

# Ispitivanje interferencije askorbinske kiseline i glukoze pri određivanju analita u mokraći

---

**Mašković, Sara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:526560>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sara Mašković

**Ispitivanje interferencije askorbinske kiseline i  
glukoze pri određivanju analita u mokraći**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

## Zahvala

*Najprije želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Nore Nikolac Gabaj na pomoći, svakom savjetu i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Posebnu zahvalu želim dati Matiji na velikoj podršci koju mi je pružao tijekom čitavog studija. Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na svakom trenutku koji su bili uz mene, a posebno baki koja se pred svaki ispit stresirala više nego ja. Zahvaljujem i svojim kolegama s faksa na svakoj pomoći, podijeljenoj skripti i zajedničkom učenju, a hvala i mojoj ekipi iz sportske koji su začinili ovu petu i učinili ju malo zabavnijom.*

# Sadržaj

1	UVOD .....	1
1.1	Mokraća.....	1
1.1.1	Sastav mokraće.....	3
1.1.2	Mokraća kao uzorak .....	3
1.2	Pretrage u mokraći.....	3
1.3	Klinički značaj biokemijskih pretraga u mokraći.....	5
1.4	Predanalitički čimbenici određivanja pretraga u mokraći .....	10
1.5	Interferencije u mokraći .....	12
1.5.1	Interferencija askorbinske kiseline .....	14
1.5.2	Interferencija glukoze .....	16
2	OBRAZLOŽENJE TEME.....	18
3	MATERIJALI I METODE.....	20
3.1	Priprema poola mokraće.....	20
3.2	Priprema uzoraka s interferencijama .....	20
3.3	Metode mjerenja.....	22
3.4	Statistička obrada podataka .....	24
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1	Rezultati.....	26
4.1.1	Rezultati ispitivanja interferencije askorbinske kiseline .....	26
4.1.2	Utjecaj interferencije askorbinske kiseline na pretrage u mokraći.....	28
4.1.3	Rezultati ispitivanja interferencije glukoze .....	33
4.1.4	Utjecaj interferencije glukoze na pretrage u mokraći.....	35
4.2	Rasprava .....	40
4.2.1	Askorbinska kiselina .....	40
4.2.2	Glukoza .....	41
5	ZAKLJUČAK .....	42
6	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	43
7	LITERATURA .....	44
8	SAŽETAK.....	46
	SUMMARY .....	47
9	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	
	BASIC DOCUMENTATION CARD .....	

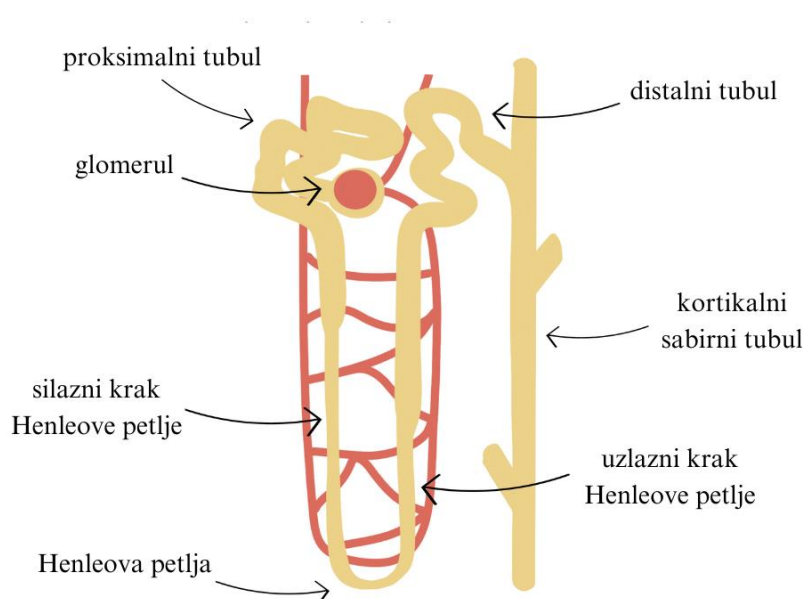
# 1 UVOD

## 1.1 Mokraća

Mokraća je tekućina kojom se iz organizma izlučuju voda, organske i anorganske endogene i egzogene tvari (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Stvaranje mokraće primarna je funkcija izlučivanja bubrega (Brunzel, 2018).

Bubreg je glavni organ mokraćnog sustava (Nikolac Gabaj i sur., 2019). To je parni organ, graholikog oblika, koji se nalazi na stražnjoj strani trbušnog zida u području retroperitoneuma (Brunzel, 2018). Jedna od najvažnijih funkcija bubrega u ljudskom je organizmu reapsorpcija hranjivih tvari te izlučivanje otpadnih i štetnih tvari mokraćom, što čini filtriranjem sadržaja iz krvi (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Bubrezi su građeni od mnoštva stanica koje se nazivaju nefroni (Guyton, 1995). Nefron se sastoji od pet različitih dijelova, od kojih svaki ima važnu ulogu u formiranju i konačnom sastavu mokraće (Brunzel, 2018). Građen je od glomerula na koji se nastavlja proksimalni tubul, silazni i uzlazni krak Henleove petlje, distalni tubul i kortikalni sabirni tubul (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Stvaranje mokraće sastoji se od nekoliko povezanih procesa, a u tim procesima bubrezi imaju važnu ulogu u uklanjanju metaboličkih otpadnih produkata, regulaciji vode i elektrolita i održavanju acidobazične ravnoteže tijela (Brunzel, 2018).



Slika 1 Shematski prikaz građe nefrona

Osnovni mehanizam kojim nefron uklanja nepoželjne tvari iz krvne plazme sastoji se od tri koraka. Najprije se kroz glomerularnu kapilarnu membranu velik dio plazme koja protječe glomerulom filtrira u tubularni sustav nefrona. Zatim, dok filtrat protječe kroz kanaliće, tvari koje su organizmu potrebne, poput vode i većine elektrolita, reapsorbiraju se u plazmu peritubularnih kapilara, odnosno vraćaju se u krv. Nepoželjne se tvari ne apsorbiraju već taj dio filtrata izravno prelazi u mokraću (Guyton, 1995).

Glomerul se sastoji od sloja kapilara okruženog tankim slojem epitelnih stanica poznatih kao Bowmanova kapsula (Brunzel, 2018). Nakon izlaska iz Bowmanove kapsule glomerularni filtrat dolazi do proksimalnog tubula u kojem se u potpunosti reapsorbiraju glukoza i aminokiseline, a zajedno s vodom reapsorbira se i više od trećine kalijevih, bikarbonatnih, natrijevih i kloridnih iona te polovina ureje i uratnih iona. U proksimalnom tubulu također dolazi do sekrecije amonijaka i pojedinih lijekova te malog dijela uratnih iona i kreatinina. Nakon proksimalnog tubula, filtrat putuje silaznim pa uzlaznim krakom Henleove petlje. Silazni je krak propustan za vodu što uzrokuje izlazak vode u medularni prostor i ukoncentriravanje filtrata, a u uzlaznom kraku natrijevi i kloridni ioni izlaze iz tubula i filtrat se opet razrjeđuje. U distalnom se tubulu pod utjecajem aldosterona reapsorbiraju natrijevi i kloridni ioni uz gotovo sve bikarbonatne ione, dok kalijevi i vodikovi ioni procesom sekrecije ulaze u tubul. U kortikalnom sabirnom tubulu reapsorbiraju se natrijevi i kloridni ioni te ureja (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

U glomerularni filtrat prolazi većina komponenata iz krvi (osim krvnih stanica i većine proteina) pa se tako glomerularni filtrat sastoji od vode, glukoze, aminokiselina i anorganskih iona. Osim hranjivih tvari, u glomerularni filtrat prolaze i otpadni produkti kao što su ureja i kreatinin, a ovo je način izlučivanja i za neke lijekove i otrove (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Drugi način kojim nefron pročišćuje plazmu od nepoželjnih tvari jest sekrecija. Sekrecijom se tvari iz plazme izlučuju izravno kroz epitelne stanice tubula u tubularnu tekućinu. Konačna se mokraćna sastoji od filtriranih i male količine secerniranih tvari (Guyton, 1995).

Nakon što nastane u bubrezima, mokraćna se mokraćovodom (ureterom) odvodi u mokraćni mjehur, a izlučuje se kroz mokraćnu cijev ili uretru (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

### **1.1.1 Sastav mokraće**

Kod zdravih osoba, mokraća je sterilna, žuto obojena tekućina blago kiselog pH (5 – 6). Sastoji se od vode, otopljenih tvari, staničnih fragmenata i kompletnih stanica, cilindra i kristala (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Izlučena mokraća normalno se sastoji od 94% vode i 6% otopljenih tvari. Glavne prisutne otopljene tvari su ureja, kloridi, natrij i kalij, a slijede fosfati, sulfati, kreatinin i mokraćna kiselina. Ostale tvari koje se inicijalno nalaze u ultrafiltratu, poput glukoze, bikarbonata i albumina potpuno se reapsorbiraju u tubulima. Posljedično, mokraća zdravih osoba ne sadrži te otopljene tvari u značajnim količinama (Brunzel, 2018). Brojna patofiziološka stanja, prisutnost egzogenih tvari iz hrane i lijekovi mijenjaju boju i sastav mokraće (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Kod zdravih osoba dnevno nastaje 1 – 2 L mokraće (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Sposobnost bubrega da prilagođavaju izlučivanje vode i otopljenih tvari stanju u organizmu čini ga glavnim organom za regulaciju tjelesnih tekućina i njihov sastav (Brunzel, 2018).

### **1.1.2 Mokraća kao uzorak**

Mokraća je najčešće korišteni ekstravaskularni uzorak u laboratorijskoj medicini. Iako u odnosu na uzorke krvi, poput seruma ili plazme, ima brojne prednosti, kao što su neinvazivno uzorkovanje i laka dostupnost velike količine uzorka, brojni su nedostaci ovog tipa uzorka, od velike biološke varijabilnosti u izlučivanju pojedinih konstituenata mokraće do brojnih predanalitičkih čimbenika koji mogu utjecati na rezultate analize. Unatoč tome, za pojedina dijagnostička stanja, određivanje koncentracije analita u mokraći neizostavan je laboratorijski postupak. Koristi se zbog niza različitih razloga, a neki od njih su pomoć u postavljanju dijagnoze različitih bolesti, kao populacijski probir za različite asimptomatske, kongenitalne ili hereditarne bolesti, u praćenju tijeka mnogih bolesti ili u praćenju uspješnosti terapije (CLSI, 2009).

