BIL v urobilinogen oziroma ga reducirajo zelo malo (odvisno, kako velika je zapora). Posledično v urinu ni urobilinogena (oz. ga je zelo malo), ki je drugače normalno prisoten, v blatu pa ni ne sterkobilinogena ne urobilinogena (oz. ga je zelo malo). Blato je zaradi tega blede, brez barve, pravimo mu, da je aholično. (1, 5)

1.3.3 Laboratorijske vrednosti bilirubina

Normalna koncentracija celokupnega BIL v serumu je 5,1–17,1 $\mu\text{mol/l}$, normalna koncentracija direktnega BIL pa je 2–4 $\mu\text{mol/l}$.

Povišana koncentracija BIL v krvi imenujemo hiperbilirubinemija. Dejavniki, ki povzročijo povišanje BIL v krvi:

- povečan razpad eritrocitov,
- okvare jetrnih celic (okvarjen vstop bilirubina v hepatocite),
- prirojeno ali pridobljeno pomanjkanje ali odsotnost konjugacijskega encima,
- okvarjeno izločanje BIL (intrahepatična ali ekstrahepatična holestaza).

Prvi trije dejavniki povzročijo povišanje nekonjugiranega BIL, zato ji pravimo nekonjugirana oziroma indirektna hiperbilirubinemija. Pri zadnjem dejavniku pa gre za sekrecijsko nesposobnost hepatocitov ali za mehansko prepreko za žolčni tok v žolčnih izvodilih (lahko v intrahepatalnih ali ekstrahepatalnih žolčnih vodih). Kot posledica le tega pride do zadrževanje sestavih žolča v jetrih in krvi, posledično tudi dvig konjugiranega BIL. (1, 2, 5)

1.4 NASTANEK ŽOLČNIH KISLIN

Žolčne kisline so sintetizirane iz zaloge holesterola v jetrih, zato je njihova sinteza neposredno povezana z njim. Holesterol v plazmalemi in znotrajceličnih membranah predstavlja zalogo, ki se nenehno polni in prazni. Na eni strani se sintetizira v hepatocitu, po drugi strani pa ga prinesejo plazemski lipoproteini iz hrane ali iz tkiv. Izločanje holesterola poteka z vgrajevanjem v lipoproteine, ki jih hepatociti izločajo v žolč. Od tu se izločajo v žolčno kapilaro in naprej preko žolčnih izvodil v črevo. V žolč se holesterol

izloča v dveh oblikah, in sicer se ga del pretvori v žolčne kisline, del pa se ga izloča nespremenjen. (1, 2, 6)

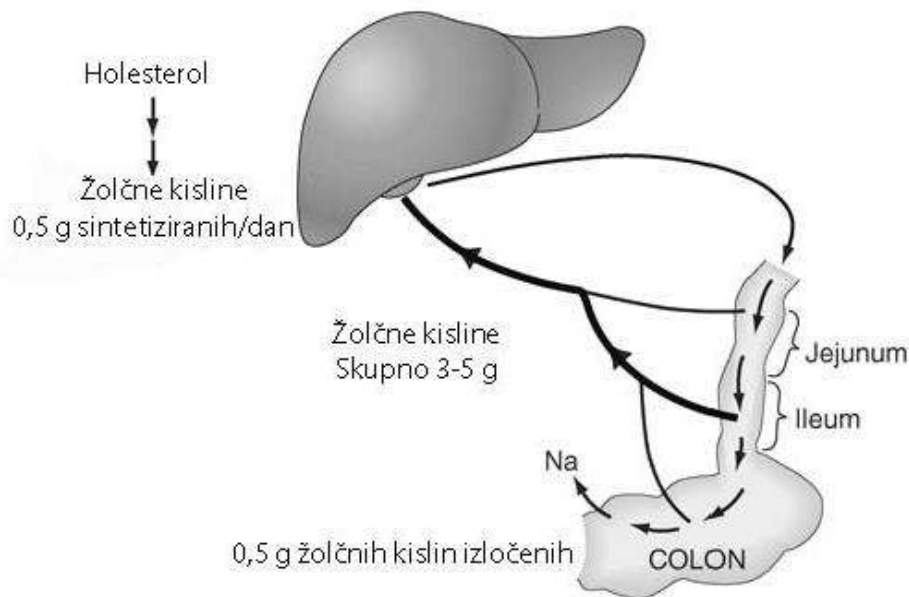
V hepatocitu nastanejo po dehidroksilaciji holesterola in s pomočjo **encimov primarne žolčne kisline** (holna in henodeoksiholna kislina), ki se takoj konjugirata z glicinom in tavrinom. –COOH skupine primarnih žolčnih kislin so v krvi popolnoma ionizirane, zato se dobro vežejo predvsem na natrijeve ione. Tako dobimo **solni žolčnih kislin**, katere so poleg vode glavna sestavina žolča. Ko solni žolčnih kislin potujejo naprej do tankega črevesa, jih bakterije dehidroksilirajo in nastanejo **sekundarne žolčne kisline** (deoksiholna in litholna kislina), majhen del le-teh pa se pretvori tudi v **terciarne žolčne kisline** (ursodeoksiholna kislina). Tudi sekundarne in terciarne kisline se konjugirajo bodisi z aminokislinami bodisi z glicinom ali tavrinom ter se kasneje vežejo na natrij, tako da nastanejo soli. Soli žolčnih kislin se aktivno reabsorbirajo iz črevesa v kri, od koder jih jetra aktivno absorbirajo in ponovno izločijo v žolč. Ta proces imenujemo **enterohepatični obtok soli žolčnih kislin**. Molekule v enterohepatičnem obtoku soli žolčnih kislin zaokrožijo od 5 krat do 10 krat na dan, pri čemer se izgubi od 10 % do 20 % žolčnih kislin, ker se ne absorbirajo in se izločijo z blatom. Ker so žolčne kisline na eni strani polarne na drugi pa nepolarne, se ob prenasičenju v vodni raztopini začnejo združevati v **micele**, s polarno stranjo molekule navzven. (2, 7, 10)

Tabela II: Delitev žolčnih kislin

| Delitev žolčnih kislin | Ime kisline | % konjugirane žolčne kisline pri zdravem človeku |
|----------------------------------|-------------------------|---|
| Primarne žolčne kisline | holna kislina | 36 % - 38 % |
| | henodeoksiholna kislina | 32 % - 34 % |
| Sekundarne žolčne kisline | deoksiholna kislina | 26 % - 28 % |
| | litholna kislina | 1 % - 2 % |
| Terciarne žolčne kisline | ursodeoksiholna kislina | <1 % |

Celotna količina konjugiranih in nekonjugiranih žolčnih kislin, ki je izločena z jetri, je 16–70 g na dan pri odraslem človeku, pri čemer jih 3–5 g kroži z enterohepatičnim obtokom. (8)

Soli žolčnih kislin in ostale sestavine žolča, se prek plazmaleme hepatocita prenesejo v žolčno kapilaro prek specifičnih beljakovinskih prenašalcev (**ABC prenašalci, prenašalec z ATP vezavno kaseto – ATP Binding Casset**). To so prenašalci, ki dobijo energijo s hidrolizo adenozin-tri-fosfata (ATP). Gre za **aktivni prenos**, katerega moč je uravnana prek sprememb genskega izražanja prenašalcev. Pri človeku so odkrili veliko vrst mutacij v genu za ABC transporterje in so tudi eden izmed vzrokov za pojav intrahepatične holestaze v nosečnosti. (9)



Slika 2: Obtok žolčnih kislin

1.4.1 Vloga in laboratorijska vrednost žolčnih kislin

Žolčne kisline so po kemijski sestavi detergenti in zato igrajo pomembno vlogo pri presnovi in absorpciji maščob. S pomočjo žolčnih kislin in alkalnega pankreatičnega soka se lipidi razpršijo v manjše kapljice. S tem se poveča površina maščob in pankreatična lipaza hitreje hidrolitično deluje. (1, 11)

Referenčna vrednost: Snovna koncentracija žolčnih kislin pri zdravem človeku je do 10 $\mu\text{mol/l}$. (1)

1.5 BOLEZNI JETER V NOSEČNOSTI, KI SE KAŽEJO S PATOLOŠKIMI IZVIDI JETRNIH TESTOV

Bolezni jeter v nosečnosti so v nekaterih primerih za zdravnike prave uganke, saj so nekatere posredno povezane z nosečnostjo, medtem ko so druge neposredno. Zlatenica je sorazmerno pogost klinični znak jetrnih okvar, ki se pojavlja pri eni od 1500 nosečnosti. Lahko je posledica jetrnih bolezni, ki se pojavijo sočasno in hkrati slučajno med nosečnostjo, ali pa spremlja jetrne bolezni, ki se sicer pojavijo samo med nosečnostjo. (1)

- **Akutni virusni hepatitis** je najpogostejši vzrok za zlatenico med nosečnostjo. Bolezen povzročajo različni hepatotropni virusi, imenovani po črkah (A, B, C, D, E, in G). Pri okužbi je značilna hepatocelularna nekroza in vnetje.
- **Akutna steatoza v nosečnosti (AFLP)** ali zamaščenje je bolezenska sprememba jeter, pri kateri maščobe presežejo 5 % teže tega organa. Prvi znaki nastopijo v 30. do 40. tednu nosečnosti. Bolezen se začne s slabostjo, bruhanjem in odklanjanjem hrane, bolečinah v okolici žličke ter glavobolom. V drugem tednu se pojavi zlatenica, ki se hitro stopnjuje. V tretjem tednu nosečnica splavi ali rodi mrtev plod, če nosečnosti prej ne prekinemo.
Bolezen se pojavi, ker estrogeni v nosečnosti okvarijo mitohondrije in oksidacijo maščobnih kislin, kar pa samo po sebi ne povzroči akutne steatoze. Potreben je še nek drugi zunanji faktor, ki dodatno okrni mitohondrijsko presnovo (nekatera zdravila). Pomembno vlogo pri nastanku te bolezni igra tudi znižana aktivnost encima dolgoverižne hidroksoacil CoA-dehidrogenaze.
- **Preeklampsija in eklampsija**
V preeklampsiji so jetra lahko okvarjena, vendar so simptomi velikokrat zabrisani. Jetrno okvaro lahko odkrijemo zgolj z laboratorijskimi testi. Le redko se bolezen klinično pokaže in sicer z občutljivostjo v zgornjem delu trebuha in z bruhanjem. Laboratorijski testi pokažejo zvišano vrednost aminotferaz, bilirubin je minimalno povišan, zelo redko tudi alkalna fosfataza. Če bolezen ni zdravljena se razvije naprej v eklampsijo, ki pa je že zelo resno stanje, in lahko ogrozi življenje ploda in tudi nosečnice.
- **Sindrom HELLP** se lahko razvije v eklampsiji. Kaže se kot:
H-hemolitična zlatenica,

EL-(elevated liver enzymes), porast jetrnih encimov,

LP-(low platelets), trombocitopenijo.

