

Određivanje koncentracije žučnih soli in vitro

Barić, Borna

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:551234>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Borna Barić

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
ŽUČNIH SOLI *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2020.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Borna Barić

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
ŽUČNIH SOLI *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskoga fakulteta u Osijeku u sklopu projekta Sortna specifičnost pšenične trave (*Triticum aestivum* L.) s obzirom na sadržaj nutrijenata i nutraceutika HRZZ- UIP-05-2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima listova, tablice i slika

Prije svega najveću zahvalu dugujem mentorici, doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić, na trudu i volji da mi pomogne pri izradi završnoga rada u ovom specifičnom razdoblju koje je maksimalno ograničilo mogućnosti viđanja i poremetilo sve obveze u našem i njezinu životu.

Također želim zahvaliti i ostalim članovima Katedre koji su uz mentoricu omogućili da se praktični dio završnoga rada odradi prije cjelokupnoga zatvaranja Fakulteta.

Želim zahvaliti svojim kolegama koji su mi uvelike pomogli iako su se nalazili u istoj situaciji kao i ja i svojim prijateljima na strpljenju i kontinuiranoj potpori tijekom ovog razdoblja.

Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima i obitelji koji su me motivirali i podržavali tijekom svih godina mojega obrazovanja jer me njihova vjera u mene dovela do mjesta na kojemu sam sada.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Žučne kiseline | 1 |
| 1.1.1. Glavna obilježja i uloga | 1 |
| 1.1.2. Struktura žučnih kiselina | 1 |
| 1.1.3. Sinteza žučnih kiselina | 2 |
| 1.2. Žučne soli | 3 |
| 1.3. Važnost žučnih kiselina u dijagnozi i praćenju bolesti | 4 |
| 1.4. Uloga žučnih kiselina u trudnoći | 5 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 8 |
| 3.1. Materijali | 8 |
| 3.2. Metode | 10 |
| 3.3. Statističke metode | 12 |
| 4. REZULTATI | 13 |
| 4.1. Mjerenje apsorbancije | 13 |
| 4.2. Koncentracijski niz | 14 |
| 5. RASPRAVA | 16 |
| 6. ZAKLJUČAK | 18 |
| 7. SAŽETAK | 19 |
| 8. SUMMARY | 20 |
| 9. LITERATURA | 21 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 23 |

POPIS KRATICA

3- α -HSD (engl. *3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase*) 3-alfa hidroksteroid dehidrogenaza

ATP (engl. *adenosine triphosphate*) adenzin trifosfat

BA (engl. *bile acids*) žučne kiseline

BSEP (engl. *bile salt export pump*) crpka za prijenos žučnih soli

DCA (engl. *deoxycholic acid*) deoksikolna kiselina

ICP (engl. *intrahepatic cholestasis of pregnancy*) intrahepatična kolestaza u trudnoći

LCA (engl. *lithocholic acid*) litokolna kiselina

NADH (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen*) nikotinamid adenin dinukleotid koji prenosi vodik

TBA (engl. *total bile acids*) ukupne žučne soli

Tio-NAD⁺ (engl. *Thionicotinamide adenine dinucleotide*) tionikotinamid adenin dinukleotid