## **1.2 Pretrage u mokraći**

Broj analita koji se mogu određivati u mokraći vrlo je velik i raznolik. Pretrage u mokraći mogu se u grubo podijeliti na kvalitativne i kvantitativne (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Kvalitativna analiza mokraće osnovna je pretraga u dijagnostici bubrežnih bolesti, a sastoji se

od fizikalnog pregleda mokraće, kemijske analize test trakom i mikroskopske analize mokraćnog sedimenta. Kvantitativnom analizom mokraće određuje se količina tvari koja se izluči bubrežima tijekom jednog dana (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Radi preglednosti, najčešće određivani analiti u mokraći prikazani su tablicama 1 i 2 (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Tablica 1 Kvalitativne pretrage u mokraći

SKUPINA TESTOVA	PRETRAGE
<b>Kemijski pregled mokraće test trakom</b>	Albumin, bilirubin, eritrociti/hemoglobin, glukoza, ketonska tijela, leukociti, nitriti, pH, proteini, relativna volumna masa, urobilinogen
<b>Lijekovi</b>	Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi
<b>Sredstva ovisnosti</b>	Alkohol, amfetamini, benzodiazepini, barbiturati, metamfetamin, opijati, kanabinoidi, kokain, heroin, ecstasy, metadon, fenciklidin
<b>Hormoni</b>	Luteinizirajući hormon, Humani korionski gonadotropin ( $\beta$ hCG)

Tablica 2 Kvantitativne pretrage u mokraći

SKUPINA TESTOVA	PRETRAGE
<b>Alkoholi</b>	Etanol, metanol, izopropanol, etilen-glikol
<b>Aminokiseline</b>	Alanin, asparagin, arginin, citrulin, cistin, glicin, glutaminska kiselina, histidin, homocistein, leucin, lizin, metionin, ornitin, sarkozin, serin, taurin, tirozin, triptofan, valin i dr.
<b>Elektroliti</b>	Anorganski fosfati, kalcij, kalij, kloridi, magnezij, natrij, osmolalnost
<b>Elementi u tragovima</b>	Bakar, cink, fluor, jod, kobalt, krom, mangan, molibden, nikal, selen, srebro
<b>Enzimi</b>	Amilaza, N-acetil- $\beta$ -Dglukozaminidaza
<b>Hormoni</b>	Aldosteron, slobodni kolesterol
<b>Organske kiseline</b>	4-OH-fenilmliječna, 4-OH-fenilpropinonska, hidroksi-malonska, 2-OH-izovalerična, palmitinska, orotska, mandelična, mevalonska, i dr.
<b>Metaboliti</b>	Citrat, cistin, glukoza, kreatinin, mokraćna kiselina, oksalat, ureja
<b>Proteini</b>	$\alpha$ 1-mikroglobulin, albumin, $\beta$ 2-mikroglobulin, cistatin C, C-peptid, elektroforeza proteina mokraće, KIM-1, Bence Jonesov protein, mioglobin, NGAL, retinol-vezujući protein, ukupni proteini



<b>Sredstva ovisnosti</b>	Amfetamin, metamfetamin, benzodiazepini, barbiturati, LSD, fenciklidin, ketamin, kanabinoidi, kokain i metaboliti, opioidi
<b>Toksični metali</b>	Aluminij, antimon, arsen, kadmij, olovo, platina, talij, živa
<b>Vitamini</b>	B2, B5, B7, C i metaboliti

### 1.3 Klinički značaj biokemijskih pretraga u mokraći

Analiza mokraće jednostavan je i brz postupak u kliničkom laboratoriju (CLSI, 2009). Budući da je mokraća ultrafiltrat plazme, analiza mokraće može se koristiti za procjenu i praćenje tjelesne homeostaze i mnogih metaboličkih procesa bolesti (Brunzel, 2018). Koristi se kao pomoć u postavljanju dijagnoze različitih bolesti bubrega, mokraćnog trakta i jetre te metaboličkih poremećaja poput šećerne bolesti. Također je važna u praćenju uspješnosti različitih vrsta kronične terapije i probira kod asimptomatskih stanja (CLSI, 2009).

U ovom će se poglavlju prikazati detaljniji osvrt na analite koji su određivani u eksperimentalnom dijelu rada. To su ukupni proteini, albumin, amilaza, natrij, kalij, kloridi, kalcij, anorganski fosfati, magnezij, kreatinin, ureja i mokraćna kiselina.

Proteini su makroelementi sastavljeni od velikog broja aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Vrlo su različiti i specifični za pojedina tkiva i organe. U organizam se unose hranom gdje ih razgrađuje nekoliko proteolitičkih enzima. U krvnoj plazmi proteini imaju razne funkcije: antitijela su odgovorna za zaštitu od infekcija, albumin regulira koloidno-osmotski tlak i raspodjelu vode, djeluju kao puferi i pomažu u održavanju acidobazične ravnoteže, imaju transportnu funkciju, kao i brojne druge specifične funkcije. Koncentracija proteina u krvi ovisi o prehrani te je obično malo veća u muškaraca nego u žena. Zbog velike količine različitih proteina i njihovih različitih funkcija u organizmu, promjenu koncentracije proteina u organizmu treba pratiti imajući na umu radi li se o promjeni apsolutnih koncentracija ili samo o relativnim promjenama međusobnih odnosa različitih proteinskih frakcija. Mokraća zdrave osobe sadržava samo tragove proteina čija je molekulska masa dovoljno mala da mogu prolaziti glomerularni filtrat ( $< 70$  kDa). Pozitivan nalaz proteina u mokraći naziva se proteinurijom. Proteinurija je najčešće posljedica povećane propusnosti glomerula, a o stupnju oštećenja ovisi koji će proteini prelaziti u mokraću (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Stoga se ukupni proteini određuju u mokraći prilikom postavljanja dijagnoze i praćenja kronične bubrežne bolesti, ali i šećerne bolesti te IgA nefropatije (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Povišena

koncentracija proteina u mokraći ne mora uvijek biti posljedica patološkog zbivanja u organizmu. Naporna tjelovježba, dehidracija, prehrana, stres, trudnoća i druga stanja mogu uzrokovati privremeni porast razine proteina u mokraći (<https://medlineplus.gov/>).

Albumin je protein koji proizvodi jetra, a glavna mu je zadaća održavanje koloidno-osmotskog tlaka u organizmu. Također prenosi hormone, vitamine i enzime kroz tijelo (<https://medlineplus.gov/>). Budući da na albumin normalno otpada 50 – 60% ukupnih proteina, promjene u koncentraciji albumina, obično se preslikavaju na promjene u koncentraciji proteina. Snižena koncentracija albumina u krvi klinički je značajnija od povišene, budući da je hiperalbuminemija uzrokovana samo dehidracijom i posljedičnom hemokonzentracijom. Kako albumin ima relativno malu molekularnu masu (66 kDa), gubi se primarno putem bubrega. Zbog toga je hipoalbuminemija osobito izražena pri nefrotskom sindromu zbog jake proteinurije (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Određivanje albumina metoda je probira oštećenja bubrega kod šećerne bolesti. Albumini se u mokraći također određuju u postavljanju dijagnoze i praćenju kronične bubrežne bolesti, šećerne bolesti i tubularne proteinurije (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Amilaza je enzim iz skupine hidrolaza koji razgrađuju škrob, odnosno glikogen. To je enzim relativno male molekulske mase, zbog čega lako prolazi u glomerularni filtrat i izlučuje se u mokraću. Smatra se specifičnim enzimom za gušteraču, iako ima malu aktivnost i u drugim organima (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Glavna indikacija za određivanje amilaze u mokraći je akutni pankreatitis (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Aktivnost amilaze povećava se u akutnom pankreatitisu, a važno ju je određivati i u serumu i u mokraći zbog toga što postoje slučajevi akutnog pankreatitisa u kojima je aktivnost amilaze u serumu unutar referentnog intervala, dok je aktivnost u mokraći povišena (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Amilaza u mokraći također se koristi za praćenje kroničnog pankreatitisa (<https://medlineplus.gov/>). Aktivnost amilaze u mokraći određuje se i kod drugih patoloških stanja, poput zaušnjaka, bolesti bilijarnog trakta, perforacije želučanog čira, crijevne opstrukcije, ali i kod ektopičnog stvaranja amilaze u zloćudnim tumorima, šećerne bolesti i teških opekline. U svim ovim stanjima jače je povećanje aktivnosti enzima u mokraći nego u serumu. Visoka aktivnost amilaze u serumu bez odgovarajućeg povećanja u mokraći nalazi se samo u bubrežnoj insuficijenciji ili kod makroamilazemije jer se amilaza ne može izlučiti zbog oštećenog bubrega, odnosno velikog kompleksa enzima i imunoglobulina koji ne može proći kroz glomerule (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Elektroliti imaju važnu funkciju u održavanju ravnoteže i raspodjele vode, u održavanju normalnog osmotskog tlaka, u održavanju acidobazične ravnoteže i u održavanju neuromuskularne podražljivosti. Glavni kationi u organizmu su natrijevi, kalijevi, kalcijevi i magnezijevi kationi, a od aniona su to kloridi, bikarbonati, fosfati i sulfati (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Natrij je glavni kation izvanstanične tekućine. U organizam se najviše unosi putem soli, gotovo se sav apsorbira iz crijeva, a najvećim se dijelom iz organizma izlučuje mokraćom. Reapsorpciju natrija pospješuje aldosteron, hormon kore nadbubrežne žlijezde. Izlučivanje natrija ponajviše ovisi o njegovoj koncentraciji u krvi, a na njegovo izlučivanje djeluju i srčani natrijuretici peptidi koji imaju ulogu u regulaciji homeostaze, retenciji vode i soli te održavanju krvnog tlaka. Smanjenje koncentracije natrija u serumu, a posljedično i smanjeno izlučivanje bubrezima, može biti uzrokovano različitim gastrointestinalnim poremećajima poput povraćanja, želučanog ulkusa ili karcinoma želuca, gastritisa, intestinalne opstrukcije i bolesti žuči, jakom diurezom karakterističnom za šećernu bolest, Adissonovom bolešću, bolestima bubrega i drugim stanjima. Povećana koncentracija natrija u serumu, a posljedično i povećano izlučivanje putem bubrega prati Cushingov sindrom, pretjerani gubitak tekućine te nekontroliranu terapiju hipertoničnom otopinom natrijeva klorida (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Koncentracija natrija u uzorku 24-satne mokraće također pomaže u procjeni dnevnog unosa natrija, razlikovanju predbubrežnog od bubrežnog zatajenja i postavljanju dijagnoze metaboličke alkaloze (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Kalij je glavni kation unutarstanične tekućine. Apsorbira se u tankom crijevu, a gotovo se sav višak kalija iz organizma izlučuje putem bubrega. Kalij se izlučuje posredno, djelovanjem na izlučivanje i reapsorpciju natrija, procese koji su pod djelovanjem aldosterona. Zbog toga je organizam izložen većoj opasnosti od nekontroliranog gubitka kalija. Smanjena koncentracija kalija u serumu može biti uzrokovana jakom diurezom, povraćanjem ili proljevom, dilucijom izvanstanične tekućine, nedovoljnim unosom kalija putem hrane ili naglim prelaskom kalija iz izvanstanične tekućine u stanice. Posljedično se u ovim stanjima kalij pojačano gubi mokraćom. Hipokalemija je također karakteristična u poslijeoperacijskim stanjima zbog gubitka krvi, dehidracije i gladovanja nakon operacije, te u dijabetičkoj acidozi zbog pojačane diureze i terapije inzulinom, a pojačano izlučivanje kalija mokraćom karakteristično je i za Cushingovu bolest ili terapiju hormonima nadbubrežne žlijezde. Povećana koncentracija kalija u serumu pojavljuje se kada kalij prelazi iz stanica u izvanstaničnu tekućinu. Do toga može doći pri manjku tekućine i kada se kalij daje terapijski u