- **Intrahepatična holestaza v nosečnosti (1, 12)**

1.5.1 Intrahepatična holestaza v nosečnosti/nosečnostna holestaza

1.5.1.1 Splošno

Holestaza je definirana kot okvara žolčnega toka, ki lahko nastane zaradi neposredne okvare hepatocitov (kanalikularna holestaza) ali pa zaradi intrahepatičnih oziroma ekstrahepatičnih strukturnih motenj v žolčnih izvodilih (duktularna holestaza). (2)

Intrahepatična holestaza v nosečnosti je specifična bolezen jeter pri nosečnici. Prvi simptomi se običajno pojavijo v tretjem tromesečju. Prvi najznačilnejši simptom, ki ga nosečnica opazi, je močno srbenje kože (predvsem na dlaneh in stopalih), ki se stopnjuje ponoči, tako da povzroča nespečnost in lahko tudi hujše rane. Bolezen se lahko kaže tudi z anoreksijo (zavračanjem hrane), slabim počutjem in bolečinami v trebuhu. Pri teh bolnicah lahko opazimo, da imajo temen urin in svetlo blato, kar lahko pripišemo nenormalnemu delovanju jeter. Bolezen pogosto povezujemo z fetalno stisko, prezgodnjim porodom ali za mrtvorojenostjo. (13, 14)

1.5.1.2 Pojavnost intrahepatične holestaze v nosečnosti po svetu

Na IHCP zelo vplivajo genetski, hormonski in okoljski dejavniki. Statistika kaže, da obolenost med populacijami zelo niha.

Največ obolelih je bilo zabeleženo v Južni Ameriki (Čile) in v skandinavskih državah (predvsem na Švedskem). V Angliji je obolenost med multi-etično populacijo nosečnic 0,7 %, medtem ko je pri ženskah indijsko-azijskega ali pakistansko azijskega porekla obolenost 1,2 - 1,5 %. (14, 15)

Incidenca IHCP v Evropi je približno 10–150 primerov na 10 000 nosečnosti. (16)

Tabela III: Pojavnost ICHP po državah

| Država | Incidenca (na 10.000 primerov nosečnosti) |
|---------------|--|
| Avstralija | 80 |
| | 150 |
| | 20 |
| Bolivija | 920 |
| Kanada | 10 |
| Čile | 1560 |
| Kitajska | 10 |
| | 30 |
| Finska | 110 |
| Francija | 20 |
| | 60 |
| Poljska | 120 |
| Portugalska | 100 |
| Švedska | 150 |
| | 100 |
| ZDA | <10 |
| | 70 |

1.5.1.3 Etiologija

Etiologija IHCP je zelo kompleksna in še ne povsem razumljiva. Dejstvo je, da se bolezen pojavi ob abnormalnem delovanju žolčnega transporta, vzrokov za to pa je lahko več. Ugotovili so pomemben vpliv hormonskih, okoljskih in genetskih dejavnikov. (14)

Glavni pokazatelji, da gre za pomembno vlogo hormonov pri tem, so:

- Bolezen se začne v zadnjem tromesečju, ko je koncentracija estrogena in progesterona najvišja.
- Večja pojavnost IHCP je pri ženskah, ki so pričakovale dvojčke. Tudi one so imele izrazit porast hormonov.

- Simptomi oziroma bolezen izzveni takoj po porodu, ko se raven placentarnega hormona vrne v normalo.
- Bolezen se ponovi v 45 – 70 % naslednjih nosečnostih. (16)

V zadnjem času je bilo ugotovljeno, da je več kot 15 % IHCP povzročenih oziroma povezanih z mutacijo gena ABCB4 (MDR3).

Družino ABC proteinov sestavlja 7 poddružin, ki jih označujemo s črkami A, B, C, D, E, F in G. Ti proteini so udeleženi v aktivni prenos substratov skozi celično membrano v nasprotni smeri elektro-kemičnega gradienta ali pa opravljajo funkcijo receptorjev in/ali ionskih kanalov. ABCB poddružina, ki jo imenujemo tudi MDR, je ena od pomembnejših.

V to skupino prištevamo:

- P-glikoprotein,
- protein rezistenten na več učinkovin 3 (MDR3-MultiDrug Resistance Protein-ABCB4),
- sekretorni prenašalec žolčnih kislin (BSEP-Bile Salt Export Pump-ABCB11).

ABC prenašalci imajo zelo podobno aminokislinsko zaporedje in strukturo. V lipidnem dvosloju je oblikovanih 12 transmembranskih domen, v citoplazmi pa dve nukleotid vezoči domeni, ki sta odgovorni za vezavo in hidrolizo ATP molekule.

V družini ABCB je bilo dokazanih več mutacij znotraj genov, ki so pomembni za nastanek IHCP. (9, 12, 17, 18)

1.5.1.4 Klinični znaki in diagnostika

Diagnozo postavimo na podlagi:

- kliničnih znakov,
- laboratorijskih testov in
- izključitve ostalih bolezni jeter.

Prvi od znakov, ki ga opazimo, je srbečica kože, ki se največkrat pojavi na rokah in stopalih, lahko pa je tudi razsejana oz. generalizirana po celem telesu. Povezava med napadom srbenja ter prizadetostjo jeter ni znana. 80 % žensk z IHCP poroča o srbečici po tridesetem tednu nosečnosti. Bolnice poročajo o močno neprijetnem občutku, ki prebudi željo po praskanju. Srbečica se ponoči stopnjuje, kar je velikokrat vzrok za nespečnost in izčrpanost nosečnice. Ker se srbečici ženske ne morejo upreti, so velika težava rane, ki si jih povzročijo s praskanjem. Srbečica se lahko stopnjuje z napredovanjem nosečnosti in v 48 urah po porodu izzveni. (19, 20)

Naslednji od kliničnih znakov je zlatenica. Pojavi se pri 10 % - 15 % nosečnic. (12, 19, 20)
Z laboratorijskimi testi ugotovimo blago povišan bilirubin. Pogost pojav so tudi povišane maščobe v blatu zaradi zmanjšane reabsorpcije v jetrih. To je vzrok tudi za pomanjkanje vitaminov topnih v maščobah. Dva izmed najbolj pomembnih vitaminov za nosečnico sta vitamin K, saj skrbi za koagulacijo krvi, ter vitamin D, katerega metabolizem se zaradi ICHP lahko okvari. (6)

Obolele lahko opazijo zelo nespecifične znake, kot so slabo počutje, anoreksija in bolečine v trebuhu.

Z laboratorijskimi testi pri ženskah z IHCP ugotovimo:

- povišano koncentracijo žolčnih kislin (nad 11,0 $\mu\text{mol/l}$);
- povišane vrednosti aminotransferaz (AST, ALT);
- aktivnost glutamat-dehidrogenaze (GLDH), ki kaže na gensko mutacijo in vodi do povišanja žolčnih kislin ali do druge jetrne bolezni;
- povišano koncentracija serumskega bilirubina in
- zmanjšano koncentracijo vitamina K v krvi.

1.5.1.5 Izključitev ostalih bolezni

Pri diagnosticiranju ICHP imajo zdravniki velikokrat težave zaradi nespecifičnih simptomov. Izključiti morajo vse ostale bolezni, ki se pogosto pojavijo v nosečnosti, kot so HELLP sindrom, akutna steatoza v nosečnosti ali preeklampsija. Pri diagnozi morajo biti pozorni na pojav morebitnih alergij oz. izpuščajev, ki bi lahko povzročili srbenje, ki je eden izmed glavnih simptomov pri IHCP. Zdravniki morajo izključiti akutne virusne hepatitis, pri katerih so povišane aminotransferaze, in izključiti morajo vse ostale presnovne bolezni jeter, pri katerih se pojavijo isti povišani parametri kot pri ICHP. (17, 19)

1.5.1.6 Možnosti zdravljenja

Cilj zdravljenja IHCP je zmanjšati simptome pri materi in omogočiti rojstvo zdravega otroka. Trenutno najbolj razširjeno in učinkovito je zdravljenje z ursodeoksiholno kislino (UDCA). UDCA je hidrofilna žolčna kislina, ki jo nosečnice dobro prenašajo in nima negativnih učinkov na plod.

Mehanizem delovanja tega zdravila ni povsem razumljiv oz. raziskan, predvidevajo pa se trije osnovni mehanizmi:

- zaščita holangocitov proti citotoksičnemu delovanju hidrofobnih žolčnih kislin;

- stimulacija hepatobiliarne sekrecije, ki preprečuje zastajanje žolčnih kislin v žolčnih vodih in
- zaščita hepatocitov proti negativnemu delovanju žolčnih kislin. (17, 21, 22)

Ostale možnosti za zdravljenje so še zdravljenje z S-adenozil-L-metioninom (SAME), deksametazonom, rafampicinom in ostalimi zdravili, ki imajo različne mehanizme delovanja. Pri zdravljenju je pomembno tudi dodajanje vitamina K zaradi pomanjkanja, do katerega pride zaradi malabsorbcije maščob in v maščobah topnih vitaminov. (19)

2 NAMEN DELA

V Sloveniji so prav tako kot v svetu klinični parametri pri IHCP še dokaj neraziskani, zato smo se odločili, da ugotovimo korelacijo rezultatov bilirubina in žolčnih kislin. Ločeno smo preverjali korelacijo celokupnega bilirubina z žolčnimi kislinami in korelacijo direktnega bilirubina z žolčnimi kislinami. Zanimala nas je tudi klinična specifičnost in občutljivost posameznega parametra za IHCP, saj tega podatka nismo zasledili v nobeni študiji.

V raziskavo smo vključili dve skupini žensk z Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, katerih vzorci so bili analizirani na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. V prvo skupino smo vključili 9 žensk s potrjeno diagnozo IHCP, v kontrolno skupino brez holestaze pa 67 žensk. Obema skupinama so bile v letu 2009 izmerjene vrednosti celokupnega bilirubina, direktnega bilirubina in žolčnih kislin.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, ali obstaja povezanost med obema bilirubinoma in žolčnimi kislinami.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS BOLNIC

Našo preiskovano skupino zajema 76 žensk iz Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Najmlajša je imela 22 let, najstarejša pa 57 let.

3.2 ODVZEM IN ANALIZA VZORCEV

Za analizo celokupnega in direktnega bilirubina lahko uporabimo serum ali plazmo (kri odvezamo z antikoagulantom EDTA ali z Li-heparinom), za analizo žolčnih kislin pa lahko uporabimo plazmo ali plazmo odvzeto z EDTA. Vzorce moramo zaščititi pred direktno svetlobo. Stabilni so 2 dni pri temperaturi 15–25 °C, 7 dni pri temperaturi 2–8 °C, oziroma 6 mesecev v primeru, če jih zamrznemo.

Analizatorji:

Hitachi 921/917 (ROCHE)

Vrednosti celokupnega bilirubina smo pridobili na avtomatiziranem biokemičnem analizatorju **Hitachi 921**, vrednosti direktnega bilirubina pa na sorodnem analizatorju **Hitachi 917** proizvajalca ROCHE (Nemčija). Princip merjenja je na obeh analizatorjih spektrofotometričen.

Spektrofotometrija temelji na merjenju absorbcije svetlobe, ki prehaja skozi kiveto, v kateri je preiskovan vzorec oziroma naš analit, ki ga želimo določiti. Absorbcijo lahko merimo v ultravijoličnem ali v vidnem delu svetlobe, navadno pri absorpcijskem maksimumu.

V času analize so se na analizatorju opravljala vsa potrebna vzdrževalna dela (kalibracije, kontrola kakovosti) in čiščenje.

Opis spektrofotometra (spektrometra):

Osnovni sestavni deli spektrometra so:

- zvezni izvor svetlobe,
- monokromator (element za izbiro valovne dolžine),
- kiveta,
- fotodetektor (fotopomnoževalka),
- ojačevalec signala,
- čitalec signala.