UDCA (engl. *ursodeoxycholic acid*) ursodeoksikolna kiselina

1. UVOD

1.1. Žučne kiseline

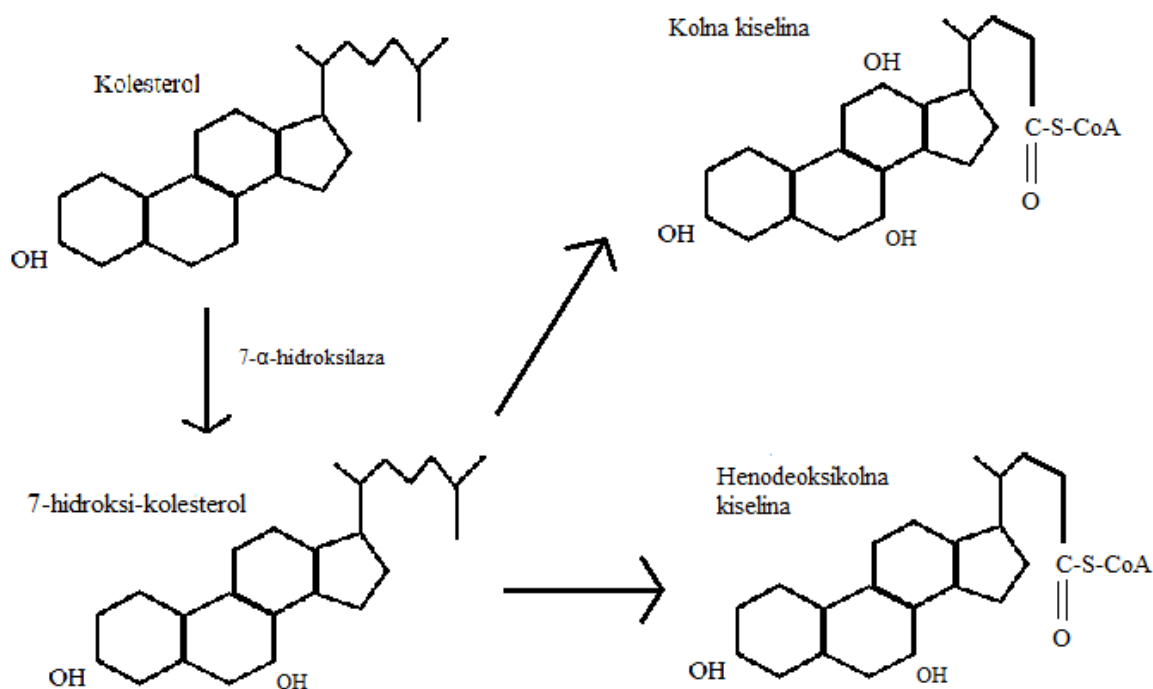
1.1.1. Glavna obilježja i uloga

Žučne kiseline (engl. *bile acids* – BA) skupina su steroida topljivih u vodi koji se sintetiziraju u hepatocitima jetara tijekom katabolizma kolesterola. Sintezom nastaju dva produkta – kolna (engl. *cholic acid* – CA) i henodeoksikolna kiselina (engl. *chenodeoxycholic acid* – CDCA), koje se nazivaju primarnim žučnim kiselinama. One se zatim konjugiraju, većinom s glicinom ili taurinom, kako bi nastale žučne soli. Žučne soli imaju važnu ulogu u probavi masti i vitamina topljivih u masti te kontroli apsorpcije u debelome crijevu, do kojega dolaze kroz žučni mjehur, žučovode i dvanaesnik. Žučne kiseline vrlo su citotoksične molekule te imaju mogućnost autoregulacije vlastite koncentracije u tijelu (1). Ta citotoksičnost može biti intracelularna (u hepatocitima kod kolestaze) i ekstracelularna (u debelome crijevu kod pacijenata s malapsorpcijom žučnih kiselina). Također imaju važnu ulogu u karcinogenezi nekih tkiva poput – jetara, žučnoga mjehura, gornjega i donjega dijela probavnoga sustava. Skladište se u žučnome mjehuru u iznimno visokim koncentracijama (> 300 mM), što se postiže konstantnim uklanjanjem vode i elektrolita. Otprilike 5 % tih žučnih kiselina odlazi u debelo crijevo i izlazi iz tijela u obliku fecesa. Budući da je prekursor žučnih kiselina kolesterol, to je jedini način na koji se kolesterol izlučuje iz tijela (u obliku žuči).

U žuči se osim kolesterola nalaze: bilirubin i ostali pigmenti nastali katabolizmom hema, teški metali poput bakra i željeza koji su u suvišku u tijelu, lipofilni steroidi i metaboliti lijekova koji su netopljivi u urinu (2).

1.1.2. Struktura žučnih kiselina

Žučne su kiseline ionski amfifilni spojevi sa steroidnim skeletom i sastoje se od četiriju prstenova. Tri prstena sadržavaju šest atoma ugljika, dok jedan prsten sadržava pet atoma ugljika. Konkavna je strana (α -strana) steroidnoga skeleta u molekuli žučne kiseline hidrofilna zbog prisutnosti OH skupina. Konveksna strana (β -strana) steroidnoga skeleta zbog svojih je metilnih skupina hidrofobna. Ta ih struktura čini različitom od tradicionalnih surfaktanata koji imaju polarnu glavu i dugački nepolarni rep (1, 3).



Slika 1. Strukturni prikaz sinteze primarnih žučnih kiselina (kolne i henodeoksikolne) iz kolesterola (vlastiti crtež)

1.1.3. Sinteza žučnih kiselina

Kolesterol hepatickom biotransformacijom prelazi u žučne alkohole ili žučne kiseline. Te strukture u jetrima prolaze kroz daljnju transformaciju sulfacijom ili amidacijom te se nastale žučne soli skladište u žuči. Postoje klasični i alternativni putovi sinteze primarnih žučnih kiselina. Klasični je put zaslužan za sintezu 90 % žučnih kiselina u organizmu. Glavni je enzim tog puta 7 α -hidroksilaza, citokrom P450 enzim koji pretvara kolesterol u 7 α -hidroksikolesterol. Hidroksikolesterol zatim se pretvara u henodeoksikolnu ili kolnu kiselinu reakcijom koju katalizira 12 α -hidroksilaza. Te se kiseline konjugiraju u žučne soli, koje će poslije biti potanko opisane (1, 3).

U debelome crijevu dekonjugacija konjugiranih primarnih žučnih kiselina odvija se s pomoću bakterijskih enzima i kao produkt nastaju slobodne žučne kiseline. Nadalje, enzimatsko djelovanje bakterijske flore pretvara te žučne kiseline u sekundarne žučne kiseline uklanjajući hidroksilnu skupinu sa sedmoga ugljikova atoma. Specifični enzim odgovoran za to jest 7-alfa dehidroksilaza, koja stvara deoksikolnu kiselinu (engl. *deoxycholic acid* – DCA) iz kolne kiseline i litokolnu kiselinu (engl. *lithocholic acid* – LCA) iz henodeoksikolne kiseline. Te sekundarne žučne kiseline zatim ulaze u portalnu venu i odlaze do jetara, gdje se pridružuju novim primarnim žučnim kiselinama, ponovno rekonjugiraju s glicinom ili taurinom i

skladište u žučni mjehur. Takvo recikliranje žučnih kiselina naziva se enterohepatička cirkulacija i može se dogoditi deset puta dnevno. Transport kroz kanalikularnu membranu jetara jest ATP-ovisan proces u kojemu sudjeluje i BSEP (engl. *bile salt export pump* – crpka za prijenos žučnih soli) na kanalikularnoj membrani (1).

Poremećaji u metabolizmu žučnih kiselina mogu biti prouzročeni nepravilnom biosintezom iz kolesterola i nepravilnom konjugacijom, nepravilnim transportom u hepatocite ili ilealne enterocite, nepravilnim transportom između organa i povećanom bakterijskom degradacijom tijekom enterohepatičke cirkulacije (2).