većim količinama no što se mogu izlučiti mokraćom (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Koncentracija kalija u mokraći se dakle određuje kod bubrežnih bolesti, gastrointestinalnih poremećaja, primarnog ili sekundarnog aldosteronizma, Cushingova sindroma, a također se može određivati za procjenu dnevnog unosa natrija i kod terapije diureticima (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Kloridni je anion glavni anion izvanstanične tekućine, a zajedno s natrijem odgovoran je za održavanje ravnoteže tekućine, osmotskog tlaka i acidobazične ravnoteže. Kloridi se, jednako kao i natrij, u organizam najvećim dijelom unose putem soli, gotovo se u potpunosti apsorbiraju u tankom crijevu, a iz cirkulacije se uklanjaju bubrežima i znojenjem. Smanjena koncentracija klorida u serumu pojavljuje se kod raznih gastrointestinalnih poremećaja praćenih proljevima i povraćanjem, a može se pojaviti i kod različitih infektivnih bolesti poput upale pluća. Kod kroničnih bubrežnih bolesti hipokloremija nastaje zbog poliurije, smanjene reapsorpcije u tubulima i posljedično pojačanog izlučivanja mokraćom. Povećanje koncentracije klorida u serumu pojavljuje se u stanjima dehidracije, dekompenziranih srčanih bolesti, smanjene filtracije u glomerulima i u respiracijskoj alkalozii. Dnevno izlučivanje klorida mokraćom značajno varira, a ovisi o prehrani te o zdravstvenom stanju pacijenta (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Metabolizam kalcija i fosfata usko je povezan, a u najvećem se postotku u organizmu nalaze u obliku kalcijeva fosfata, mineralnog sastojka kostiju (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Kalcij je kation koji se nalazi pretežno u krvnoj tekućini, a fiziološki je aktivan samo ionizirani kalcij. Ima brojne funkcije u organizmu, a koncentracija mu ovisi o pH krvi. Kalcij se u serumu nalazi u obliku difuzibilnog i nedifuzibilnog kalcija, a na odnos njegovih frakcija, odnosno koncentraciju ukupnog kalcija u serumu utječu brojni čimbenici, uključujući paratiroidni hormon, kalcitonin, vitamin D, proteine plazme i koncentraciju fosfata u serumu (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Manje od polovine kalcija izlučuje se mokraćom, a koncentracija kalcija u 24-satnom uzorku mokraće uvelike ovisi o prehrani (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Hipokalcemija je karakteristična za različita stanja. To su u prvom redu hipoparatiroidizam, rahitis i osteomalacija te bubrežne bolesti praćene proteinurijom kod kojih se kalcij gubi zajedno s proteinima. Hiperkalcemija se pojavljuje kod hiperparatiroidizma, hipervitaminoze D, acidemije i nefritisa, zbog smanjene sposobnosti bubrega da eliminira kalcij (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Fosfor se nalazi u krvi u obliku anorganskih i organskih fosfata. Fosfati se u organizam unose prehranom, apsorbiraju se u tankom crijevu, a oko 70% fosfata iz organizma se izlučuje

putem mokraće. Hiperfosfaturija je karakteristična za hiperparatireoidizam, hipervitaminozu D, a hipofosfaturija za hipoparatireoidizam, rahitis, osteomalaciju, manjak vitamina D, steatoreju, celijakiju i kroničnu bubrežnu insuficijenciju zbog retencije fosfata u organizmu (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Kalcij i anorganski fosfati određuju se u mokraći kod dijagnostike hiperparatireoidizma, i osteoporoze, a kalcij se dodatno određuje kod niza različitih stanja, poput nefrolitijaze, bubrežne tubularne acidoze, hiperkalciurije i poremećaja u transporteru za kalcij (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Magnezij je elektrolit, dvovalentni kation potreban mišićima, živcima i srcu za normalno funkcioniranje. Magnezij također pomaže u kontroli krvnog tlaka i šećera u krvi. Većina magnezija u tijelu nalazi se u kostima i stanicama, a mala se količina magnezija nalazi u krvi (<https://medlineplus.gov/>). Manje od polovine magnezija iz organizma se izlučuje putem mokraće. Taj se udio povećava u slučajevima naglog povećanja koncentracije magnezija u krvi, primjerice uzrokovanog parenteralnim davanjem magnezija. Iz toga je vidljivo da je bubreg važan organ za regulaciju magnezija u organizmu. Diuretici inhibiraju prijenos magnezija u uzlaznom kraku Henleove petlje te pojačavaju njegovo izlučivanje u mokraću. Budući da apsorpcija magnezija ovisi ponajviše o količini samog magnezija u crijevima, povećane su koncentracije magnezija u serumu rijetke. Hipomagnezemija se pojavljuje kod dugotrajnog posta, a češće nastaje zbog smanjene crijevne apsorpcije ili tubularne reapsorpcije. Ona prati kronične proljeve, malapsorpcijski sindrom, dugotrajno uzimanje diuretika, akutnu bubrežnu bolest i aldosteronizam (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Za magnezij je karakteristično pojačano izlučivanje kod hiperaldosteronizma i bolesti bubrega, a određuje se i kod otkrivanja uzroka hipokalcemije zato što visoke koncentracije magnezija u mokraći inhibiraju stvaranje kalcijevih kamenaca (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Kreatinin je anhidrid kreatina, a njihov se metabolizam odvija u bubrezima, mišićima, jetri i gušterači. Njegova koncentracija u serumu ovisi ponajprije o glomerularnoj filtraciji što ga čini dobrim pokazateljem bubrežne funkcije (Čvorišćec i Čepelak, 2009). U zdravom organizmu bubrezi filtriraju kreatinin iz krvi i izlučuju ga iz organizma putem mokraće. Ako postoji problem s radom bubrega, kreatinin se može nakupljati u krvi i manje se oslobađati mokraćom (<https://medlineplus.gov/>). Smanjeno izlučivanje kreatinina mokraćom stoga je karakteristično za smanjenu funkciju bubrega i za smanjenje mišićne mase. U zdravih je osoba kreatinin u mokraći prilično konstantan i ne ovisi o prehrani i diurezi (Čvorišćec i Čepelak,

2009). Upravo se zbog toga njegova koncentracija u uzorku 24-satne mokraće koristi kao test provjere pravilnog uzorkovanja iste (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Ureja je glavni metabolički produkt dušikovih tvari u organizmu. Sintetizira se u jetri, a više od 90% ureje izlučuje se iz tijela putem bubrega pa određivanje koncentracije ureje u mokraći služi kao pokazatelj bubrežne funkcije (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Određivanje koncentracije ureje u mokraći također se koristi za procjenu količine dušika u organizmu. Budući da koncentracija ureje uvelike ovisi o prehrani i unosu proteina, ona se često određuje kod bolesnika na parenteralnoj prehrani (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Mokraćna je kiselina konačni metabolički produkt egzogenih i endogenih purina u organizmu. Egzogeni se purini u organizam najviše unose putem hrane, najvećim dijelom mesom. Endogeni purini sintetiziraju se u organizmu iz riboza-5-fosfata i ATP-a ili nastaju kao produkt hidrolize nukleozida. Suvišni purini metaboliziraju se u mokraćnu kiselinu koja se iz organizma najvećim dijelom izlučuje putem mokraće. Izlučivanje mokraćne kiseline smanjuje se u akutnim i kroničnim bubrežnim bolestima zbog bubrežne insuficijencije, pri terapiji tiazidnim diureticima i ponekad u hiperuricemiji i acidozi. Povećana koncentracija mokraćne kiseline u mokraći čimbenik je rizika za nastanak kamenaca (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Mokraćna se kiselina određuje i za praćenje terapije urikozuričnim lijekovima, dijagnostiku gihta te nefrolitijaze povezane s nastajanjem kamenaca mokraćne kiseline ili kalcija (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Navedene pretrage mogu se određivati u jednokratnom ili 24-satnom uzorku mokraće, izuzev amilaze koja se određuje samo u jednokratnom uzorku mokraće (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

#### **1.4 Predanalitički čimbenici određivanja pretraga u mokraći**

Procijenjeno je da rezultati laboratorijskih ispitivanja utječu na oko 70% medicinskih odluka i to jasno objašnjava zašto laboratorijske pogreške imaju velik doprinos ukupnoj učestalosti pogrešaka u zdravstvenom sustavu. Unatoč naprednoj automatizaciji u dijagnostičkim laboratorijima, još uvijek su prisutne značajne stope pogreške. Proces laboratorijskog ispitivanja može se podijeliti u tri faze: predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku. Predanalitička je faza prepoznata kao najosjetljiviji dio ukupnog procesa analize te se u njoj dogodi dvije trećine svih laboratorijskih pogrešaka. Razumijevanje

predanalitičkih varijacija i smanjenje pogrešaka u toj fazi procesa testiranja stoga su važni za bolju sigurnost i kvalitetu laboratorijske usluge koja se pruža pacijentima (Hemamalini R., 2020).