Spektrofotometer je optični inštrument, ki meri količino in jakost svetlobne energije, ki jo objekt (v našem primeru vzorec) prepušča ali absorbira. Tisti, ki so namenjeni merjenju

vidne in UV svetlobe, imajo ponavadi dva izvora svetlobe. S tem dosežemo širok razpon valovnih dolžin, ki jih lahko uporabljamo. (23)

3.2.1 Metoda za določanje celokupnega bilirubina

Metoda za določanje bilirubina temelji na reakciji med bilirubinom in doazonijevimi ioni (Diazo reakcija) v močno kislem mediju. Merimo intenziteto obarvanja, ki je sorazmerna z koncentracijo celokupnega bilirubina.

bilirubin + diazonijevi ioni → azobilirubin

Sestava reagentov:

Reagent 1:

Natrijev acetatni pufer: 85 mmol/l;
sulfanilna kislina: 110 mmol/l.

Reagent 2:

HCl: 100 mmol/l;
diazonijevi ioni: 3 mmol/l.

Reagenti so bili že pripravljene za uporabo.

Referenčne vrednosti:

Tabela IV: Referenčne vrednosti za določanje celokupnega bilirubina

| Odrasli | do 21 $\mu\text{mol/l}$ (1,2 mg/dl) |
|-------------------------------|---|
| Otroci nad 1 mesecem starosti | do 17 $\mu\text{mol/l}$ (1,0 mg/dl) |
| Novorojenčki 24 ur | $\geq 137 \mu\text{mol/l}$ ($\geq 8,0$ mg/dl) |
| Novorojenčki 48 ur | $\geq 222 \mu\text{mol/l}$ ($\geq 13,0$ mg/dl) |
| Novorojenčki 84 ur | $\geq 290 \mu\text{mol/l}$ (17,0 md/dl) |

Analizator avtomatično preračuna vrednosti posameznega vzorca. Faktor pretvorbe: **mg/dl x 17.1 = $\mu\text{mol/l}$**

3.2.2 Metoda za določanje direktnega bilirubina

Tudi metoda za določanje direktnega bilirubina temelji na isti reakciji kot metoda za določanje celokupnega bilirubina.

Bilirubin + diazonijeva sol → azobilirubin

Sestava reagentov:

R1-EDTA: 1,5 mmol/l; NaCl: 152,5 mmol/l

R2- Sulfanilna kislina 29 mmol/l, HCl; 170 mmol/l

R2a-Natrijev nitrit: 25 mmol/l

R1 je že pripravljen za uporabo. Drugi reagent med tem tik pred uporabo pripravimo tako, da zmešamo R2 in R2a.

Referenčne vrednosti:

Direktni bilirubin $\leq 5,1 \mu\text{mol/l}$ (0,3 mg/dl)

3.2.3 Metoda za določanje žolčnih kislin

Princip metode

Žolčne kisline se s pomočjo 3 α hidroksteroid dehidrogenaze (3 α HSD) oksidirajo v 3-okso žolčne kisline. V procesu oksidativne reakcije se molekula reducira do NADH + H⁺. NADH se v naslednji stopnji s pomočjo NBT (nitrotetrazola modro – barvilo) in diaforaze oksidira v NAD. Pri tem nastane tudi formazan, katerega absorbanco merimo pri maksimumu **530 nm** (vidni spekter). Intenziteta obarvanja je sorazmerna s koncentracijo žolčnih kislin v vzorcu.

Reagenti

Reagent A:

- NAD 2,5 mmol/l,
- NBT 0,61 mmol/l,
- diaforaza 625 U/l,
- pufer pH 7,0 \pm 0,1,
- nereaktivni stabilizatorji in polnilo.

Reagent B:

- 3 α HSD 1250 U/l,
- nereaktivni stabilizatorji in polnilo.

Priprava reagentov

Razredčimo reagent A in B z deionizirano vodo do oznake na embalaži. Nekajkrat rahlo premešamo. Pripravimo testni reagent tako, da zmešamo 4 ml reagenta A in 1 ml reagenta B. Za reagenčno slepo zmešamo 1 ml deionizirane vode z 4 ml reagenta A.

Stabilnost reagentov

Zaprte reagente hranimo v hladilniku pri temperaturi 2–8 °C, do datuma, ki je označen na embalaži. Odprti reagenti so pri sobni temperaturi stabilni 24 ur ali pa v hladilniku 7 dni na temperaturi 2–8 °C.

Reagenčna slepa in že pripravljene reagenti so stabilni 24 ur pri sobni temperaturi 18–26 °C oziroma 3 dni v hladilniku.

Postopek analize:

- Pripravimo si reagente za analizo po predpisanem postopku.
- Na spektrofotometeru nastavimo valovno dolžino na 530 nm in absorbanco umerimo na 0 z destilirano vodo.
- Reagente in reagenčno slepo termostatiramo na vodni kopeli do temperature 37 °C.
- Pripravimo in označimo kivete.
- Napipetiramo 0,2 ml standarda, slepega standarda, kontrolne slepe, kontrole, vzorčne slepe in vzorca v vsako kiveto. Nato dodamo še 0,5 mL testnega reagenta oziroma 0,5 mL vzorčne slepe v ustrezno kiveto.
- Premešamo in inkubiramo 5 minut pri temperaturi 37 °C.
- Nato merimo absorbanco pri 530 nm.

Koncentracijo žolčnih izračunamo s pomočjo formule:

$A_{ST} - A_{SB} / A_{CT} - A_{CB}$ x koncentracija standarda

A_{ST} = absorbanca vzorca z reagentom

A_{SB} = absorbanca vzorca z reagenčno slepo

A_{CT} = absorbanca standarda z testnim reagentom

A_{CB} = absorbanca standarda z reagenčno slepo

Referenčna vrednost žolčnih kislin v serumu/plazmi je 0–8,1 µmol/l.

3.2.4 Statistična obdelava podatkov

Preiskovanke smo razdelili v dve skupini. V prvi skupini so ženske s IHCP ($N_1=9$) v starosti od 26 do 40 let. V drugi skupini, ki je kontrolna skupina, pa je 67 žensk ($N_2= 67$),

ki nimajo potrjene IHCP, v starosti od 22 do 57 let. V naslednjih izračunih nas je zanimalo, ali se skupini med seboj statistično razlikujeta. Za vse teste smo uporabili stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$.

V prvem koraku smo želeli preveriti, ali se izmerjeni rezultati razporejajo po Gaussovi distribuciji (normalno). Za izračun smo uporabili statistični program SPSS 20.0 ter Kolmogorov-Smirnov test. S tem testom smo prišli do podatkov o številu preiskovank (N), povprečni vrednosti izmerjenih rezultatov, standardnem odklonu in najmanjši ter največji razliki porazdelitve koncentracij.

Postavili smo si dve hipotezi:

- H_0 : Vrednosti izmerjenih parametrov se porazdeljujejo normalno
- H_1 : Vrednosti izmerjenih parametrov se ne porazdeljujejo normalno

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, lahko sklepamo, da porazdelitev ni normalna, in zavrnemo ničelno domnevo, ki pravi, da se parametri porazdeljujejo normalno. Če je P vrednost večja od 0,05, pomeni, da je porazdelitev normalna oziroma ni dovolj dokazov, na podlagi katerih bi sklepali, da distribucija ni normalna.

3.2.4.1 Statistični podatki skupine z potrjeno diagnozo IHCP

Tabela V: Statistični podatki skupine s potrjeno IHCP

| | N | Povprečna vrednost | St. deviacija | Minimum | Maksimum | P vrednost (dvostranski test) |
|--|---|--------------------|---------------|---------|----------|-------------------------------|
| Cel. Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | 9 | 29,44 | 19,24 | 11 | 67 | ,587 |
| Direktni bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | 9 | 18,78 | 14,97 | 5 | 46 | ,546 |
| Žolčne kisline ($\mu\text{mol/l}$) | 9 | 54,78 | 56,14 | 5 | 167 | ,279 |

Z rezultati, ki nam jih je podal Kolmogorov-Smirnov test, za skupino s potrjeno intrahepatično holestazo lahko dokažemo, da rezultati sledijo Gaussovi (normalni) distribuciji, saj so bile izračunane vrednosti P višje od 0,05.

$P_{\text{cel. bil.}} = 0,587$

$P_{\text{dir. bil.}} = 0,546$

$P_{\text{žol. kisl.}} = 0,279$

3.2.4.2 Statistični podatki skupine z nepotrjeno diagnozo IHCP

Tabela VI: Statistični podatki za drugo (kontrolno) skupino

| | N | Povprečna vrednost | St. deviacija | Minimum | Maksimum | P vrednost (dvostranski test) |
|--|----|--------------------|---------------|---------|----------|-------------------------------|
| Cel. Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | 67 | 9,46 | 5,43 | 4 | 39 | ,017 |
| Direktni bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) | 67 | 2,85 | 2,02 | 1 | 12 | ,001 |
| Žolčne kisline ($\mu\text{mol/l}$) | 67 | 6,4 | 7,25 | 0,4 | 34 | ,001 |

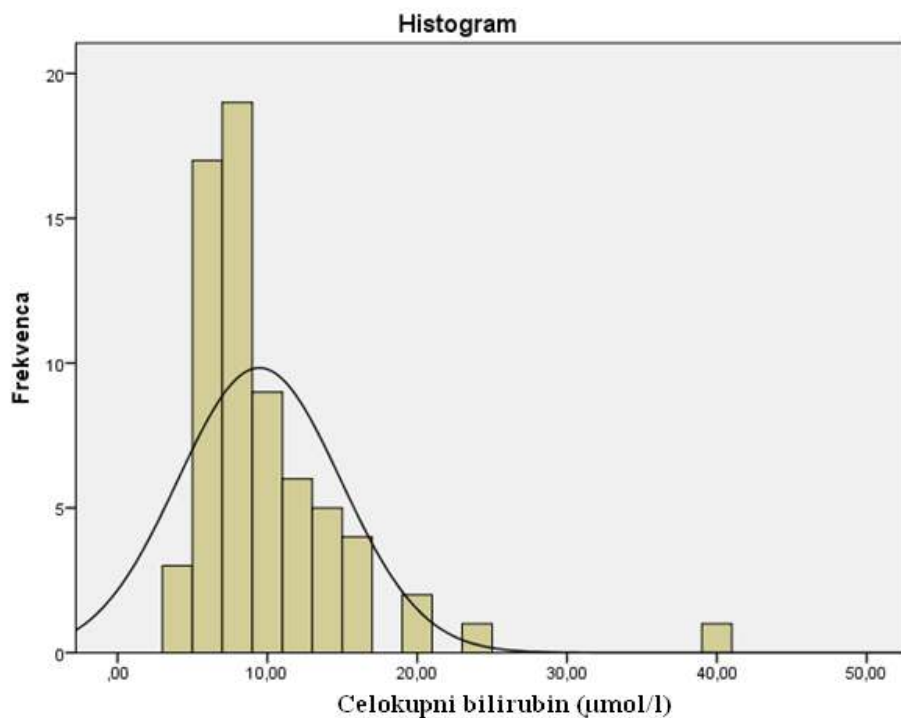
Rezultat, ki nam ga je podal Kolmogorov-Smirnov test za drugo (kontrolno) skupino, nam pove, da rezultati ne sledijo Gaussovi (normalni) distribuciji, saj so izračunane vrednosti nižje od $P = 0,05$.