1.2. Žučne soli

Kao što je spomenuto, žučne su soli anioni žučnih kiselina nastali konjugacijom s glicinom ili taurinom preko njihovih NH₂ skupina (**Tablica 1.**). Konjugacija žučnih kiselina u soli povećava njihovu topljivost u vodi i onemogućuje njihov prolazak kroz membrane stanica crijeva. To osigurava da one ostanu u samome lumenu crijeva i eventualno dođu do koncentracije pri kojoj mogu formirati micelle koje omogućuju emulgaciju i apsorpciju lipida (1, 14). U ljudskoj žuči koncentracija glicinskih konjugata (75 %) mnogo je viša od koncentracije taurinskih konjugata (25 %). Žučne se soli kategoriziraju u tri skupine s obzirom na konjugaciju s aminokiselinama i stupanj hidroksilacije. Razlikujemo trihidroksi (taurokolat i glikokolat) i dihidroksi konjugate (glikodeoksikolat, glikohenodeoksikolat, taurohenodeoksikolat, taurodeoksikolat) te nekonjugirane oblike (kolat, deoksikolat, henodeoksikolat). Otprilike 60 % ljudskih žučnih soli jesu u dihidroksi skupini. Dihidroksi i trihidroksi žučne soli omogućuju topljivost netopljivih lipida poput fosfolipida, monoglicerida i alkilnih alkohola dugačkih lanaca (3).

Tablica 1. Popis značajnih žučnih soli konjugiranih s glicinom i taurinom (vlastita tablica)

| Naziv žučne soli | Vrsta žučne soli |
|--------------------------------------|-------------------|
| Glikokolna kiselina | Gliko-konjugirana |
| Glikohenodeoksikolna kiselina | Gliko-konjugirana |
| Glikodeoksikolna kiselina | Gliko-konjugirana |
| Glikolitokolna kiselina | Gliko-konjugirana |
| Glikoursodeoksikolna kiselina | Gliko-konjugirana |
| Taurokolna kiselina | Tauro-konjugirana |
| Taurohenodeoksikolna kiselina | Tauro-konjugirana |
| Taurodeoksikolna kiselina | Tauro-konjugirana |
| Taurolitokolna kiselina | Tauro-konjugirana |
| Tauroursodeoksikolna kiselina | Tauro-konjugirana |

1.3. Važnost žučnih kiselina u dijagnozi i praćenju bolesti

Žučne kiseline ubrajamo među jedne od prvih prirodnih produkata izoliranih u čistome obliku. Takve ih izoliramo iz žuči u žučnome mjehuru, gdje se nalaze u visokim koncentracijama. Razumijevanje funkcije tih amfipatskih molekula zaokuplja fiziologe posljednjih sto godina. Trenutačno je njihova fiziološka funkcija u jetrima i crijevima barem donekle razjašnjena. Ključna uloga koju žučne kiseline imaju u metabolizmu kolesterola dovela je do novih načina tretiranja bolesnika s hiperkolesterolemijom. U isto vrijeme postalo je jasno da one imaju ulogu i u jetrenim, žučnim i crijevnim bolestima. Tri žučne kiseline prisutne u ljudskoj žuči visoko su toksične i opasnost su za stanice oko sebe u abnormalno visokim koncentracijama. Ursodeoksikolna kiselina, prirodna žučna kiselina koju nalazimo u medvjedima, pokazala se sigurnom i učinkovitom za liječenje kolestatske bolesti jetara (2, 12). Koncentracije žučnih kiselina u serumu značajan su mjerni parametar pri dijagnozi hepatobilijarnih bolesti, začepljenja jetrenih vena, nekonjugirane hiperbilirubinemije i

mnogih drugih (4, 12). Povišene unutarstanične razine žučnih kiselina povezuju se s oksidativnim stresom i apoptozom u odraslim i fetalnim jetrima te je dokazano kako su karcinogene (8, 12). Danas mjerenje koncentracije žučnih kiselina u serumu podrazumijeva mjerenje koncentracije više od dvadeset različitih žučnih kiselina sintetiziranih u jetrima koje modificira crijevna bakterijska flora (6). Postoji značajna korelacija između povišenih razina žučnih kiselina i bilirubina u serumu, no bez velike važnosti u diferencijalnoj dijagnostici jetrenih bolesti (5). Povišene razine žučnih kiselina u serumu zabilježene su i kod drugih stanja poput crijevnih bolesti, no za razliku od pacijenata s jetrenim bolestima, crijevna oboljenja obilježava porast nekonjugiranih žučnih kiselina (4). Točnije, kod bolesnika s jetrenim bolestima čija je razina ukupnih žučnih kiselina u serumu viša od 50 $\mu\text{mol/L}$, čak 88 % njih je konjugirano. Kada govorimo o stupnju hidroksilacije, dijagnostički je značajno kako je omjer trihidroksi i dihidroksi kolne kiseline dvostruko veći kod pacijenata s opstruktivnom žuticom nego kod pacijenata s cirozom jetara (5). Žučne kiseline također su značajne u praćenju virusnoga hepatitisa, pogotovo u fazi u kojoj se svi ostali jetreni parametri vraćaju u normalu te su zbog toga vrlo dobar parametar za praćenje odgovora na terapiju bolesnika s aktivnom kroničnom jetrenom bolešću (4). Do sada nisu pronađene značajne razlike u serumskim koncentracijama žučnih kiselina s obzirom na spol i dobnu skupinu (6, 13).