Brojni fiziološki čimbenici mogu utjecati na kvalitetu uzorka mokraće, a ovisno o analizi koja se provodi, prije uzorkovanja može biti potrebna odgovarajuća priprema pacijenta (Brunzel, 2018). Čimbenici koji utječu na sastav mokraće su diureza, prehrana, položaj tijela, vrijeme zadržavanja mokraće u mokraćnom mjehuru, kontaminacija, priprema pacijenata, uzorkovanje, spremnici za uzorke mokraće i konzervansi (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Promjenom unosa tekućine mijenja se diureza, a s njom i koncentracija velikog broja analita u mokraći. Ako se radi o određivanju analita koji su u mokraći prisutni u malim koncentracijama, optimalna je slabija diureza, kako bi se dobio visokokoncentrirani uzorak mokraće. Prekomjerno uzimanje tekućine dovodi do razrjeđenja uzorka i raspada staničnih elemenata, što rezultira lažno sniženim koncentracijama analita. Gladovanje smanjuje koncentraciju sastavnica mokraće koji se unose prehranom (fosfati, kalcij, magnezij, vitamini topljivi u vodi), a povećava koncentraciju onih koje su produkti katabolizma (ketonskih tijela i amonijaka). Pacijent mora biti natašte prije uzorkovanja mokraće, jer se na ovaj način smanjuje prekomjerna diureza, a samim time i njezin utjecaj na rezultate laboratorijskih pretraga. Položaj tijela također znatno utječe na sastav mokraće. Ortostatska proteinurija benigno je stanje karakterizirano pozitivnim nalazom proteina u mokraći u uspravnom položaju, dok je nalaz negativan u ležećem položaju. Fizička aktivnost može povećati koncentraciju analita koji se izlučuju glomerularnom filtracijom kao rezultat povećanog tlaka (albumin i hemoglobin – eritrociti). Zbog svega navedenog, dan prije prikupljanja uzorka mokraće potrebno je izbjegavati intenzivno fizičko vježbanje i značajnije varijacije u unosu tekućine i prehrane (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Vrlo važan predanalitički čimbenik je samo uzorkovanje mokraće. Adekvatno prikupljeni uzorci nužni su kako bi se dobili kvalitetni i pouzdani rezultati analize ovog tipa uzorka (CLSI, 2009).

Ako je kvaliteta uzorka mokraće ugrožena, ugrožena je i točnost rezultata analize. Kako bi se spriječilo izdavanje rezultata analize neadekvatnih uzoraka mokraće, postoje različiti kriteriji za odbijanje uzorka mokraće. To mogu biti:

- nedovoljan volumen mokraće za traženu analizu,
- neprikladna vrsta uzorka,

- vidljivo kontaminirani uzorak (npr. s izmetom),
- neispravan konzervans,
- nepravilno skladištenje i transport uzoraka,
- neoznačeni ili pogrešno označeni uzorak (Brunzel, 2018).

Najčešće pogreške koje se susreću u kvantitativnim testovima u mokraći povezane su izravno s prikupljanjem uzorka ili s problemima rukovanja s uzrokom, kao što je gubitak uzorka, uključivanje dva prva jutarnja uzorka (prvog i drugog dana prikupljanja), netočno mjerenje ukupnog volumena, pogreška identifikacije i neadekvatno skladištenje uzorka. Kod 24-satnog uzorka mokraće, nužno je da uzorak bude promiješan i homogeniziran kako bi alikvot koji se izravno koristi u analizi predstavljao cjelovit uzorak (Brunzel, 2018).

## 1.5 Interferencije u mokraći

Interferencije su glavni izvor predanalitičkih pogrešaka u laboratorijskoj medicini. Prisutnost različitih egzogenih ili endogenih tvari može ometati mjerenje i dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata (Čvorišćec i Čepelak, 2009; Brunzel, 2018). U kliničkoj kemiji interferencija se definira kao uzrok medicinski značajne razlike u rezultatu ispitivanja mjerene veličine zbog druge komponente ili svojstva uzorka. Iako se analiza nadzire brojnim metodama, poput unutarnje kontrole kvalitete i postupaka vanjske kontrole kvalitete, laboratoriji ne mogu tako lako otkriti pogrešku uzrokovanu interferencijama (<https://clsi.org/>).

Interferente možemo podijeliti na endogene i egzogene. Endogene interferencije potječu od tvari koje se prirodno nalaze u uzorku krvi ili mokraće pacijenta. To mogu biti hemoliza (hemoglobin i druge tvari), bilirubin, lipidi, proteini, protutijela (autoantitijela, heterofilna protutijela), metaboliti proizvedeni u patološkim stanjima, prekomjerna koncentracija analita i tvari koje križno reagiraju s analitima koji se određuju. Biološki čimbenici dovode do promjene u količini analita koji se mjeri u definiranoj matrici. Oni mijenjaju koncentraciju izmjenjenog (promijenjenog) analita na način neovisan o metodi. Ti su čimbenici ili prisutni kod zdrave osobe, poput cirkadijanih ritmova, ili se pojavljuju kao nuspojave bolesti i njezina liječenja. Biološki čimbenici mogu biti promjenjivi, poput prehrane, doba dana ili godišnjeg doba, ili nepromjenjivi, poput genetskog podrijetla, etničke pripadnosti, spola i drugih (Hemamalini R., 2020; <https://clsi.org/>; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).



Egzogena interferencija posljedica je tvari koje se prirodno ne bi trebale nalaziti u pacijentovom uzorku, a mogu se podijeliti na egzogene molekule prisutne u uzorku, uključujući lijekove, otrove i različite biljne pripravke, intravenske tekućine, tvari koje pacijent uzima poput alkohola ili dodataka prehrani i egzogene molekule dodane uzorku tijekom uzorkovanja ili nakon postupka uzorkovanja, kao što su antikoagulansi, konzervansi i stabilizatori, kao i kontaminanti slučajno uneseni tijekom rukovanja uzorkom. Egzogena interferencija također može biti uzrokovana matricom uzorka, procesima koji utječu na uzorak (npr. transport, skladištenje, centrifugiranje) i prijenosom analita (engl. *carry over*). Interferencije i njihovi mehanizmi razlikuju se s obzirom na specifičan analit i analitičku metodu i imaju tendenciju mijenjanja rezultata sastavnog dijela uzorka nakon što je uzorak prikupljen. Stoga je njihov učinak ovisi o metodi i može se smanjiti ili eliminirati odabirom specifičnije metode za mjereni analit (Hemamalini R., 2020; <https://clsi.org/>; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Za svaku je pretragu potrebno poznavati moguće interferencije koje ponekad mogu objasniti klinički neočekivan rezultat. Proizvođači reagensa dužni su ispitati interferencije i rezultate dostaviti svojim korisnicima. Međutim, zbog velikog broja metabolita prisutnih u mokraći i nepoznatih mehanizama kojima pojedine komponente mogu utjecati na rezultat analize, ponekad učinci raznih interferenata mogu ostati neprepoznati. Kemijski pregled mokraće bitna je pretraga i često jedan od testova koji usmjerava daljnju dijagnostiku. Stoga je neophodno dobro poznavati interferencije koje mogu utjecati na rezultat pretrage (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

Najčešći uzroci analitičkih interferencija su fizikalni, kemijski, detekcijski, inhibicija enzima, neselektivnost i adicija interreferirajućeg agensa. Primjer fizikalne interferencije je promjena fizikalnih svojstava matrice uzorka (npr. viskoznost), koja može uzrokovati prividnu promjenu u koncentraciji mjerene veličine (<https://clsi.org/>). Učinci matrice definiraju se kao pristranost ili razlika uzrokovana svojstvom uzorka koje nije na razini tvari ili svojstva koje se namjerava mjeriti. To uključuje fizikalno-kemijske, mehaničke i analitičke smetnje te izoforme tvari (Saibaba K. S. S. i sur., 1998). Kemijska interferencija uzrokovana je utjecajem na reakciju kompeticijom kemijske tvari za reagens, inhibicijom indikatorske reakcije ili promjenom oblika mjerene veličine kompleksiranjem ili taloženjem. Interferent može imati svojstva slična mjerenoj veličini koja se detektira i mjeri te na taj način ometati detekciju mjenog analita uzrokujući lažno povišene vrijednosti. Interferent također može promijeniti aktivnost enzima izdvajanjem metalnih aktivatora, vezanjem na katalitičko mjesto enzima ili oksidacijom bitnih sulfhidrilnih skupina. Neselektivnost je također jedan od načina na koji različite tvari mogu

ometati određene metode analize. Adicija interferirajućeg reagensa direktno uzrokuje lažno povišene vrijednosti određivanog analita. Adicijski interferent može potjecati iz stanica (npr. otpuštanje kalija iz stanične lize) ili iz intravenskih tekućina (<https://clsi.org/>). Većina proteinskih interferencija povezana je s utjecajem paraproteina (monoklonskih imunoglobulina), pretežno imunoglobulina M (IgM) i imunoglobulina G (IgG) klase. Paraproteini mogu ometati sve vrste automatiziranih testova uključujući spektrofotometrijske, imunonefelometrijske i imunoturbidimetrijske testove i određivanje ukupnog bilirubina, fosfata, HDL kolesterola (engl. *high density lipoprotein*), gama-glutamil transferaze (GGT), C-reaktivnog proteina (CRP) i glukoze ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). *Carry over*, odnosno prenošenje analita iz jednog uzorka u drugi, najčešće se događa kada je koncentracija određivanog analita puno veća u prethodnom uzorku. Do toga dolazi zbog nepotpunog uklanjanja analita tijekom procesa ispiranja, posebno u automatiziranim testovima u kojima očekivani raspon koncentracije jako varira (npr. hCG, tumorski markeri). *Carry over* može biti vrlo teško primijetiti i dokazati, pogotovo u laboratorijima u kojima je broj uzoraka velik ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Intereferencija lijekova s laboratorijskim analizama smatra se predmetom stalnog interesa u rutinskom laboratoriju. Sve veća konzumacija različitih dodataka prehrani predstavlja problem u laboratorijskoj praksi (Martinello, Luiz da Silva, 2006). Interferencija lijekova često ostane neprepoznata u laboratoriju zbog nedostatka relevantnih informacija o lijekovima koje pacijent konzumira. Smetnje mogu biti uzrokovane matičnim lijekom, njegovim metabolitom ili aditivima. Interferencija lijekova može biti kemijska, koja se događa kada matični lijek, metaboliti ili aditivi unakrsno reagiraju s analitom koji se određuje, lijekovi ili aditivi mogu djelovati kao aktivatori ili inhibitori testa, a interferencija može biti i fotometrijska u kojoj dolazi do preklapanja apsorpcijskih maksimuma s onima izmjerenih kromogena ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **1.5.1 Interferencija askorbinske kiseline**