$P_{\text{cel. bil.}} = 0,017$

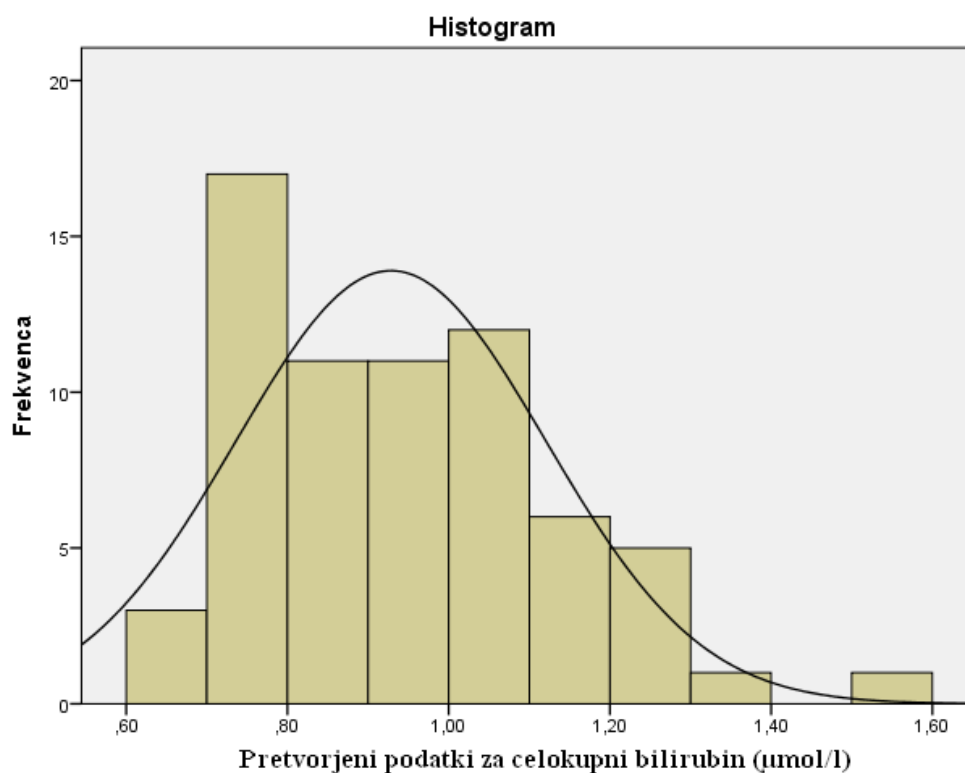
$P_{\text{dir. bil.}} = 0,001$

$P_{\text{žol. kisl.}} = 0,001$

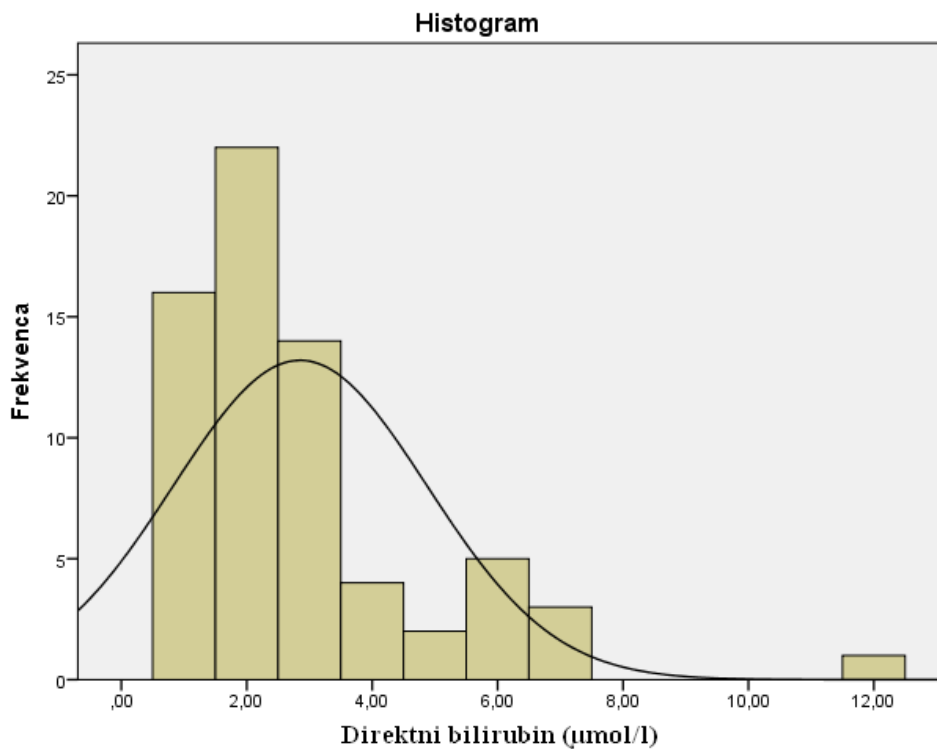
Zaradi nenormalne distribucije pri kontrolni skupini smo se odločili, da podatke logaritmsko transformiramo tako, da bo nastala normalna porazdelitev.



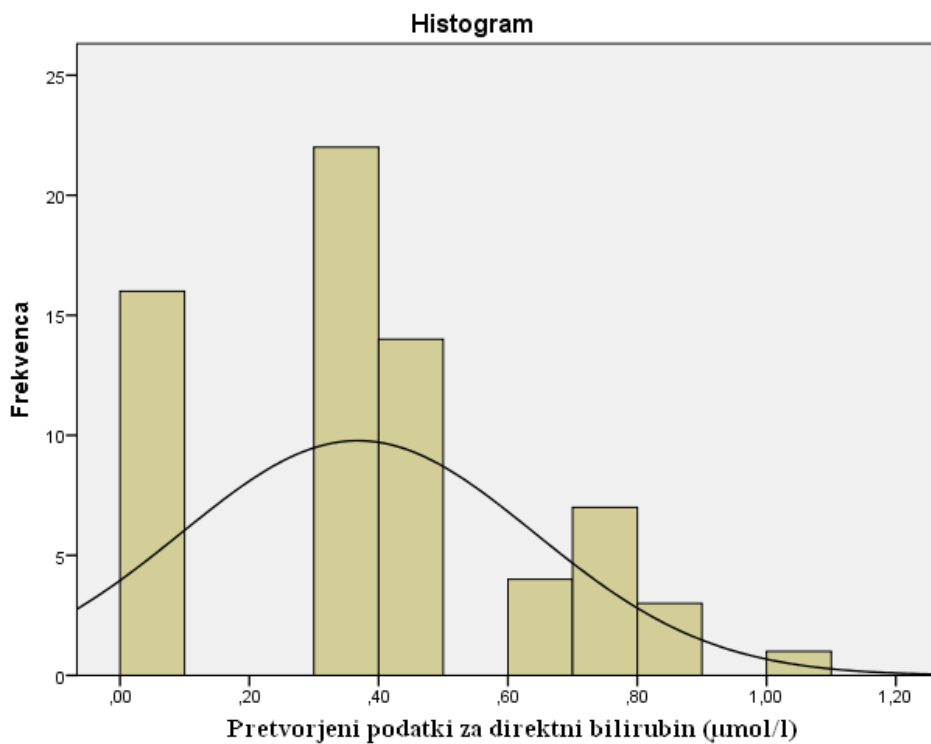
Slika 3: Histogram podatkov za celokupni bilirubin za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP



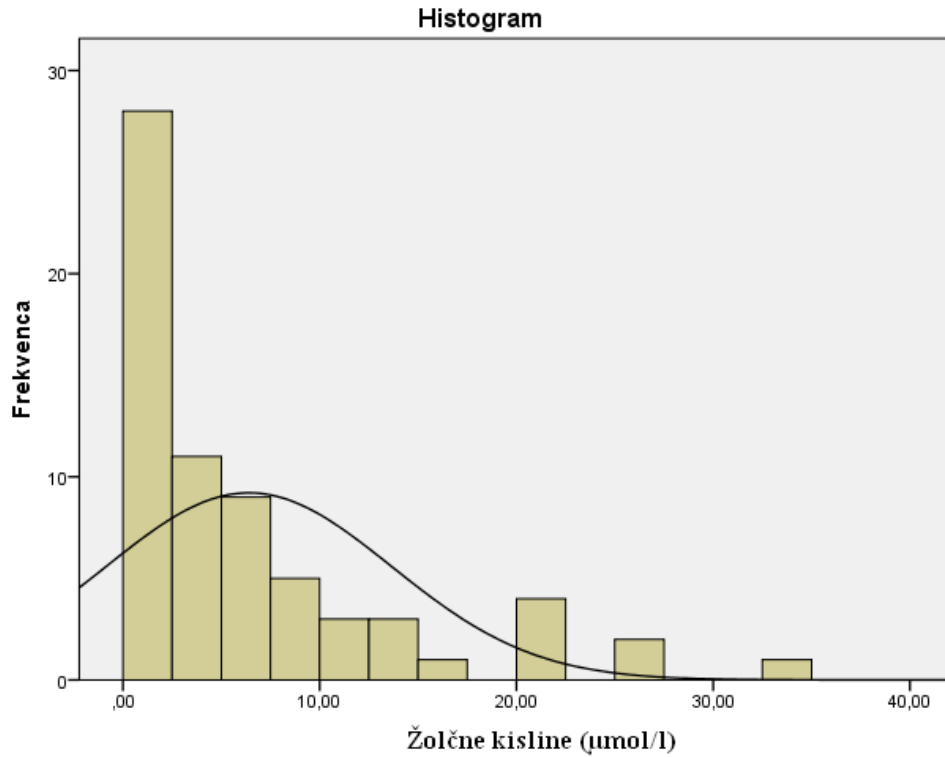
Slika 4: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za celokupni bilirubin za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP



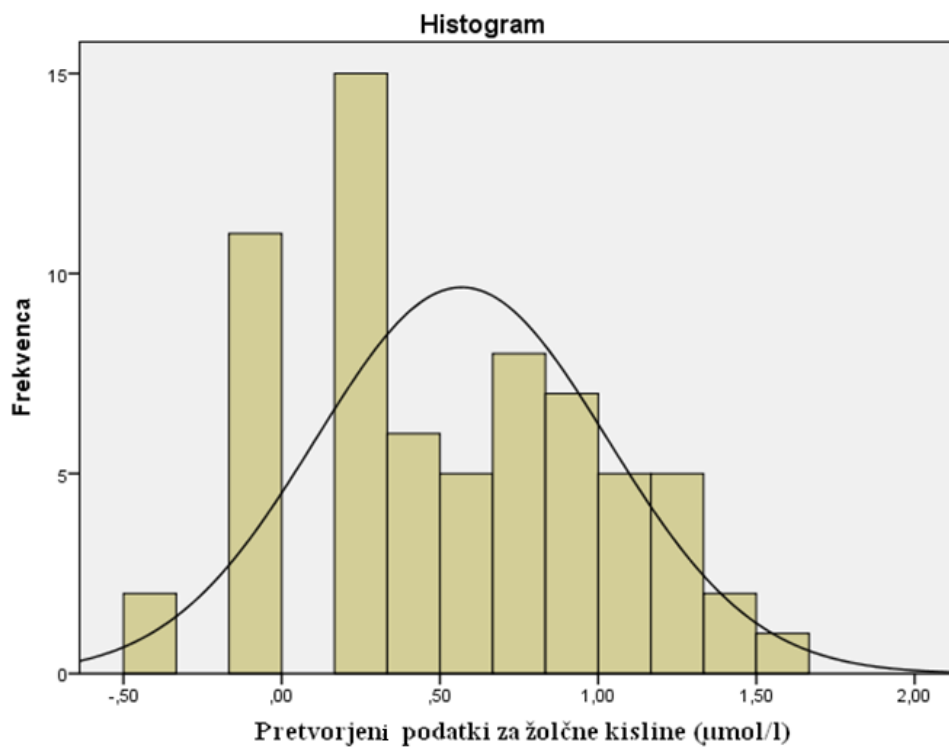
Slika 5: Histogram podatkov za direktni bilirubin za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP



Slika 6: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za direktni bilirubin za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP



Slika 7: Histogram podatkov za žolčne kisline za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP



Slika 8: Histogram logaritmiranih (pretvorjenih) podatkov za žolčne kisline za skupino z nepotrjeno diagnozo ICHP

Da bi preverili, ali so po logaritmiranju podatki razporejeni normalno, smo ponovno opravili Kolmogorov-Smirnov test.