1.4. Uloga žučnih kiselina u trudnoći

Trudnoća je stanje u kojemu tijelo prolazi ekstenzivne metaboličke i fiziološke prilagodbe. Zbog toga postojeće bolesti i stanja mogu biti aktivirani te se povećava rizik za pogoršanje postojećih i razvoj novih oboljenja (7). Ne postoje specifične referentne vrijednosti za žučne kiseline u trudnoći te se normalnim rasponom smatra 0 – 10 $\mu\text{mol/L}$ kao i kod obične populacije (8). Kolestatske bolesti, čije je obilježje suprafiziološki porast koncentracija žučnih kiselina, zahtijevaju pažljivo nadziranje tijekom trudnoće. Najčešći poremećaj žučnih kiselina u trudnoći jest ICP (engl. *intrahepatic cholestasis in pregnancy* – intrahepatična kolestaza u trudnoći). ICP je stanje specifično za trudnoću s multifaktorijskom etiologijom, koja uključuje okolišni i hormonski utjecaj u genetički podložnih žena (7). Genetičke predispozicije mogu podrazumijevati morfološke promjene staničnih membrana žučnih kanala i hepatocita, disfunkciju žučnih kanalikularnih transportera, mutacije jetrenih fosfolipidnih transportera, aminofosfolipidnih transportera te crpke za prijenos žučnih soli (BSEP) (10). Postoje jasne etničke varijacije i stanje je češće kod žena s višestrukim

trudnoćama te žena starijih od 35 godina (8). Može se pojaviti već od sedmoga gestacijskog tjedna, ali je najčešća u trećem tromjesečju trudnoće. Očituje se perzistentnim i generaliziranim svrbežom te suprafiziološkom elevacijom žučnih kiselina i jetrenih transaminaza u serumu. Također se povezuje s iregularnim nalazima lipida u majke i povećanim rizikom za razvoj gestacijskoga dijabetesa. Moguće su komplikacije spontani preuranjeni porođaj, fetalna hipoksija, mrtvorodenje, plodova voda onečišćena mekonijem, perinatalna smrt. Rizik za takve ishode iznimno je povećan kod majki čija je razina žučnih kiselina u serumu $\geq 40 \mu\text{mol/L}$ (7). Istraživanja su pokazala kako se taj rizik povećava 1 % – 2 % za svaki $\mu\text{mol/l}$ žučnih kiselina u serumu (9). Komplikacije prouzročene ICP-om kumulativno dovode do nakupljanja hidrofobnih žučnih kiselina koje su hepatotoksične za fetus. Nemogućnost pravilnoga izbacivanja tih kiselina i smanjeni transport kroz placentu može dovesti do fetalne kardiotoksičnosti, disritmije i iznenadne smrti fetusa (10, 13).

Zbog toga se ICP najčešće liječi relativno hidrofilnom ursodeoksikolnom žučnom kiselinom. Istraživanja su pokazala kako UDCA parcijalno smanjuje koncentraciju žučnih kiselina u majčinome i fetalnome serumu, smanjuje koncentraciju progesteronskih disulfata u urinu i smanjuje koncentraciju progesteronskih metabolita u serumu majke. UDCA također utječe na omjer žučnih kiselina konjugiranih s taurinom i glicinom povećavajući proporciju onih konjugiranih s glicinom, što ima zaštitnu ulogu za fetalno srce (7). Učinci ICP-a na majku većinom su benigni. Uz tretiranje svrbeža katkad je potrebno tretirati vrtoglavicu, anksioznost i malapsorpciju masti i vitamina topljivih u masti. Takve su žene također pod strožim liječničkim nadzorom zbog podložnosti na srodne bolesti (10). Još neki poremećaji žučnih kiselina u trudnoći jesu primarni bilijarni kolangitis, primarni sklerozirajući kolangitis, bilijarna atrezija, „Alagille” sindrom i nasljedni kolestatski sindromi (7, 15).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Odrediti koncentracije žučnih soli u različitim uzorcima kako bi se moglo optimirati koncentraciju žučnih soli radi njihove primjene u metodi *in vitro* digestije.

3. MATERIJALI I METODE

Ustroj studije

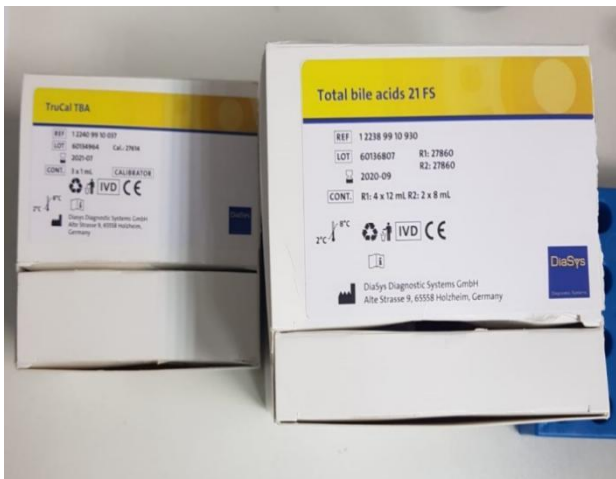
Istraživanje je ustrojeno kao presječno istraživanje odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Ur.broj 2158-61-07-20-94) u lipnju 2020 godine.

3.1. Materijali

Kemikalije:

- Žučne soli (Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države)
- Unitrol I i Unitrol II komercijalni kontrolni serumi
- Radni serum 1 i 2
- Total bile acids 21 FS komercijalni komplet
- TrueCal TBA kalibrator (46,1 $\mu\text{mol/L}$)
- 0,9 %-tna otopina NaCl (fiziološka otopina)

Za analizu je primijenjen komplet za određivanje ukupnih žučnih soli u serumu. Naziv je kompleta Total bile acids (TBA) 21 FS proizvođača DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Njemačka. Komplet sadržava dva reagensa (**Slika 2.a**). Prvi reagens (R1) sastoji se od pufera i tio-NAD u koncentraciji $> 0,1 \text{ mmol/L}$. Drugi reagens (R2) sastoji se od pufera i 3- α -HSD u koncentraciji $> 2 \text{ KU/L}$.