Askorbinska kiselina prirodni je vitamin topljiv u vodi poznatiji pod nazivom vitamin C. Askorbinska je kiselina snažan redukcijski i antioksidativni agens koji djeluje u borbi protiv bakterijskih infekcija, u reakcijama detoksikacije i u stvaranju kolagena u fibroznom i vezivnom tkivu, zubima, kostima, koži i kapilarama. Vitamin C koji se nalazi u agrumima i

drugom voću te u povrću ljudi ne mogu proizvesti niti pohraniti i moraju ga unositi prehranom (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sve veća konzumacija vitaminskih suplemenata, a posebice upotreba velikih doza vitamina C, predstavlja dodatan problem u laboratorijskoj praksi. Askorbinska se kiselina lako apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i široko je raspoređena u tjelesnim tkivima. Koncentracija askorbinske kiseline u plazmi raste kako se unesena doza povećava dok se ne postigne plato s dozama od oko 90 do 150 mg dnevno. Što se tiče metabolizma askorbinske kiseline, ona se reverzibilno oksidira u dehidroaskorbinsku kiselinu, a dio se metabolizira u neaktivne metabolite askorbat-2-sulfat i oksalnu kiselinu koji se izlučuju mokraćom. Askorbinska kiselina unesena u suvišku od tjelesnih potreba također se brzo eliminira nepromijenjena mokraćom. To se događa kada je unos vitamina C veći od 100 mg dnevno, a posljedica je činjenice da je bubrežni prag za askorbinsku kiselinu otprilike 14 µg/mL. Dakle, kada je tijelo zasićeno askorbinskom kiselinom i koncentracije u krvi prijeđu prag, nepromijenjena se askorbinska kiselina izlučuje u mokraći. Kada su zasićenost tkiva i koncentracije askorbinske kiseline u krvi niske, primjena vitamina rezultira malim ili nikakvim izlučivanjem askorbinske kiseline mokraćom (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Kada je prisutna u biološkim uzorcima, askorbinska kiselina može ometati mjerenje biokemijskih parametara, uzrokujući lažni rezultat analize. Takva izmijenjena vrijednost laboratorijskog testa može rezultirati pogrešnom dijagnozom, nepotrebnom primjenom liječenja ili primjenom neodgovarajuće doze lijeka. Askorbinska kiselina može promijeniti vrijednosti laboratorijskih testova kroz *in vitro* analitičku interferenciju, kroz *in vivo* fiziološki mehanizam ili kroz oba mehanizma istovremeno. Zbog toga je važno poznavati mehanizme interferencija kako bi se smetnje eliminirale ili svele na najmanju moguću mjeru (Martinello, Luiz da Silva, 2006).

Zbog svoje značajne redukcijske sposobnosti, askorbinska je kiselina dobro poznati interferirajući spoj u biokemijskim testovima koji uključuju indikatorske sustave s oksidazama i peroksidazama, općenito poznatim kao Trinderova metoda. Takva se metoda često koristi u mjerenju različitih analita uključujući glukozu, ukupni kolesterol, trigliceride i mokraćnu kiselinu. Osim inhibicije Trinderove reakcije, askorbinska kiselina također može interferirati *in vitro* i/ili *in vivo* u određivanju bilirubina, fosfata, ureje, kreatinina i različitih enzima (Martinello, Luiz da Silva, 2006).

Interferencija askorbinske kiseline na analizu mokraće s test trakama poznata je već mnogo godina. Interferencija i intenzitet interferencije razlikuju se između različitih proizvođača, ali kod većine uzrokuje lažno negativne rezultate za glukozu, nitrite, bilirubin i krv (Unic i sur., 2018; Nikolac Gabaj i sur., 2020).

### 1.5.2 Interferencija glukoze

Prema Svjetskoj zakladi za šećernu bolest, šećerna je bolest najbrže rastuća kronična bolest u svijetu koja pogađa 6,4% svjetske odrasle populacije. Stoga postoji sve veća potreba kliničkih laboratorija da istraže potencijalni utjecaj visokih koncentracija glukoze u različitim tjelesnim tekućinama na rezultate rutinskih laboratorijskih pretraga (Chudar i sur., 2016).

Glukoza je monosaharid, jednostavni šećer koji ima dvije izoforme, alfa i beta, s kemijskom strukturom  $C_6H_{12}O_6$  koja djeluje kao izvor energije za biljke i životinje reagirajući s kisikom, stvarajući ugljični dioksid i vodu te oslobađajući energiju (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Visoka razina glukoze u krvi ( $> 7$  mmol/L) uzrokuje simptome učestalog mokrenja, povećane žeđi i povećane gladi. Kronična izloženost visokoj glukozu u krvi, odnosno neliječena šećerna bolest, može uzrokovati mnoge komplikacije. Akutne komplikacije uključuju dijabetičku ketoacidozu i nekatotičku hiperosmolarnu komu. Ozbiljne dugotrajne komplikacije uključuju bolesti srca, moždani udar, zatajenje bubrega, čireve stopala i oštećenje očiju. Glavne dugoročne komplikacije odnose se na oštećenje krvnih žila, a istraživanja pokazuju da šećerna bolest udvostručuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i oko 75% smrti dijabetičara uzrokovano je bolestima koronarnih arterija (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pri euglikemijskim koncentracijama glukoze u krvi, glukoza se slobodno filtrira u glomerulu i potpuno se reapsorbira na razini proksimalnog zavojitog tubula. S porastom koncentracije glukoze u krvi, reapsorpcija filtrirane glukoze u proksimalnom zavojitom tubulu raste sve dok se ne postigne maksimalna vrijednost. Svako daljnje povećanje glukoze u krvi i posljedično opterećenje glukozom u proksimalnom tubulu rezultira izlučivanjem glukoze u mokraći (Rave K. i sur., 2006).

Do sad provedena istraživanja pokazala su da visoke koncentracije glukoze interferiraju s određivanjem različitih analita (Chudar i sur., 2016).

Najčešća analitička metoda ispitivanja koja se koristi u kliničkoj kemiji za određivanje kreatinina je Jaffeova metoda. Do sad je poznato da ekstremno visoke koncentracije glukoze interferiraju s određivanjem koncentracije kreatinina, osobito s Jaffeovom metodom u peritonejskom dijalizatu. U reakciji kreatinin reagira s pikrinskom kiselinom i stvara žuto-crveni kompleks kreatinin-pikrat u alkalnom pH. Brzina porasta stvaranja kompleksa na 500 nm izravno je proporcionalna koncentraciji kreatinina u uzorku. Interferirajući učinak primijećen je u reakciji kreatinina i alkalnog pikrata. Glukoza stvara interferirajući kromogen s pikratom pri čemu taj kromogen ima manju apsorpciju na valnoj duljini mjerenja. Taj je učinak beznačajan pri fiziološkim koncentracijama glukoze, ali u tekućini za kontinuiranu ambulantnu peritonealnu dijalizu koja sadrži vrlo visoke koncentracije glukoze, ova interferencija postaje klinički značajna. Glukoza također stvara smetnje pri određivanju kreatinina polaganom redukcijom pikrinske kiseline u pikramat jer time smanjuje interakciju s kreatininom. Primijećeno je da se pri konstantnim koncentracijama kreatinina smetnje povećavaju s povećanjem koncentracija glukoze (Chudar i sur., 2016).

Provedena su i istraživanja u kojima je ispitivan utjecaj povišenih koncentracija glukoze na druge parametre. U istraživanju iz 2001. godine cilj je bio ispitati promjene u koncentracijama natrija, kalija, ukupnog kalcija, fosfora, dušika iz uree, kreatinina, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, albumina, intaktnog paratiroidnog hormona, profila lipida i acidobazičnog statusa u krvi ili serumu bolesnika na redovnoj dijalizi liječenih otopinom za dijalizu poliglukoze. Zaključeno je da visoke koncentracije glukoze značajno ometaju određivanje natrijevih i kloridnih iona putem indirektno ionoselektivne elektrode (ISE) u serumu kao i u mokraći (Grzegorzewska i sur., 2001). Istraživanje Çuhadar i suradnika pokazalo je da interferencija glukoze na kreatinin pokazuje rastući trend s porastom koncentracije glukoze, koncentracija kalcija u serumu se smanjuje, a koncentracija albumina i klorida raste (Chudar i sur., 2016).

Stoga određivanje koncentracije kreatinina Jaffeovom alkalnom metodom pri visokim koncentracijama glukoze treba tumačiti s oprezom jer proizvođači još nisu riješili problem interferencije glukoze. Također, rezultate laboratorijske analize kalcija, albumina, klorida potrebno je tumačiti s oprezom u dijabetičara s lošom kontrolom glikemije (Chudar i sur., 2016; Hemamalini R., 2020).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Kvantitativna analiza mokraće u rutinskim se laboratorijima koristi svakodnevno. Ima ulogu u postavljanju novih i praćenju postojećih bolesti, probiru na različite bolesti i praćenju učinkovitosti terapije.