Tabela VII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za drugo (kontrolno) skupino po logaritmiranju (pretvorbi).

| | | Celokupni bilirubin | Direktni bilirubin | Žolčne kisline |
|-------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| N | | 67 | 67 | 67 |
| Normalni parametri | Povp. Vrednost | ,9284 | ,3679 | ,5687 |
| | Std. Deviacija | ,19231 | ,27338 | ,46141 |
| | Absolutna Najbolj ekstremne vrednost | ,141 | ,165 | ,138 |
| razlike | Pozitivna | ,141 | ,165 | ,138 |
| | Negativna | -,086 | -,163 | -,086 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | 1,152 | 1,353 | 1,127 |
| P vrednost (dvostranski test) | | ,141 | ,051 | ,157 |

Rezultati, ki nam ga je podal Kolmogorov-Smirnov test, nam pove, da rezultati sedaj sledijo Gausssovi (normalni) distribuciji, saj so tokratne izračunane vrednosti višje od 0,05.

$$P_{\text{cel. bil.}} = 0,141$$

$$P_{\text{dir. bil.}} = 0,051$$

$$P_{\text{žol. kis.}} = 0,157$$

Po transformaciji na normalno porazdelitev smo želeli izvedeti, ali so izračunane vrednosti significantne ali ne, zato smo izračunali t-test.

Tabela VIII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za skupino s potrjeno diagnozo ICHP po logaritmiranju (pretvorbi).

| | | Celokupni bilirubin | Direktni bilirubin | Žolčne kisline |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|----------------|
| N | | 9 | 9 | 9 |
| Normalni parametri | Povp. Vrednost | 1,3951 | 1,1521 | 1,5230 |
| | Std. Deviacija | ,26342 | ,34652 | ,47797 |
| Najbolj ekstremne vrednosti | Absolutna | ,162 | ,145 | ,193 |
| | Pozitivna | ,162 | ,145 | ,193 |
| razlike | Negativna | -,127 | -,125 | -,159 |
| | Kolmogorov-Smirnov Z | ,487 | ,436 | ,579 |
| P vrednost (dvostranski test) | | ,972 | ,991 | ,891 |

Tabela IX: T-test logaritmskih vrednosti

| | | Parne razlike | | | | | t | df | Sig. (2-tailed) |
|--------------------|--------------------|---------------|---------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|----|-----------------|
| | | Povprečje | St. deviacija | St. napaka | 95% Interval zaupanja v razliko | 95% Interval zaupanja v razliko | | | |
| | | | | | Spodnja | Zgornja | | | |
| | | | | | Celokupni bilirubin | potr. - nepotrjene | | | |
| Direktni bilirubin | potr. - nepotrjene | ,73429 | ,52061 | ,17354 | ,33412 | 1,13447 | 4,231 | 8 | ,003 |
| Žolčne kisline | potr. - nepotrjene | 1,08523 | ,59098 | ,19699 | ,63096 | 1,53950 | 5,509 | 8 | ,001 |

V prvem koraku izračuna t-testa postavimo ničelno domnevo: $H_0 = P > 0,05$.

Ničelna hipoteza je, da se aritmetični sredini logaritemsko transformirani vrednosti ne razlikujeta.

$$P_{\text{cel.bil.}} = 0,007$$

$$P_{\text{dir.bil.}} = 0,003$$

$$P_{\text{žol. kis.}} = 0,01$$

Ker so vsi rezultati manjši od naše ničelne hipoteze ($H_0 = P < 0,05$), slednjo zavrnamo in zaključimo:

- Razlike med rezultati celokupnega bilirubina pri ženskah s potrjeno IHCP in ženskah z nepotrjeno IHCP niso nastale naključno, temveč kot posledica vpliva bolezni. Rezultat nam pove, da je koncentracija celokupnega bilirubina pri ženskah s potrjeno diagnozo IHCP statistično značilno različna (višja) kot pri ženskah z nepotrjeno diagnozo. Ista interpretacija velja tudi za vpliv direktnega bilirubina in žolčnih kislin med obema skupinama (rezultati direktnega bilirubina in žolčnih kislin so pri skupini žensk s potrjeno diagnozo statistično značilno višji).

4 REZULTATI

Rezultati meritev so bili pridobljeni v letu 2009 iz vzorcev krvi 76 žensk Ginekološke klinike v Ljubljani.

Tabela X: Rezultati, pridobljeni pri skupini žensk, ki so imele potrjeno diagnozo IHCP

| Št. Vzorca (N ₁ = 9) | Koncentracija celokupnega bilirubina (μmol/l) | Koncentracija direktnega bilirubina (μmol/l) | Koncentracija žolčnih kislin (μmol/l) |
|---------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| 1 | 14 | 7 | 21 |
| 2 | 55 | 40 | 5 |
| 3 | 67 | 46 | 90 |
| 4 | 32 | 24 | 116 |
| 5 | 15 | 6 | 24 |
| 6 | 22 | 12 | 22 |
| 7 | 24 | 14 | 17 |
| 8 | 11 | 5 | 31 |
| 9 | 25 | 15 | 167 |

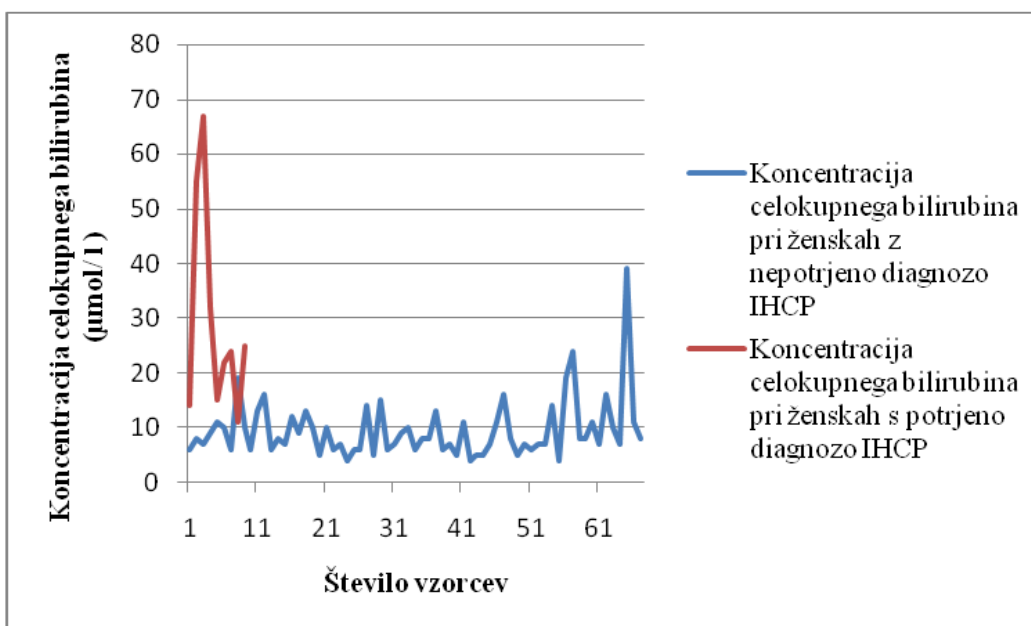
Tabela XI: Rezultati, pridobljeni pri skupini žensk, ki niso imele potrjene diagnoze IHCP

| Št. Vzorca (N ₂ = 67) | Koncentracija celokupnega bilirubina (μmol/l) | Koncentracija direktnega bilirubina (μmol/l) | Koncentracija žolčnih kislin (μmol/l) |
|----------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| 1 | 6 | 2 | 1 |
| 2 | 8 | 2 | 2 |
| 3 | 7 | 2 | 2 |
| 4 | 9 | 2 | 1 |
| 5 | 11 | 6 | 17 |
| 6 | 10 | 3 | 2 |
| 7 | 6 | 1 | 1 |

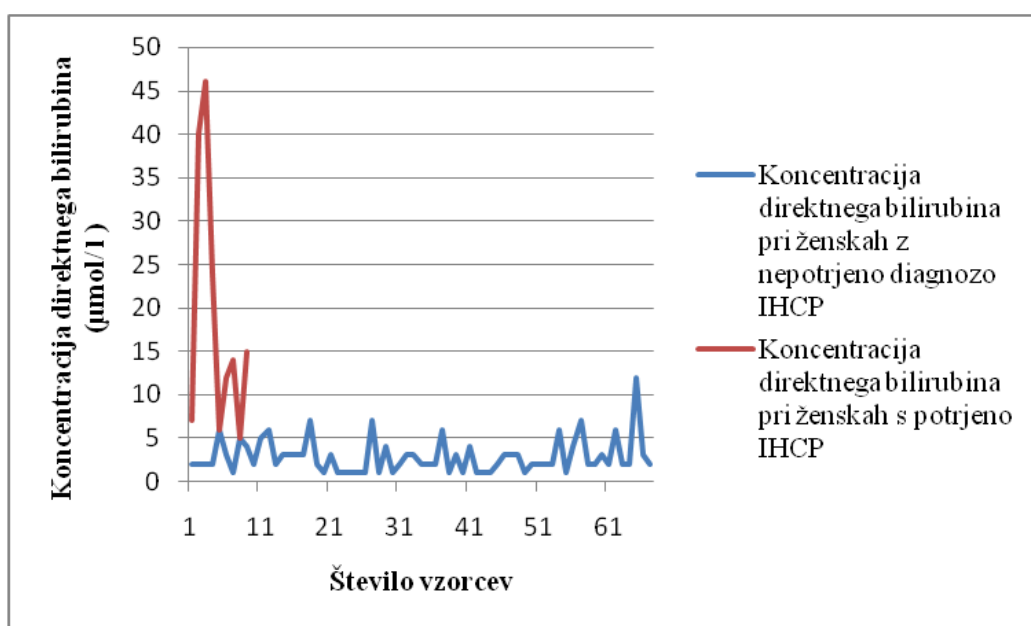
| | | | |
|----|----|---|-----|
| 8 | 19 | 5 | 5 |
| 9 | 10 | 4 | 13 |
| 10 | 6 | 2 | 2 |
| 11 | 13 | 5 | 20 |
| 12 | 16 | 6 | 25 |
| 13 | 6 | 2 | 8 |
| 14 | 8 | 3 | 8 |
| 15 | 7 | 3 | 1 |
| 16 | 12 | 3 | 20 |
| 17 | 9 | 3 | 3 |
| 18 | 13 | 7 | 14 |
| 19 | 10 | 2 | 2 |
| 20 | 5 | 1 | 3 |
| 21 | 10 | 3 | 12 |
| 22 | 6 | 1 | 1 |
| 23 | 7 | 1 | 5 |
| 24 | 4 | 1 | 1 |
| 25 | 6 | 1 | 1 |
| 26 | 6 | 1 | 3 |
| 27 | 14 | 7 | 4 |
| 28 | 5 | 1 | 6 |
| 29 | 15 | 4 | 3 |
| 30 | 6 | 1 | 4 |
| 31 | 7 | 2 | 5 |
| 32 | 9 | 3 | 2 |
| 33 | 10 | 3 | 21 |
| 34 | 6 | 2 | 9 |
| 35 | 8 | 2 | 0,4 |
| 36 | 8 | 2 | 2 |
| 37 | 13 | 6 | 27 |
| 38 | 6 | 1 | 12 |
| 39 | 7 | 3 | 13 |

| | | | |
|----|----|----|-----|
| 40 | 5 | 1 | 1 |
| 41 | 11 | 4 | 8 |
| 42 | 4 | 1 | 3 |
| 43 | 5 | 1 | 2 |
| 44 | 5 | 1 | 4 |
| 45 | 7 | 2 | 2 |
| 46 | 11 | 3 | 34 |
| 47 | 16 | 3 | 1 |
| 48 | 8 | 3 | 3 |
| 49 | 5 | 1 | 5 |
| 50 | 7 | 2 | 2 |
| 51 | 6 | 2 | 2 |
| 52 | 7 | 2 | 5 |
| 53 | 7 | 2 | 2 |
| 54 | 14 | 6 | 8 |
| 55 | 4 | 1 | 4 |
| 56 | 19 | 4 | 1 |
| 57 | 24 | 7 | 10 |
| 58 | 8 | 2 | 7 |
| 59 | 8 | 2 | 4 |
| 60 | 11 | 3 | 0,4 |
| 61 | 7 | 2 | 2 |
| 62 | 16 | 6 | 6 |
| 63 | 10 | 2 | 5 |
| 64 | 7 | 2 | 21 |
| 65 | 39 | 12 | 1 |
| 66 | 11 | 3 | 2 |
| 67 | 8 | 2 | 2 |