DE

Slika 2. a) kutija komercijalnoga kompleta (Total bile acids 21 FS) za primjenu metode i kalibratora (TruCal TBA); **b)** uzorci žučnih soli (lijevo), Unitrol I i II kontrolni serumi (sredina) i komercijalna goveđa žuč proizvođača Sigma-Aldrich (desno)

Za mjerenje apsorbancije u uzorcima primijenjen je Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrometar (**Slika 3.**). Analiza je obavljena prema uputi proizvođača mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 405 nanometara.



Slika 3. Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrometar kojim je mjerena apsorbancija u uzorcima na 405 nanometara

Analizirano je pet uzoraka. Dva komercijalno dostupna, svježe pripremljena seruma Unitrol I (normalni) i Unitrol II (patološki) (**Slika 2.b**). Skraćeno smo ih označili s N (normalni) i A (abnormalni). A serum dodatno je razrijeđen (1 + 5) te se koristimo njime kao dodatnim uzorkom. Uz svježe pripremljene rabimo i dva radna seruma označena sa S i K.

Uzorke žučnih soli pripremamo tako da iz pripravka žučnih soli koncentracije 10 mg/ml (**Slika 2.b**) radimo pet razrjeđenja s fiziološkom otopinom (1 : 1), kako je predočeno u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracijski niz žučnih soli

| <i>Uzorak</i> | <i>Koncentracija</i> (mg/mL) |
|---------------|---------------------------------|
| 1 | 10,0 |
| 2 | 5,0 |
| 3 | 2,5 |
| 4 | 1,25 |
| 5 | 0,625 |

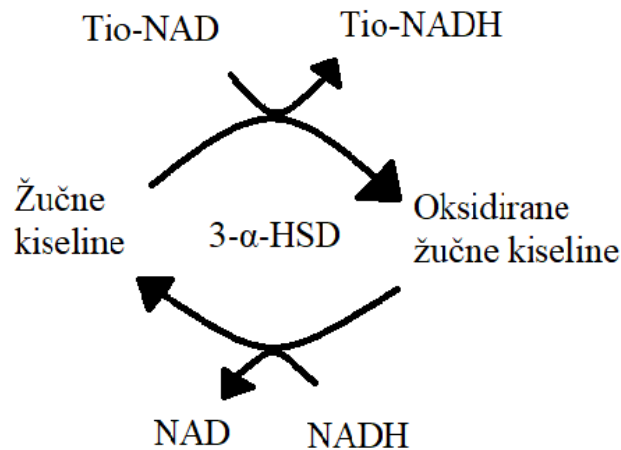
Kao kalibrator upotrijebili smo TrueCal TBA (**Slika 2.a**). To je liofilizirani kalibrator utemeljen na ljudskoj plazmi i sadržava biološke aditive ljudskoga podrijetla. Rabi se u testovima kvantitativnoga *in vitro* određivanja ukupnih žučnih kiselina na fotometrijskim uređajima.

Uzorci su pripremljeni u duplikatu, pri čemu je svako mjerenje provedeno u triplikatu: A₀, A₁ i A₂ (jer se zbog aktivnosti žučnih soli koncentracija mijenja) te je ukupni broj mjerenja 72.

3.2. Metode

Metoda koju primjenjujemo jest enzimatska ciklička metoda. U povijesti su se enzimatske metode za dokazivanje žučnih kiselina razvijale u nekoliko generacija, no prijašnje metode dokazale su se ili nedovoljno osjetljivima ili nedovoljno praktičnima za kliničku primjenu zbog procesa ekstrakcije velike količine seruma, skupe opreme i radioizotopa. Kako bi se procedura pojednostavnila, razvijena je ciklička enzimatska metoda kod koje se u prisutnosti NADH, tio-NAD⁺ i 3- α -HSD mjeri porast apsorbancije na 405 ili 660 nanometara od tio-NADH koji nastaje u reakciji na 37 °C. U prijašnjim se metodama enzim 3- α -HSD izolirao iz bakterije *Comamonas testosteroni*, no procedura je bila komplicirana i neučinkovita te je za tu metodu gen za 3- α -HSD izoliran i umetnut u *E. coli*. Rekombinirana 3- α -HSD ima izvrsnu katalitičku sposobnost u reverzibilnoj oksidoredukciji 3- α -hidroksisteroida, uključujući žučne kiseline. Načelo je reakcije, katalizirane od strane 3- α -HSD, da žučne kiseline reverzibilno

prelaze u oksidirani oblik. Taj se oksidoredukcijski proces ponavlja u prisutnosti tio-NAD⁺ i NADH. Koncentraciju ukupnih žučnih kiselina možemo odrediti iz količine tio-NADH (reduciranoga oblika tio-NAD⁺) koja se računa na temelju promjene apsorbancije u minuti na 405/660 nm. Prvi reagens sadržava 1,5 mmol/L tio-NAD⁺ u 0,1 mol/L glicina (pH 4,0), a drugi reagens sadržava 1,5 x 10⁴ U/L 3- α -HSD i 2 g/L NADH u 0,2 g/L dietanolaminskoga pufera (pH 9,0)



Slika 5. Grafički prikaz enzimatske cikličke metode primijenjene za određivanje koncentracije žučnih soli u serumu (vlastiti crtež)

Izračunano je da je vrijednost porasta apsorbancije na 405 nm linearna pri koncentracijama žučnih soli između 0,5 i 180 μ mol/L.