Kliničke indikacije za analizu mokraće vrlo su raznolike, a neke od njih uključuju simptome infekcija mokraćnih putova, primarne i sekundarne bolesti bubrega, sumnju na neinfektivne postrenalne bolesti, detekciju glukozurije i praćenje bolesnika sa šećernom bolesti te detekciju ili praćenje drugih metaboličkih stanja. Analiti u mokraći određuju se i za dijagnozu nekih endokrinih, metaboličkih i nasljednih bolesti te za potvrdu trudnoće ili zloupotrebe droga.

Budući da na rezultate analize mokraće mogu utjecati različiti predanalitički čimbenici, kao i interferencije, vrlo je bitno poznavati način na koji oni ometaju biokemijske analize i utječu na rezultate laboratorijske analize. Interferencije predstavljaju velik izvor predanalitičkih pogrešaka u laboratorijskoj medicini, a prisutnost različitih tvari u mokraći može ometati mjerenje i dovesti do lažno povišenih ili lažno sniženih rezultata brojnih kvantitativnih pretraga.

Točnost kliničkih laboratorijskih nalaza važna je za brigu o pacijentima, a kontrola cjelokupnog procesa analize odgovornost je laboratorijskih djelatnika. Iako su pogreške u analitičkoj fazi pod strogom kontrolom poboljšane tehnologije i kontrolnih materijala, poznato je da određeni spojevi ometaju neke korake analitičke reakcije.

Budući da je trend konzumacije vitaminskih dodataka prehrani u stalnom porastu, a pacijenti nemaju običaj naglašavati njihovu konzumaciju prilikom uzorkovanja, važno je znati imaju li povišene koncentracije vitamina utjecaj na pretrage koje se određuju u mokraći. Interferencija askorbinske kiseline u drugim oblicima analize mokraće poznata je već mnogo godina. Ona je predmet istraživanja brojnih radova te se postavlja pitanje utječe li ona i na određivanje različitih analita u mokraći koji se određuju na biokemijskim analizatorima.

Nadalje, šećerna je bolest najbrže rastuća kronična bolest u svijetu. U pacijenata s nekontroliranom bolešću, prisutna je konstantna hiperglikemija koja rezultira povećanim izlučivanjem glukoze mokraćom. Zbog toga je obaveza kliničkih laboratorija da istraže potencijalni utjecaj visokih koncentracija glukoze u različitim tjelesnim tekućinama na rezultate rutinskih laboratorijskih pretraga.

Cilj je ovog rada saznati interferiraju li povišene koncentracije askorbinske kiseline i glukoze u mokraći s kvantitativnim metodama analize mokraće na automatiziranim biokemijskim analizatorima i u slučaju da interferiraju jesu li te interferencije klinički značajne.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Priprema poola mokraće

Nasumično je odabran jedan pohranjeni uzorak 24-satne mokraće. Homogeniziran, promiješan i filtriran uzorak alikvotiran je u više alikvota u čiste plastične čaše i dobro začepljen. Alikvoti koji se nisu koristili isti dan pohranjeni su u ledenicu na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 Priprema uzoraka s interferencijama

Uzorci s interferencijama pripremljeni su otapanjem točno određene količine askorbinske kiseline, odnosno glukoze, u 10 mL uzorka mokraće. Korištene su komercijalno dostupne čiste supstance u obliku praha:

L-Ascorbic acid (Merck, Njemačka) i D-Glukoza (Biovit, Hrvatska).

Pripremljeno je 7 uzoraka mokraće različitih koncentracija interferenata u alikvotima volumena 10 mL. Askorbinska je kiselina pripremljena u koncentracijama 0, 0,2, 0,4, 0,5, 1, 2 i 5 g/L. ( $M_{\text{askorbinska kiselina}} = 176,12 \text{ g/mol}$ ). Potrebna masa askorbinske kiseline za svaki alikvot izračunata je prema formuli:

$$m = c \cdot M \cdot V$$

Masa interferenata korištena za dobivanje otopina točno određenih koncentracija interferenata prikazana je u tablicama 3 i 4.

Tablica 3 Priprema uzoraka s interferencijama - askorbinska kiselina

Uzorak	Koncentracija otopine/ $\text{gL}^{-1}$	m (askorbinska kiselina)/g
0	0	0
1	0,2	0,002
2	0,4	0,004
3	0,5	0,005
4	1	0,01
5	2	0,02
6	5	0,05

Uzorci s glukozom pripremani su na isti način. Pripremljeno je također 7 uzoraka, koncentracije glukoze 0, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 mmol/L ( $M_{\text{glukoza}} = 180,156 \text{ g/mol}$ ).



Tablica 4 Priprema uzoraka s interferencijama - glukoza

Uzorak	Koncentracija otopine/mmOLL <sup>-1</sup>	m (glukoza)/g
0	0	0
1	10	0,018
2	20	0,036
3	30	0,054
4	40	0,072
5	50	0,090
6	60	0,108



Slika 2 Uzorci mokraće točno određenih koncentracija glukoze

Masa askorbinske kiseline, odnosno glukoze, mjerena je na preciznoj vagi BAS 31 plus (Boeco, Njemačka), a mokraća je uzorkovana vakuumskim sistemom u epruvete s podtlakom (VACUETTE® TUBE 10 ml Z Urine No Additive 16x100 yellow cap-yellow ring, Round Base, non-ridged; Greiner Bio-One, Austrija).



*Slika 3 Vaganje askorbinske kiseline*

### **3.3 Metode mjerenja**

Za sve analize korišten je Abbottov ARCHITECT c8000 analizator (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD).

Turbidimetrija je optička analitička metoda koja se koristi određivanje koncentracije ukupnih proteina i albumina suspendiranih u otopini u obliku sitnih čestica. Provodi se fotoelektričnim mjerenjem intenziteta svjetlosti propuštene kroz suspenziju. Osim o koncentraciji čestica u suspenziji, intenzitet propuštene svjetlosti ovisi o veličini i obliku čestica te o omjeru indeksa loma čestica i okolnoga medija. Za turbidimetrijsko mjerenje potrebno je izraditi baždarnu krivulju, jer ovisnost intenziteta propuštene svjetlosti o koncentraciji čestica nije linearna. Poliklonalna antitijela na albumin u reagensu se vežu s albuminom u uzorku mokraće te stvaraju netopljive agregate koji povećavaju zamućenost otopine. Stupanj zamućenosti proporcionalan je koncentraciji albumina u mokraći. Proteini prisutni u mokraći denaturiraju se pomoću benzetonij klorida, pri čemu se stvara suspenzija koja se kvantificira turbidimetrijski na 404 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku.

Amilaza se određuje fotometrijskom metodom. Amilaza hidrolizira etiliden-4-NP-G7, pri čemu nastaje 4,6-nitrofenil-alfa-(1,4)-glukopiranozil-G(7-x). On se zatim hidrolizira u monomere glukoze i kromofor 4-nitrofenol pomoću  $\alpha$ -glukozidaze. Promjena apsorbancije pri 404 nm proporcionalna je aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u uzorku.

Natrij, kalij i kloridi određuju se indirektnom potenciometrijom. Tom se metodom određuje koncentracija slobodnih iona u uzorcima koje je potrebno razrijediti odgovarajućim diluentom. Određivanje se temelji na uspoređivanju potencijala nepoznate otopine s potencijalom standardne otopine poznate aktivnosti, a razlika potencijala između dviju elektroda posljedica je različite brzine difuzije iona ovisno o njihovoj koncentraciji i vrsti.

Kalcij se određuje fotometrijom s arsenazo III bojom koja reagira s kalcijem u kiseloj otopini, pri čemu nastaje plavo-ljubičasti kompleks. Intenzitet boje mjeri se na 660 nm i proporcionalan je koncentraciji kalcija u uzorku.

Anorganski fosfati određuju se fotometrijom s amonijevim molibdatom. U reakciji nastaje amonij-fosfomolibdat čija je koncentracija izravno proporcionalna koncentraciji anorganskog fosfata u uzorku i mjeri se fotometrijski na 340 nm.

Magnezij se određuje fotometrijskom metodom s izocitrat dehidrogenazom. To je enzimska metoda, a magnezij u uzorku ima ulogu kofaktora u enzimskoj reakciji s izocitrat dehidrogenazom. Porast apsorbancije na 340 nm uslijed nastanka NADPH proporcionalan je koncentraciji magnezija.

Kreatinin se određuje fotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji kreatinina s alkalnim pikratom. U reakciji nastaje crvenonarančasto obojenje koje uzrokuje promjenu apsorbancije. Brzina promjene apsorbancije pri 500 nm proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku.

Ureja se određuje fotometrijskom metodom s ureazom i glutamat-dehidrogenazom (GLDH). To je enzimska metoda u kojoj dolazi do hidrolize ureje u uzorku pod utjecajem ureaze. Navedenom reakcijom nastaju amonijak i ugljikov dioksid. Nastali amonijak reagira s  $\alpha$ -ketoglutaratom uz katalitičko djelovanje glutamat dehidrogenaze pri čemu nastaje glutaminska kiselina, a istovremeno se NADH oksidira do  $\text{NAD}^+$ . Pad apsorbancije na 340 nm proporcionalan je koncentraciji ureje u uzorku.

Mokraćna se kiselina također određuje fotometrijskom metodom. U reakciji urikaza oksidira mokraćnu kiselinu u allantoin uz stvaranje vodikova peroksida. Nastali vodikov

peroksid reagira s 4-aminoantipirinom i dinatrijevom soli u prisutnosti peroksidaze pri čemu daje kinonimin boju. Povećanje apsorbancije na 604 nm proporcionalno je koncentraciji mokraćne kiseline u uzorku.

Koncentracija mjerenih analita u 24-satnoj mokraći automatski se izračunava pomoću formule:

$$\text{Analit u 24h mokraći} = \text{konc. elektrolita u mokraći} \times \text{volumen dU},$$

pri čemu je volumen dU volumen 24 satne mokraće.