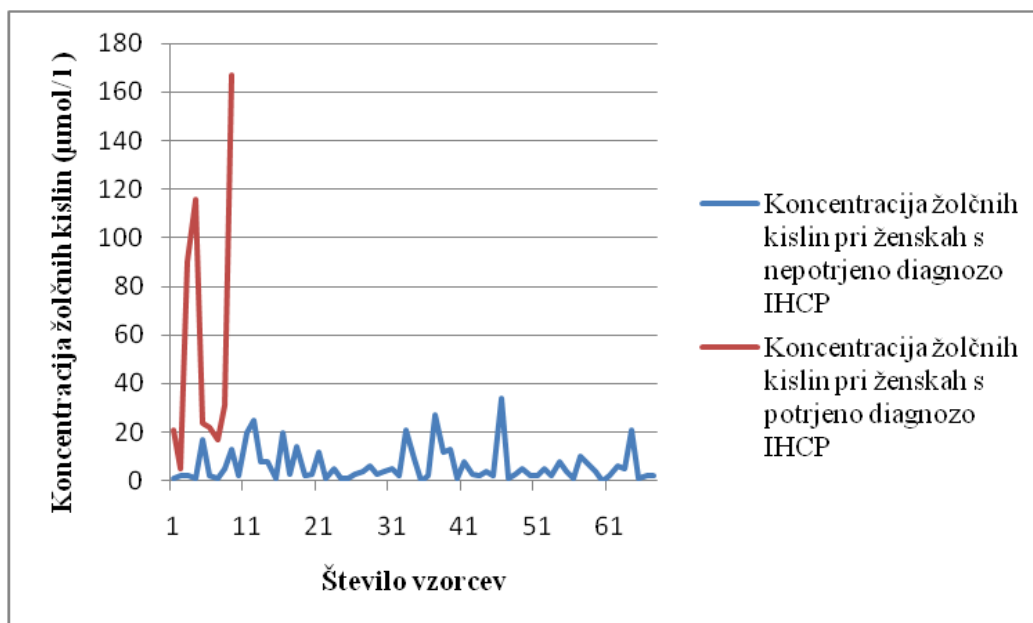
Prikaz posameznih laboratorijskih vrednosti oziroma razmerje koncentracij med obema skupinama:



Slika 9: Razmerje med koncentracijo celokupnega bilirubina pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP



Slika 10: Razmerje med koncentracijo direktnega bilirubina pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP



Slika 11: Razmerje med koncentracijo žolčnih kislin pri ženskah s potrjeno in nepotrjeno diagnozo IHCP

4.1 KLINIČNA SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST

4.1.1 Diagnostična ali klinična občutljivost

Klinična občutljivost predstavlja delež pacientov s proučevano boleznijo (v našem primeru pacientke z intrahepatično holestazo v nosečnosti), ki imajo merjeno lastnost (v našem primeru celokupni bilirubin, bilirubin določen z direktno reakcijo oziroma žolčne kisline) patološko. Število pričakovano pozitivnih rezultatov določimo z različnimi kliničnimi merili, v našem primeru z merjenjem koncentracij. Lažno pozitivni rezultati so tisti nad referenčno vrednostjo pri ženskah, ki nimajo IHCP, lažno negativni pa tisti pod referenčno vrednostjo pri ženskah z IHCP.

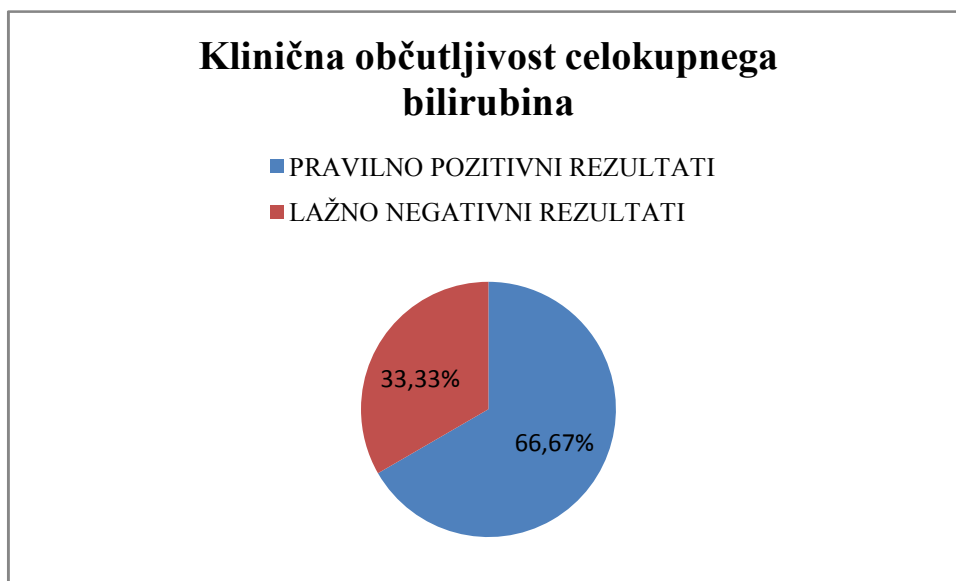
Formula za izračun občutljivosti:

$$\text{Občutljivost v \%} = (A/A+C) \times 100$$

A – Pravilno pozitivna reakcija

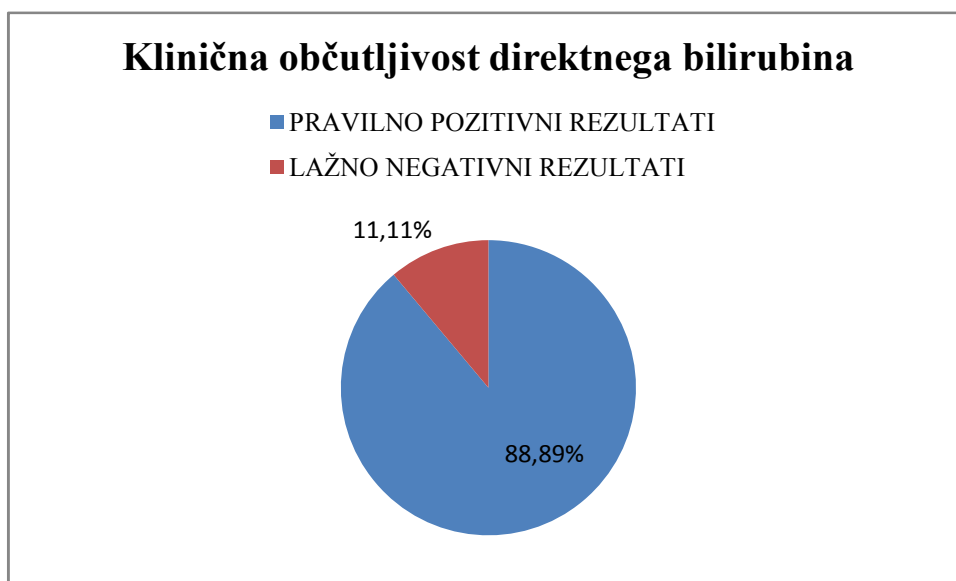
C – Lažno negativna reakcija

Občutljivost celokupnega bilirubina v \% = $(6/6+3) \times 100 = 66,67 \%$



Slika 12: Klinična občutljivost celokupnega bilirubina

Občutljivost direktnega bilirubina v % = $(8/8+1) \times 100 = 88,89 \%$



Slika 13: Klinična občutljivost direktnega bilirubina

Občutljivost žolčnih kislin v % = $(8/8+1) \times 100 = 88,89 \%$



Slika 14: Klinična občutljivost žolčnih kislin

4.1.2 Diagnostična ali klinična specifičnost

Klinična specifičnost predstavlja delež tistih preiskovancev, ki so brez proučevane bolezni in pri katerih merjena lastnost ni patološka. Povedano drugače, klinična specifičnost predstavlja delež resnično negativnih dogodkov (negativna diagnoza intrahepatične holestaze), ki smo jih pravilno ugotovili.

Občutljivost in specifičnost lahko izračunamo s pomočjo spodnje tabele.

Tabela XII: Razpredelnica za izračun občutljivosti ali specifičnosti

| Testni rezultat | Koncentracija | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Povišana koncentracija | Normalna koncentracija |
| Holestaza prisotna | pravilno pozitivna reakcija | lažno pozitivna reakcija |
| | A | B |
| Holestaza odsotna | lažno negativna reakcija | pravilno negativna reakcija |
| | C | D |

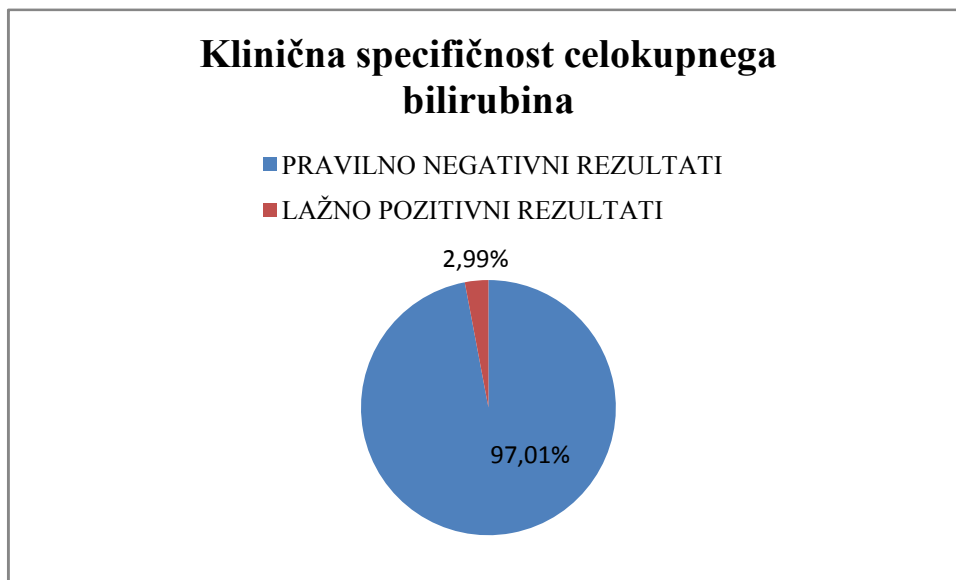
Formula za izračun specifičnosti:

$$\text{Specifičnost v \%} = (D/B+D) \times 100$$

B – lažno pozitivna reakcija

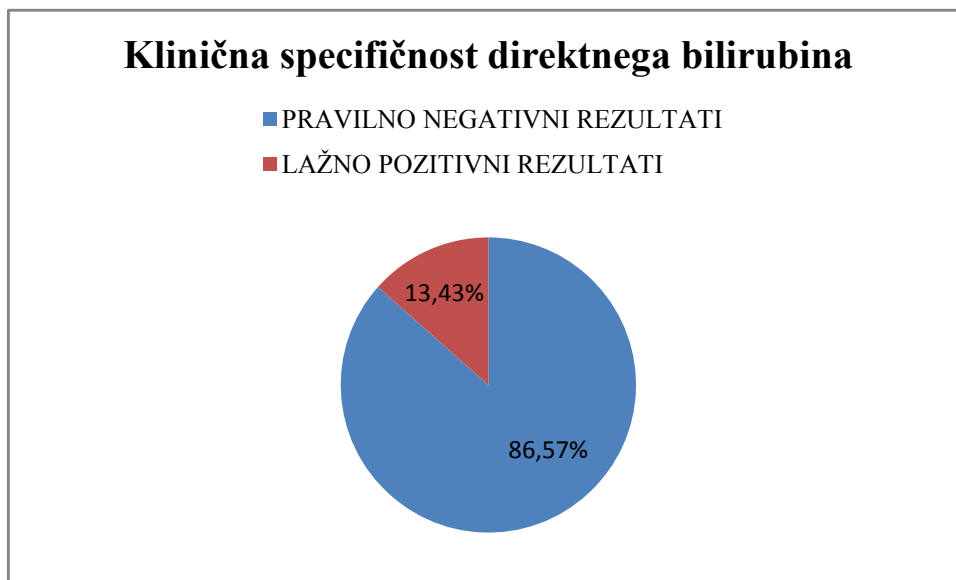
D – pravilno negativna reakcija

Specifičnost celokupnega bilirubina v % = $(65/2+65) \times 100 = 97,01 \%$



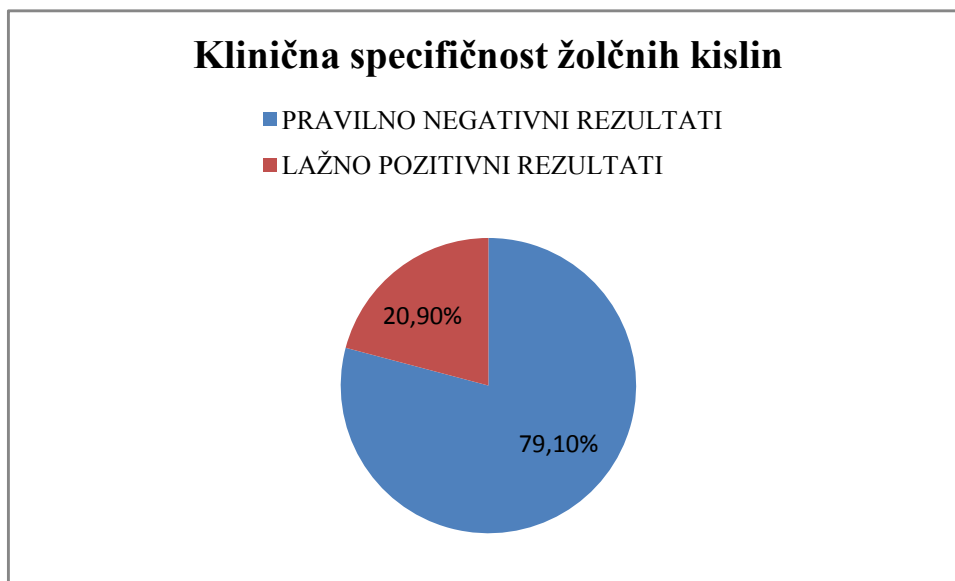
Slika 15: Klinična specifičnost celokupnega bilirubina

Specifičnost direktnega bilirubina v % = $(58/9+58) \times 100 = 86,57 \%$



Slika 16: Klinična specifičnost direktnega bilirubina

Specifičnost žolčnih kislin v % = $(54 / (14 + 54)) \times 100 = 79,10 \%$



Slika 17: Klinična specifičnost žolčnih kislin

4.1.3 Diagnostično razmerje obetov (DOR)

Diagnostično razmerje obetov nam pove, kolikokrat več ali manj je določen rezultat diagnostičnega testa prisoten pri osebi, ki ima bolezen kot pa pri osebi brez bolezni.

$$\text{DOR} = \frac{\frac{\text{občutljivost}}{1 - \text{občutljivost}}}{\frac{1 - \text{specifičnost}}{\text{specifičnost}}}$$

$$\text{DOR}_{\text{CEL. BIL.}} = 64,90$$

$$\text{DOR}_{\text{DIR. BIL.}} = 51,57$$

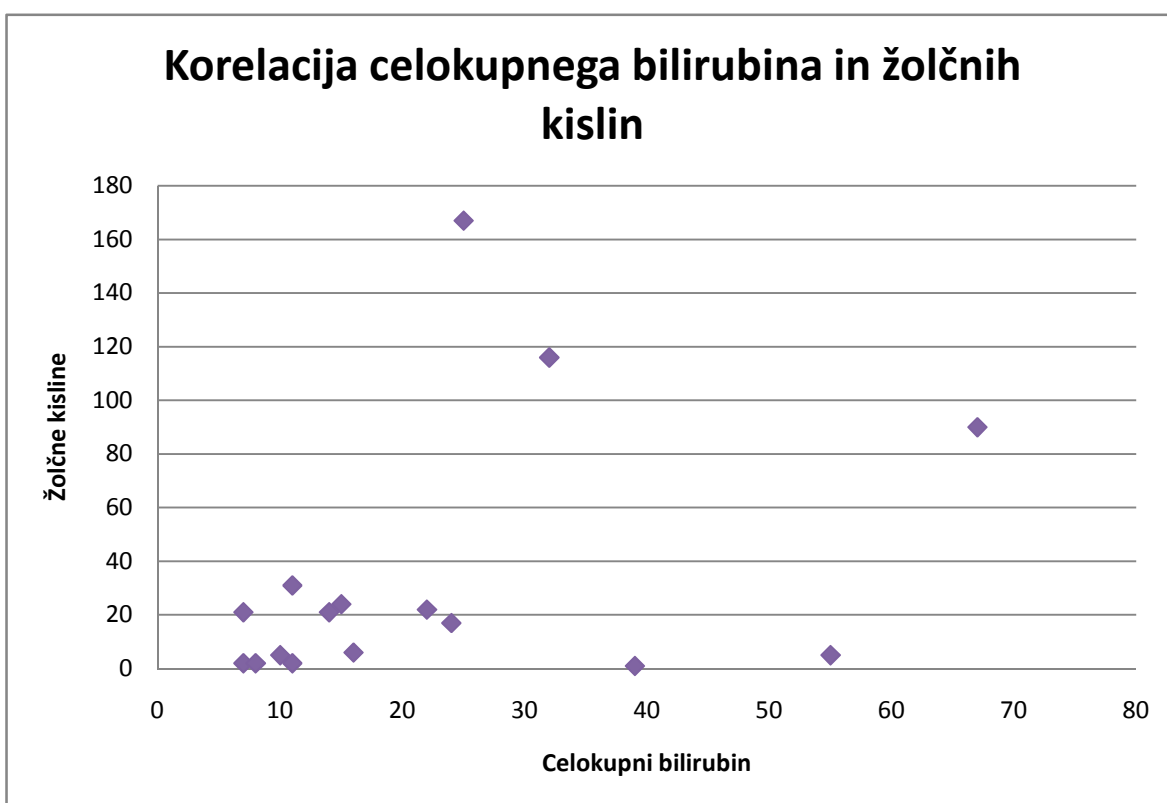
$$\text{DOR}_{\text{ŽOL. KIS.}} = 30,28$$

4.2 KORELACIJA REZULTATOV

Izračunali smo tudi, kakšna je korelacija med žolčnimi kislinami ter celokupnim bilirubinom ter korelacijo med žolčnimi kislinami in direktnim bilirubinom.

Tabela XIII: Korelacija rezultatov med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami

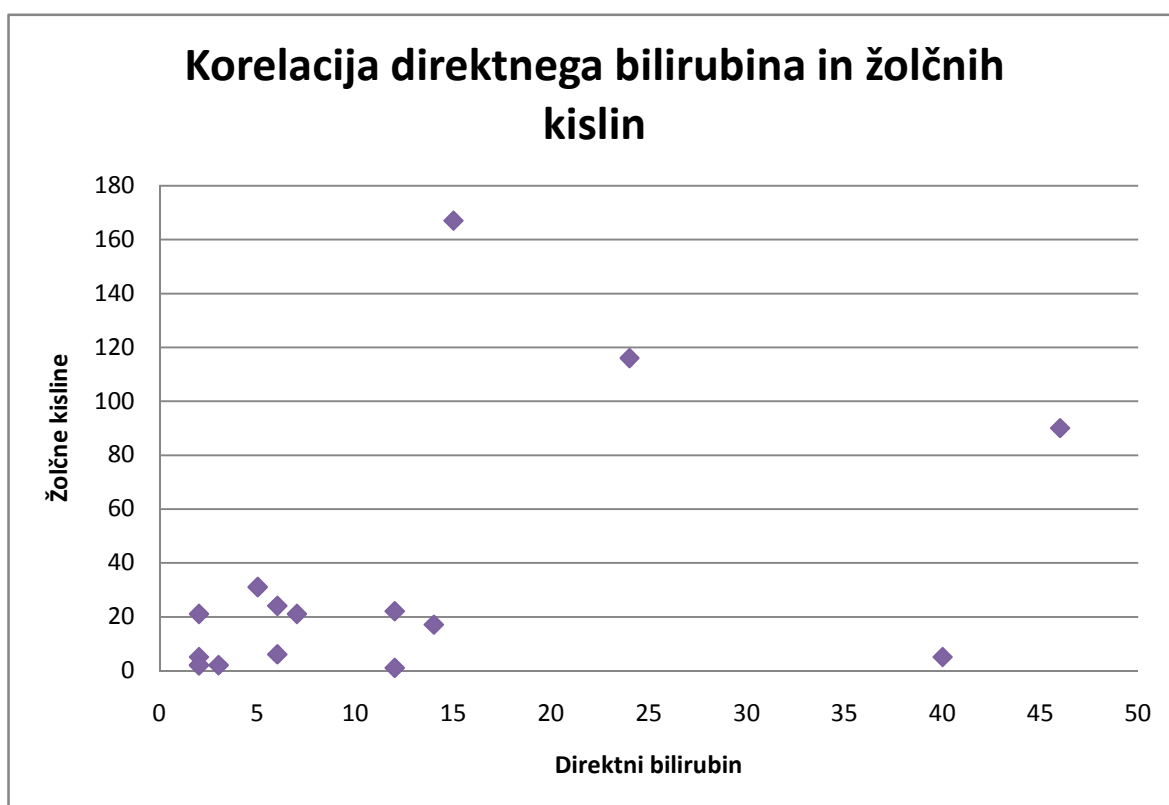
| | | Celokupni bilirubin | Žolčne kisline |
|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------|
| Celokupni bilirubin | Pearsonov koef. korelacije | 1 | ,494** |
| | Sig. (1-tailed) | | ,000 |
| | N | 76 | 76 |
| Žolčne kisline | Pearsonov koef. korelacije | ,494** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | ,000 | |
| | N | 76 | 76 |



Slika 18: Korelacija med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami

Tabela XIV: Korelacija rezultatov med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami

| | | Žolčne kisline | Direktni bilirubin |
|--------------------|----------------------------|----------------|--------------------|
| Žolčne kisline | Pearsonov koef. korelacije | 1 | ,558** |
| | Sig. (1-tailed) | | ,000 |
| | N | 76 | 76 |
| Direktni bilirubin | Pearsonov koef. korelacije | ,558** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | ,000 | |
| | N | 76 | 76 |



Slika 19: Korelacija med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli izvedeti, kakšna je korelacija med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami ter med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami pri IHCP.