Kako bi se uočile moguće interferencije, dodane su mnoge supstancije koje bi mogle utjecati na rezultate, a nalaze se u krvi. Dodavanje do 680 μ mol/L bilirubina, 5 g/L hemoglobina, 11,3 mmol/L triglicerida, 500 mg/L askorbata i 15.000 U/L laktat dehidrogenaze nije utjecalo na rezultate mjerenja. Također su testirani i efekti antikoagulansa. Dodavanje do 2 g/L EDTA kalija, 200 mg/L natrij heparina ili 5 g/L natrijeva citrata nije utjecalo na rezultate mjerenja. Važno je napomenuti da ta i druge metode za mjerenje ukupnih žučnih kiselina nemaju sposobnost raspoznavanja o kojoj je žučnoj kiselini riječ. Žučne kiseline s glukuronskom ili sulfatnom skupinom nisu mjerene enzimatskom cikličkom metodom te je to važno uzeti u obzir pri dijagnozi određenih bolesti. U zdravih je ljudi postotak žučnih kiselina sa sulfatnom skupinom 10 %, no kod nekih stanja poput opstruktivne žutice može se povisiti na 80 % (11).

3.3. Statističke metode

Numerički podatci prikazani su aritmetičkom sredinom i prikazani tablično i grafički nakon obrade u programu Excel. Za usporedbu između pojedinih mjerenja primijenjena je linearna regresija. Podatci su analizirani s pomoću analitičkoga programa TIBCO Statistica 13.3.0. (TIBCO Software Inc, Palo Alto, SAD). Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje apsorbancije

Cilj mjerenja bio je izračunavanje promjene apsorbancije u tri mjerenja. Apsorbancija je mjerena minutu nakon prethodne. Iz promjene apsorbancije (ΔA) uzorka i kalibratora izračunali smo koncentraciju žučnih soli u uzorcima.

Prema preporuci proizvođača za izračunavanje ΔA koristili smo se dvjema formulama:

$$\Delta A = \frac{((A_2 - A_1) + (A_1 - A_0))}{2} \quad (1) \quad \text{ili} \quad \Delta A = \frac{A_2 - A_0}{2} \quad (2)$$

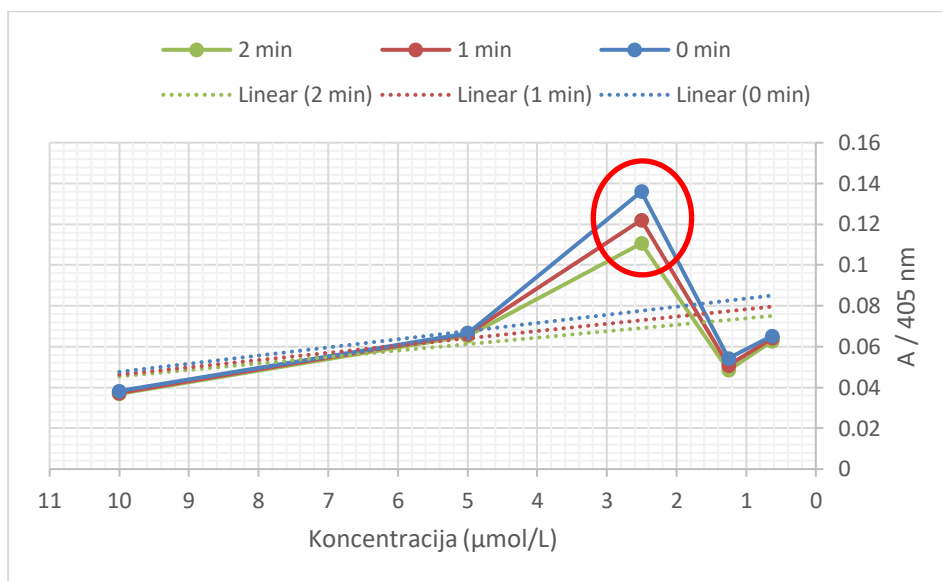
Obje su formule dale iste rezultate. Izračunane vrijednosti zatim su uvrštene u formulu za izračunavanje koncentracije žučnih soli u $\mu\text{mol/L}$, koja je navedena na uputama kompleta.

$$\frac{\Delta A / \text{min uzorka}}{\Delta A / \text{min kalibratora}} \times \text{conc. Cal} (\mu\text{mol/L})$$

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka kroz tri vremenske točke

| | <i>A/405 nm</i> | | | |
|-------------------|-----------------|--------|--------|-------|
| <i>Uzorci</i> | 0 min | 1 min | 2 min | Trend |
| <i>N</i> | 0,0434 | 0,0435 | 0,0436 | ↑ |
| <i>A</i> | 0,0640 | 0,0639 | 0,0638 | ↓ |
| <i>A dill</i> | 0,0977 | 0,0969 | 0,0961 | ↓ |
| <i>S</i> | 0,0453 | 0,0447 | 0,0445 | ↓ |
| <i>K</i> | 0,0637 | 0,0633 | 0,0721 | ↑ |
| <i>1</i> | 0,0383 | 0,0373 | 0,0369 | ↓ |
| <i>2</i> | 0,0667 | 0,0662 | 0,0652 | ↓ |
| <i>3</i> | 0,1360 | 0,1221 | 0,1106 | ↓ |
| <i>4</i> | 0,0543 | 0,0508 | 0,0485 | ↓ |
| <i>5</i> | 0,0653 | 0,0641 | 0,0628 | ↓ |
| <i>Kalibrator</i> | 0,0865 | 0,0878 | 0,0881 | ↑ |
| <i>Blank</i> | 0,0872 | 0,0883 | 0,0885 | ↑ |

4.2. Koncentracijski niz



Slika 6. Grafički prikaz pet uzoraka žučnih soli u tri vremenska intervala ovisno o njihovoj koncentraciji i izmjerenoj apsorbanciji.