### 3.4 Statistička obrada podataka

Sva su mjerenja načinjena u duplikatu. Koncentracija analita izračunata je kao aritmetička sredina dvaju mjerenja. Za svaku koncentraciju interferenta ( $C_{1-6}$ ) izračunato je odstupanje (bias) u odnosu na uzorak bez interferencije ( $C_0$ ) prema formuli:

$$\text{Bias } (C_{1-6}) = \frac{(C_{1-6}) - C_0}{C_0}$$

Kao granice prihvatljivosti navedenih odstupanja za svaku su pretragu uzeti analitički koeficijenti varijacije dobiveni u Kliničkom zavodu za kemiju (Tablica 5). Utjecaj interferencije smatra se značajnim ukoliko je dobiveno odstupanje veće od navedenog koeficijenta varijacije.

Tablica 5 Kriteriji prihvatljivosti

Analit	Kriterij prihvatljivosti (analitički koeficijent varijacije)
Ukupni proteini	2,5
Albumin	4,0
Amilaza	3,1
Natrij	2,3
Kalij	2,2
Kloridi	2,1
Kalcij	1,5
Anorganski fosfati	1,8
Magnezij	1,0
Kreatinin	2,6
Ureja	2,2
Mokraćna kiselina	1,7

Podaci su prikupljeni i analizirani u programu Microsoft Excel.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Rezultati

#### 4.1.1 REZULTATI ISPITIVANJA INTERFERENCIJE ASKORBINSKE KISELINE

Tablica 6 Rezultati ispitivanja interferencije askorbinske kiseline

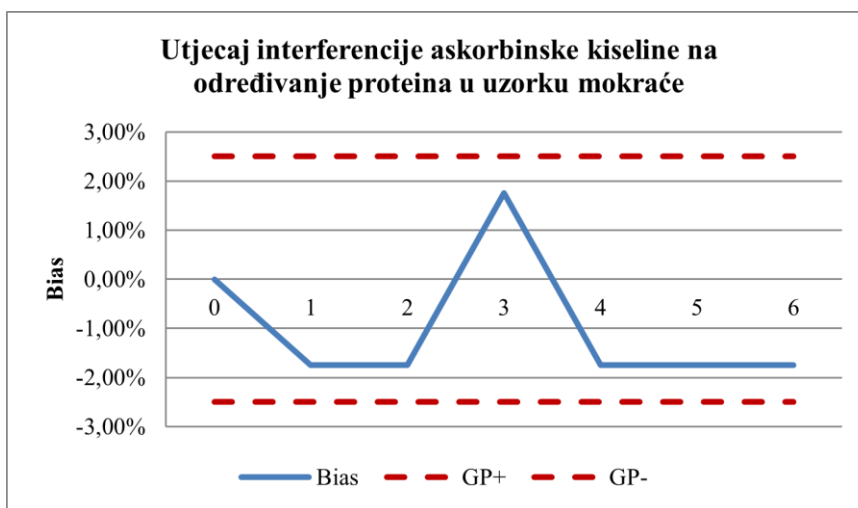
C <sub>ask. kiselina</sub> /(g/L)	C <sub>0</sub> = 0	C <sub>1</sub> = 0,2	C <sub>2</sub> = 0,4	C <sub>3</sub> = 0,5	C <sub>4</sub> = 1	C <sub>5</sub> = 2	C <sub>6</sub> = 5
Ukupni proteini (mg/L)	285	280	280	290	280	280	280
Bias (%)	0,00	-1,75	-1,75	1,75	-1,75	-1,75	-1,75
Albumin (mg/L)	202,5	197,0	198,5	200,0	197,5	195,0	196,5
Bias (%)	0,00	-2,72	-1,98	-1,23	-2,47	-3,70	-2,96
Amilaza (U/L)	37,5	37,5	37,5	38,0	38,5	37,5	36,5
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	1,33	2,67	0,00	-2,67
Natrij (mmol/L)	58,0	58,5	58,5	58,0	58,0	58,0	58,0
Bias (%)	0,00	0,86	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00
Kalij (mmol/L)	19,50	19,55	19,55	19,60	19,55	19,60	19,50
Bias (%)	0,00	0,26	0,26	0,51	0,26	0,51	0,00
Kloridi (mmol/L)	53	53	54	54	55	58	64
Bias (%)	0,00	0,00	1,89	1,89	3,77	9,43	20,75
Kalcij (mmol/L)	0,60	0,60	0,60	0,65	0,60	0,65	0,60
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	8,33	0,00	8,33	0,00
Anorganski fosfati (mmol/L)	3,20	3,20	3,20	3,25	3,25	3,20	3,20
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	1,56	1,56	0,00	0,00

Magnezij (mmol/L)	1,40	1,50	1,40	1,40	1,40	1,45	1,40
Bias (%)	0,00	7,14	0,00	0,00	0,00	3,57	0,00
Kreatinin (mmol/L)	2,6	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5
Bias (%)	0,00	-1,96	-1,96	0,00	-1,96	-1,96	-1,96
Ureja (mmol/L)	86,30	85,65	87,95	86,65	86,30	84,80	87,05
Bias (%)	0,00	-0,75	1,91	0,41	0,00	-1,74	0,87
Mokraćna kiselina (mmol/L)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

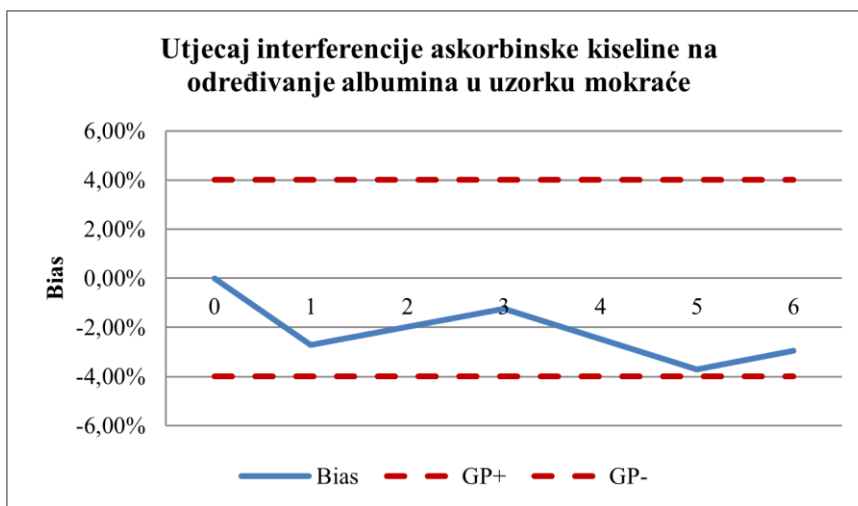
#### 4.1.2 UTJECAJ INTERFERENCIJE ASKORBINSKE KISELINE NA PRETRAGE U MOKRAĆI

Utjecaj interferencije askorbinske kiseline na pretrage u mokraći prikazan je i pomoću sljedećih grafičkih prikaza. Oznake na grafičkim prikazima 0-6 označavaju broj uzorka, prema tablicama 3 i 4. Granice prihvatljivosti označene su oznakama GP+ i GP-.

Povišena askorbinska kiselina nije interferirala u određivanju ukupnih proteina, albumina i amilaze u uzorku mokraće.

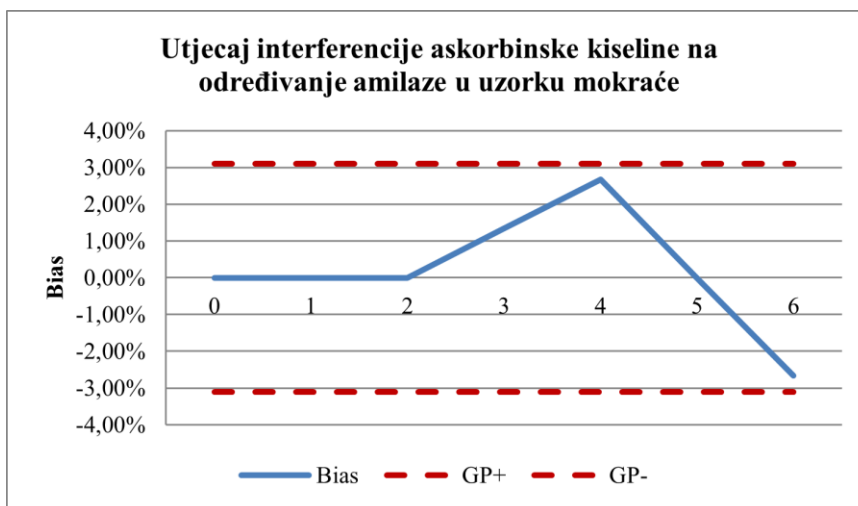


Slika 4 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje proteina u uzorku mokraće



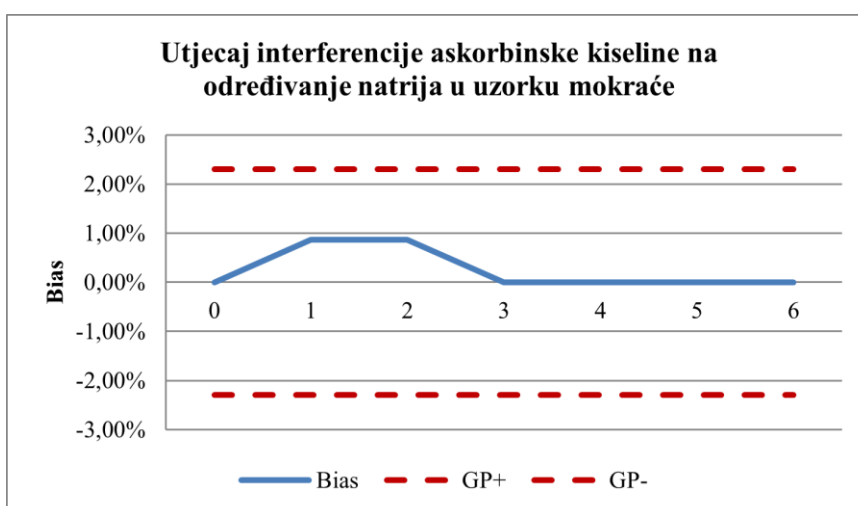
Slika 5 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje albumina u uzorku mokraće