V prvem koraku smo skupino 76 žensk razdelili v dve skupini. Prva skupina je vključevala 9 žensk s potrjeno diagnozo intrahepatične holestaze v nosečnosti. Druga, kontrolna skupina, pa je štela 67 žensk brez potrjene diagnoze intrahepatične holestaze. Podatke smo nato statistično analizirali s pomočjo statističnega programa SPSS 20.0. Z izračunom Kolmogorov-Smirnovega testa smo izvedeli, ali rezultati sledijo Gaussovi (normalni) distribuciji ali ne. Za interpretacijo tega testa smo si postavili dve hipotezi, in sicer: ničelna hipoteza je bila, da se rezultati porazdeljujejo normalno, druga pa, da se rezultati ne porazdeljujejo normalno. Pri tem testu nas zanima predvsem vrednost P. Če je slednja večja od 0,05, sprejmemo ničelno hipotezo, če je P vrednost manjša od 0,05, pa ničelno hipotezo zavrnemo. V našem primeru smo pri prvi skupini (ženske s potrjeno diagnozo) ugotovili, da rezultati sledijo normalni distribuciji, saj so bili rezultati večji od $P = 0,05$. Pri kontrolni skupini smo ugotovili, da rezultati ne sledijo normalni distribuciji, saj so bili rezultati nižji od $P = 0,05$. Ker smo želeli primerjati povprečne vrednosti merjenih parametrov med seboj, smo morali rezultate pretvoriti tako, da bodo rezultati sledili normalni distribuciji. Po pretvorbi rezultatov smo nato ponovno izračunali Kolmogorov-Smirnov test za drugo skupino. Rezultat je sedaj pokazal, da rezultati sledijo Gaussovi (normalni) distribuciji, saj so sedaj rezultati presegali $P = 0,05$.

V naslednjem koraku smo s pomočjo t-testa primerjali povprečne vrednosti koncentracij posameznih parametrov med naslednjimi skupinami rezultatov:

- direktni bilirubin (potrjena diagnoza) - direktni bilirubin (negativna diagnoza);
- celokupni bilirubin (potrjena diagnoza) – celokupni bilirubin (negativna diagnoza);
- žolčne kisline (potrjena diagnoza) – žolčne kisline (negativna diagnoza).

Tudi pri t-testu smo si postavili dve hipotezi:

- H_0 : $P > 0,05$ kar pomeni, da pridobljeni rezultati nimajo medsebojnega vpliva;
- H_1 : $P < 0,05$ kar pomeni, da pridobljeni rezultati imajo medsebojni vpliv.

Vrednost P, ki jo dobimo ob izračunu t-testa, si lahko razložimo:

$$P_{\text{cel.bil.}} = 0,007$$

Izračunani rezultati nam povedo, da obstaja statistično pomembna razlika v koncentraciji celokupnega bilirubina med skupino žensk s pozitivno diagnozo in ženskami z negativno diagnozo ICHP. Torej lahko ničelno domnevo zavržemo ($P < 0,05$), kar pomeni, da so rezultati pri skupini s potrjeno diagnozo statistično značilno različni (višji).

$$P_{\text{dir.bil.}} = 0,003$$

Izračunani rezultati nam povedo, da je statistično pomembna razlika v koncentraciji direktnega bilirubina med skupino žensk s potrjeno diagnozo in ženskami z nepotrjeno diagnozo. Iz tega razloga lahko torej ničelno domnevo zavržemo ($P < 0,05$), kar pomeni, da so rezultati pri skupini s potrjeno diagnozo statistično značilno različni (višji).

$$P_{\text{žol. kis.}} = 0,01$$

Izračunani rezultati nam povedo, da je statistično pomembna razlika v koncentraciji žolčnih kislin med obema preiskovanima skupinama. Torej lahko tudi tukaj ničelno domnevo zavržemo ($P < 0,05$) in sprejmemo hipotezo, ki pravi, da do rezultati pri skupini s potrjeno diagnozo statistično značilno različni (višji).

Na koncu smo izračunali še klinično oziroma diagnostično občutljivost in specifičnost žolčnih kislin, celokupnega in direktnega bilirubina.

SPECIFIČNOST

Diagnostična specifičnost v našem primeru predstavlja skupino preiskovank, ki nimajo potrjene diagnoze ICHP in imajo normalno koncentracijo celokupnega BIL, direktnega BIL oziroma žolčnih kislin. To pomeni, da je npr. direktni bilirubin tem bolj specifičen kazalec pri ICHP, čim manjkrat je prisoten pri ženskah brez potrjene diagnoze ICHP. V našem primeru je bila specifičnost direktnega BIL 86,57 %, kar lahko interpretiramo, da v 86,57 % direktni BIL ni prisoten pri ženskah brez ICHP. Pri direktnem bilirubinu je bilo 13,34 % lažno pozitivnih rezultatov, pri ženskah, ki niso imele ICHP. Rezultat ne pomeni, da ženske v resnici niso imele povišane koncentracije direktnega BIL, saj so lahko imele katero drugo obolenje, pri katerem se koncentracija direktnega BIL poviša (vse ostale bolezni jeter in žolčnika).

Diagnostična specifičnost celokupnega bilirubina je bila 97,01 %, kar pomeni, da smo dobili 2,99 % lažno pozitivnih rezultatov.

Diagnostična specifičnost žolčnih kislin je bila 79,10 %, kar pomeni, da smo dobili 20,90 % lažno pozitivnih rezultatov.

OBČUTLJIVOST

Klinična občutljivost (npr. žolčnih kislin) nam pove, pri kolikšnem deležu žensk, ki imajo IHCP, je koncentracija žolčnih kislin povišana. Čim večji je delež bolnic z IHCP, pri katerih je koncentracija povišana, tem bolj občutljiv je parameter.

Občutljivost celokupnega bilirubina je bila 66,67 %. Ta vrednost pomeni, da je koncentracija celokupnega bilirubina povišana samo pri 66,67 % bolnic z IHCP, medtem ko ima lahko preostalih 33,33 % žensk prav tako prisotno IHCP, čeprav so vrednosti pod referenčnim območjem.

Klinična občutljivost direktnega bilirubina je bila 88,89 %.

KORELACIJA

Izračunali smo, kakšna je korelacija med celokupnim bilirubinom in žolčnimi kislinami ter med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami. Vrednost korelacijskega koeficienta je vrednost med -1 in 1. Čim bližje je izračunan rezultat korelacijskega koeficienta -1 in 1, tem bolj zanesljivo lahko iz vrednosti ene spremenljivke napovemo vrednost druge. Če je rezultat bližje 0, nam vrednost ene spremenljivke ne pomaga pri napovedi vrednosti druge. V našem primeru smo izračunali korelacijski (Pearsonov) koeficient pri celokupnem bilirubinu in žolčnih kislinah, ki je bil 0,494, kar pomeni, da je korelacija srednje visoka. Korelacijski (Pearsonov) koeficient pri direktnem bilirubinu in žolčnih kislinah je 0,558, kar prav tako pomeni, da je korelacija srednje visoka. Iz tega sledi, da lahko na podlagi pridobljene ene spremenljivke (direktni ali celokupni bilirubin) relativno solidno napovemo vrednost druge (žolčne kisline).

6 SKLEP

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšna je korelacija rezultatov med koncentracijo celokupnega bilirubina in žolčnimi kislinami ter kolikšna je korelacija med direktnim bilirubinom in žolčnimi kislinami. Na podlagi statističnih izračunov lahko zaključimo naslednje:

1. S statističnim t-testom smo potrdili, da se rezultati celokupnega, direktnega bilirubina in žolčnih kislin pri ženskah s potrjeno diagnozo in ženskah z nepotrjeno diagnozo ICHP med seboj statistično razlikujeta. To pomeni, da so vrednosti potrjenih diagnoz ICHP statistično višje od žensk s nepotrjeno diagnozo ICHP.
2. Koeficient korelacije med celokupnim bilirubinom ter žolčnimi kislinami je 0,494. Koeficient korelacije med direktnim bilirubinom te žolčnimi kislinami je 0,558. Torej smo pridobili precej podobno korelacijo za obe skupini, ki jo lahko interpretiramo kot srednje visoko.

7 LITERATURA

1. Kocjančič A, Mrevlje F: Interna medicina, DZS, Ljubljana, 1998.
2. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009.
3. Begley M, Cormac G M G, Hill C: The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 2005; 29: 625–651.
4. Takashi I, Yoshikazu E, Shin-Ichi I: Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin. *Biochimica e Biophysica Acta* 1998; 1407; 173–184.
5. Kos T, Pivk B: Osnove laboratorijske biokemije I. Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Ljubljana, 2005.
6. Kuoppala T, Tuimala R, Parviainen M, Koskinen T: Vitamin D and mineral metabolism in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur. J. Obstet Gynecol. Reprod. Biol.* 1986; 23: 45–51
7. http://www.gastrohep.com/ebooks/rodes/Rodes_2_3_6.pdf
8. Delvin T M: Textbook of biochemistry with clinical correlations (third edition). Wiley-Liss, New York, 1992.
9. Berginc K: Vpliv staranega etanolno-vodnega česnovnega ekstrakta na intestinalne in jetrne prenašalce ter jetrni encim citokrom 3A4, diplomska dizertacija, Univeza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 20–21
10. Levy M, Matthew N., Koeppen B M, Stanton B A: *Berne & Levy Principles of physiology* (fourth edition), Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006.
11. Agellon L B: *Metabolism and function of bile acids* 2002.
12. Lee N M, Brady C W: Liver disease in pregnancy. *World Journal of Gastroenterology* 2009; 15(8): 897–906.
13. Glantz A, Marschall H U, Lammert F, Mattisson L A: Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a Randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2005.
14. Frcog JC G: Obstetric cholestasis. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* 2006; 43.

15. Wilson J A P: Intrahepatic cholestasis of pregnancy with marked elevation of transaminases in a black American. *Digestive Diseases and Sciences* 1987; 31 (6): 665–668.
16. Lammert F, Marschall H U, Glantz A, Matern S: Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *Journal of Hepatology* 2000; 33: 1012–1021.
17. Kondrackiene J, Kupcinskas L: Itrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(38): 5781–5788.
18. Hardikar W, Kansal S, Elferink PJ O, Angus P: Intrahepatic cholestasis of pregnancy: When should you look further. *World Journal of Gastroenterology* 2009; 15(9): 1126–1129.
19. Geenes V, Williamson C: Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World Journal of Gastroenterology* 2009; 15 (17): 2049–2066.
20. OGCCU: Cholestasis in pregnancy. Women and newborn health service, King Edward Memorial Hospital 2010; November 2010: 1–5
21. Sinakos E, Lindor K D: Bile acid profiles in intrahepatic cholestasis of pregnancy: Is this the solution to the enigma of intrahepatic cholestasis of pregnancy? *Am J Gastroenteol* 2010; 105: 596–598.
22. Paumgartner G, Beuers U: Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: Mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002; September 2002: 525–531.
23. Pivk B: Analizna kemija instrumentalne analize. Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Ljubljana, 2001: 48–9