Tablica 4. Koncentracija žučnih soli u analiziranim uzorcima seruma

| | N | A | A dill | S | K |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Koncentracija (µmol / L) | 22,8 ^a | 33,39 ^{a, b} | 50,29 ^{b*} | 23,28 ^c | 37,71 ^{c*} |

a – usporedba N i A; $P < 0,05$

b – usporedba A i A dill; $P < 0,05$

c – usporedba S i K; $P < 0,05$

5. RASPRAVA

Velik broj studija tijekom godina upućuje na važnu ulogu žučnih kiselina u dijagnozi i praćenju jetrenih, crijevnih i bolesti koje zahvaćaju žučni mjehur i žučovode. Kao jedan od parametara koji se ne povećava u zdravoj trudnoći, ne može se isključiti njihova važnost pri dijagnozi poremećaja poput kolestatske bolesti te na taj način ukloniti prijetnju za trudnicu i njezin plod. Zbog toga je bitno pronaći idealnu metodu koja se može primjenjivati u rutinskoj dijagnostici tih bolesti i koja neće biti vremenski prezahtjevna ili preskupa. Komplet koji je primijenjen u ovom istraživanju (**Slika 2.a**) uveden je u uporabu krajem 2019. godine i u trenutku njegove primjene u svrhu ovoga rada bio je na tržištu samo dva mjeseca te je zbog njegove novosti u kliničkoj primjeni primarni cilj istraživanja bio ustanoviti njegovu pouzdanost i linearnost u mjerenju žučnih soli.

Zbog toga su pripremljeni različiti uzorci kojima je testirana kvaliteta metode pri izračunavanju različitih koncentracija žučnih soli u serumu, od normalnih do iznimno povišenih koncentracija. Za svaki uzorak načinjene su dvije kopije kako bi se uočilo postoje li značajnije razlike u uzorcima istih koncentracija u različito vrijeme. Svaki je uzorak izmjeren tri puta, minutu nakon prijašnjega mjerenja, kako bismo testirali osjetljivost metode na male promjene u koncentraciji te apsorbanciji nakon tih vremenskih intervala. Ta je promjena u apsorbanciji uzoraka i kalibratora primijenjena u formuli za izračunavanje koncentracije žučnih soli. Rezultati mjerenja pokazali su kako je većina uzoraka imala silaznu putanju u apsorbanciji, pri čemu je rezultat drugoga mjerenja bio manji od prvoga, a rezultat trećega mjerenja manji od drugoga. Prema načelu metode cirkularna enzimaska reakcija trebala bi dovesti do suprotnoga učinka i pojačavati signal. To se u našim mjerenjima dogodilo kod samo četiriju uzoraka: kalibrator, blank (koji je čisti reagens) te dvaju uzoraka seruma N i K (**Tablica 3.**).

Analizom koncentracijskoga niza pet uzoraka s različitim početnim masenim koncentracijama žučnih soli dobili smo neočekivane rezultate budući da njihove završne koncentracije u $\mu\text{mol/L}$ ne prate niz koji su pratile njihove početne masene koncentracije. Pad apsorbancije je neočekivan posebice jer se radi o poznatim koncentracijama žučnih soli. Mogući razlog za pad apsorbancije je niska koncentracija uzoraka. Proizvođač u specifikacijama novih kemikalija, odnosno kita 21 FS, nije naveo najnižu granicu detekcije te je nastali niz naš slobodni odabir. Na osnovu dobivenih rezultata možemo pretpostaviti da je osjetljivost i granica detekcije 21 FS kita za određivanje žučnih soli znatno viša od 10 mg/

mL, što je bila najviša koncentracija našeg standardnog niza. U prilog navedenoj pretpostavci govore rezultati pet analiziranih uzoraka seruma u kojima je izmjerena koncentracija žučnih soli viša od 10 mg/ mL .

Provedena pilot studija upućuje na potrebu za znatno većim broj uzoraka kako bi se mogli izvesti pravi zaključci o 21 FS kitu, njegovoj osjetljivosti i granici detekcije pri određivanju koncentracije žučnih soli.

Statističkom usporedbom rezultata utvrđeno je kako pri statističkoj značajnosti postavljenoj na $P < 0,05$ dva uzorka pokazuju statistički značajnu razliku u promjeni apsorbancije, a to su serum A dill u usporedbi sa serumom A i serum K u usporedbi sa serumom S (označeni * u **Tablici 4**)

6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem dolazimo do sljedećih zaključaka:

- 21 FS kit je potrebno dodatno evaluirati jer je novi na tržištu
- Donja granica detekcije nije utvrđena i pripremljeni koncentracijski niz nije dao odgovarajuće rezultate
- Primjena 21 FS kita nije nam dala siguran odgovor o točnim koncentracijama žučnih soli u uzorcima seruma

7. SAŽETAK

UVOD: Žučne kiseline završni su produkti katabolizma kolesterola. Njihova se sinteza odvija u jetrima, a skladište se u žučnome mjehuru, gdje se uguste i konjugacijom s glicinom ili taurinom tvore žučne soli. Razina ukupnih žučnih kiselina vrlo je osjetljiv marker jetrene funkcije te se zbog toga često primjenjuje za dijagnozu i praćenje jetrenih, crijevnih i žučnih bolesti. Također su značajne za dijagnozu jetrenih bolesti kod trudnica.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Odrediti koncentracije žučnih soli u različitim uzorcima kako bi se mogla optimirati koncentracija žučnih soli radi njihove primjene u metodi *in vitro* digestije.

NACRT STUDIJE: Presječno istraživanje

MATERIJALI I METODE: Za mjerenje žučnih soli primijenjen je Total bile acids 21 FS komercijalni komplet. Apsorbancija je mjerena na deset različitih uzoraka te kalibratoru i blank probi na 405 nanometara u spektrofotometru. U uzorcima su dva komercijalna seruma – Unitrol I i Unitrol II te dva radna seruma. Svaki je uzorak načinjen u dvije kopije i mjereno u triplikatu s razmakom od minute između svakog mjerenja. Metoda na kojoj se zasniva komplet jest enzimatska ciklička metoda temeljena na aktivnosti enzima 3- α -hidroksisteroid dehidrogenaze.

REZULTATI: Kod većine uzoraka vrijednosti apsorbancije smanjuju se ovisno o vremenu, no Unitrol I normalni serum, radni serum K, blank i kalibrator odstupaju od toga.

ZAKLJUČAK: Potrebna je daljnja evaluacija kita zbog njegove novosti na tržištu. Naše istraživanje nije dalo siguran odgovor o doljnoj granici detekcije metode i koncentraciji žučnih soli u uzorcima.

KLJUČNE RIJEČI: određivanje koncentracije *in vitro*; promjena apsorbancije; žučne kiseline; žučne soli.

8. SUMMARY

DETERMINATION OF BILE SALTS CONCENTRATION IN VITRO

INTRODUCTION: Bile acids are the final products of cholesterol catabolism. They are synthesized in the liver and stored in the gallbladder where they conjugate with either glycine or taurine to create bile salts. Total bile acid levels are a sensitive marker of liver function and they are often used in diagnosis of hepatic, intestinal and biliary diseases. They are also useful in diagnosing hepatic diseases in pregnant women.

OBJECTIVES: The aim of this study was to determine the concentrations of bile salts in different samples to enable the optimisation of the bile salt concentration so we could apply them in the method of in vitro digestion.

STUDY DESIGN: Cross sectional study

MATERIALS AND METHODS: We used the Total bile acids 21 FS commercial kit to measure the bile salt concentrations. Absorbance was measured on 10 different samples, the calibrator and the blank sample. They were measured on the spectrophotometer with the wavelength set to 405 nanometers. The samples included two commercial serums- Unitrol I and Unitrol II and two work serums. Each sample was created in two copies and each copy was measured three times with one minute intervals between measurements. The kit is based on an enzymatic cycling method which is based on the activity of the 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme.

RESULTS: Most of the samples follow a decreasing trendline in absorbances depending on time that passed. However, the Unitrol I serum, serum K, the blank and the calibrator defy that trendline.

CONCLUSION: A further evaluation of the kit is required due to it being very new to the market. Our research did not provide definite results on the methods lower limit of detection and measured concentrations in the samples.

KEY WORDS: bile acids; bile salts; change of absorbance; in vitro concentration determination

9. LITERATURA

1. Stamp D and Jenkins G. An overview of bile acid synthesis, chemistry and function. In *Bile Acids: Toxicology and Bioactivity* eds. Jenkins G and Hardie LJ. Royal Society of Chemistry. 2008. DOI 10.1039/9781847558336-00001
2. Hoffman AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch. Intern. Med.* 1999;159:2467-2658
3. Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. *Molecules.* 2015;20(8):14451-14473. Published 2015 Aug 10. doi:10.3390/molecules200814451
4. Barnes S et al. Diagnostic value of serum bile acid estimations in liver disease. *J Clin Pathol.* 1975;28(6):506-9
5. Neale G et al. Serum bile acids in liver disease. *Gut.* 1971.; 12, 145-152.
6. Luo L et al. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLoS One.* 2018;13(3).
7. Pataia V, Dixon PH and Williamson C. Pregnancy and bile acid disorders. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2017;313(1): G1-G6
8. Egan N et al. Reference standard for serum bile acids in pregnancy. *BJOG* 2012;119:493-498
9. Glantz A, Marschall HU and Mattson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology* 2004;40:467-74.
10. Ozkan S, Ceylan Y, Ozkan OV, Yildirim S. Review of a challenging clinical issue: Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(23):7134-41
11. Zhang GH et al. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;21(23):7134-41
12. Dufour DR. Liver Disease. In: Burtis CA, Ashwood ER, and Bruns DE eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. 2006. p. 1782-1787.
13. Charach G et al. Diminished bile acids excretion is a risk factor for coronary artery disease: 20-year follow up and long term outcome. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2017;11, 1-11

14. Malik NA. Solubilization and Interaction Studies of Bile Salts with Surfactants and Drugs: a Review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016 ;179(2):179-201.
doi:10.1007/s12010-016-1987-x
15. Browns RS. Use of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cholangitis. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;14(11):654-657.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Borna Barić

Datum rođenja: 12.12.1998.

Adresa: Kalnička 40, 31 000 Osijek

E-mail: bornaaab@gmail.com

Broj mobitela: 095 380 1888

OBRAZOVANJE

2017. – 2020. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij
 Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2013. – 2017. II. gimnazija Osijek

2005. – 2013. Osnovna škola “Grigor Vitez” Osijek

OSTALE AKTIVNOSTI:

- predsjednik humanitarnoga Leo kluba Meridijan Osijek