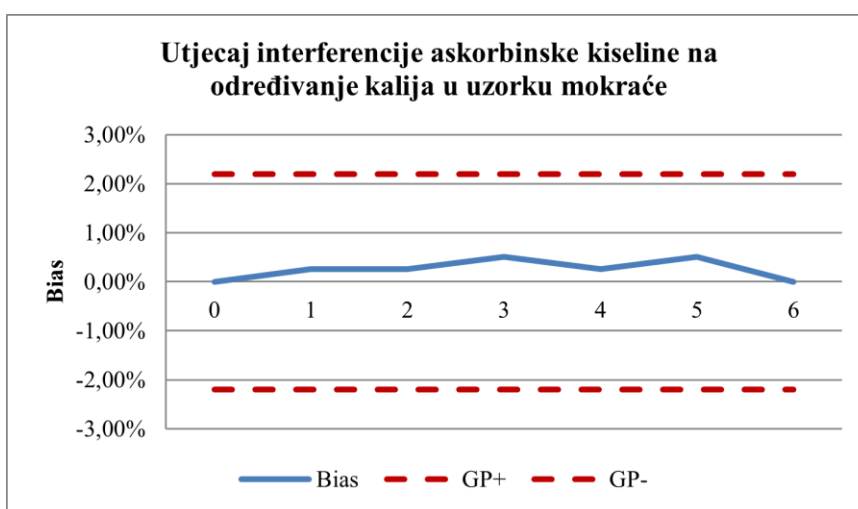


Slika 6 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje amilaze u uzorku mokraće

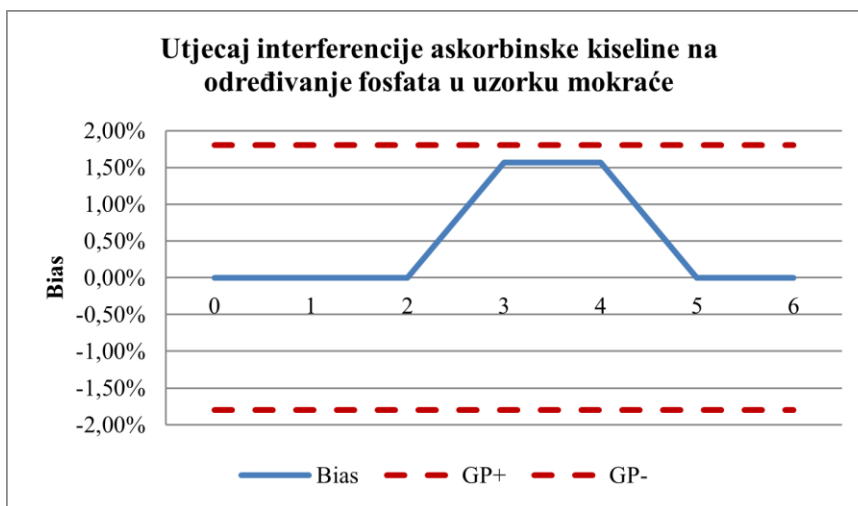
Što se tiče interferencije askorbinske kiseline u određivanju elektrolita, askorbinska kiselina nije pokazala klinički značajnu interferenciju u određivanju natrija, kalija i fosfata.



Slika 7 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje natrija u uzorku mokraće

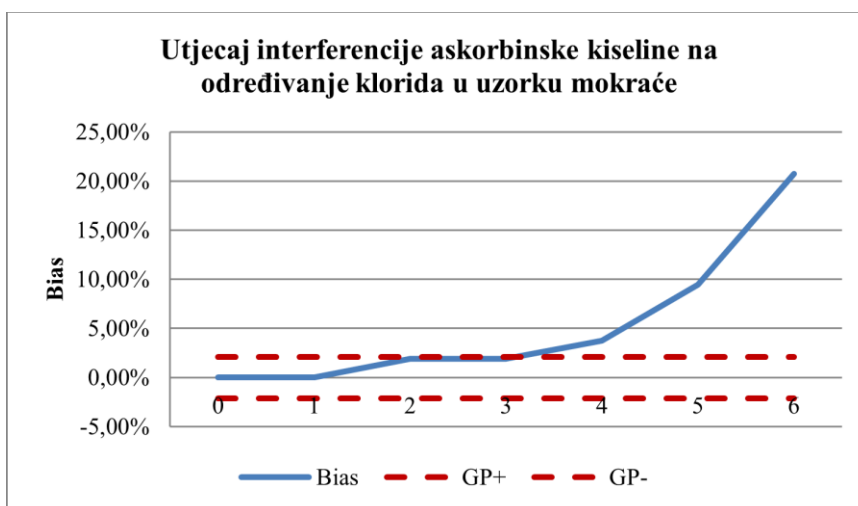


Slika 8 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje kalija u uzorku mokraće



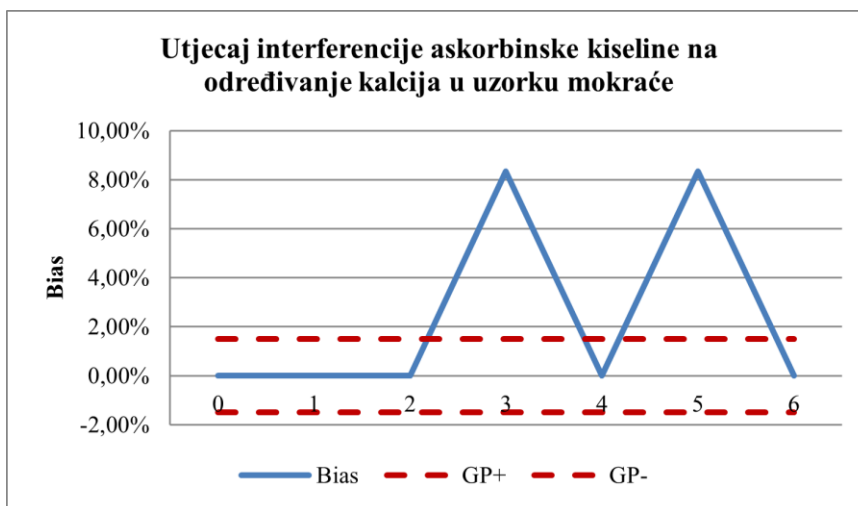
Slika 9 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje fosfata u uzorku mokraće

Značajne interferencije askorbinske kiseline utvrđene su za kloride, kalcij i magnezij. Askorbinska je kiselina najznačajniju interferenciju pokazala pri određivanju koncentracije klorida u uzorku mokraće. Već pri koncentraciji askorbinske kiseline od 1 g/L izmjereno odstupanje bilo je veće od kriterija prihvatljivosti. Iz grafičkog je prikaza vidljivo da s povećanjem koncentracije askorbinske kiseline u uzorku raste utjecaj interferencije na rezultat analize, što je vidljivo po porastu biasa koji pri najvišoj testiranoj koncentraciji askorbinske kiseline iznosi > 20%.

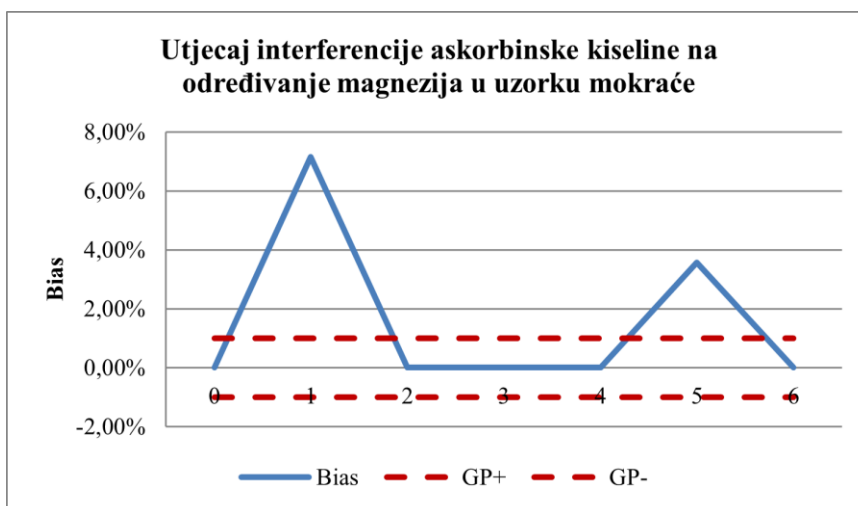


Slika 10 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje klorida u uzorku mokraće

Za razliku od odstupanja pri određivanju kloridnih iona, interferencija koju je askorbinska kiselina uzrokovala pri određivanju koncentracije kalcijevih i magnezijevih iona nije kontinuirana. Askorbinska kiselina uzrokuje povišenu koncentraciju kalcija i magnezija, ali je iz grafičkih prikaza teško zaključiti na koji način pojedina koncentracija interferenta uzrokuje odstupanje.

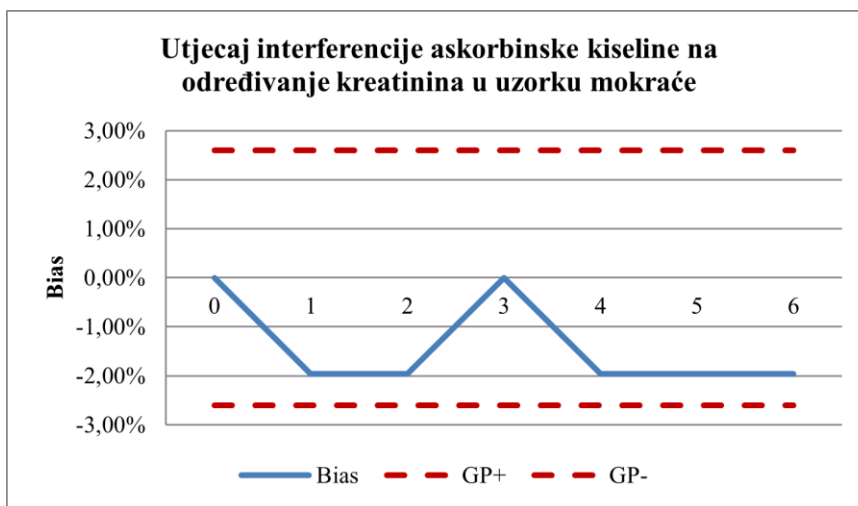


Slika 11 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje kalcija u uzorku mokraće

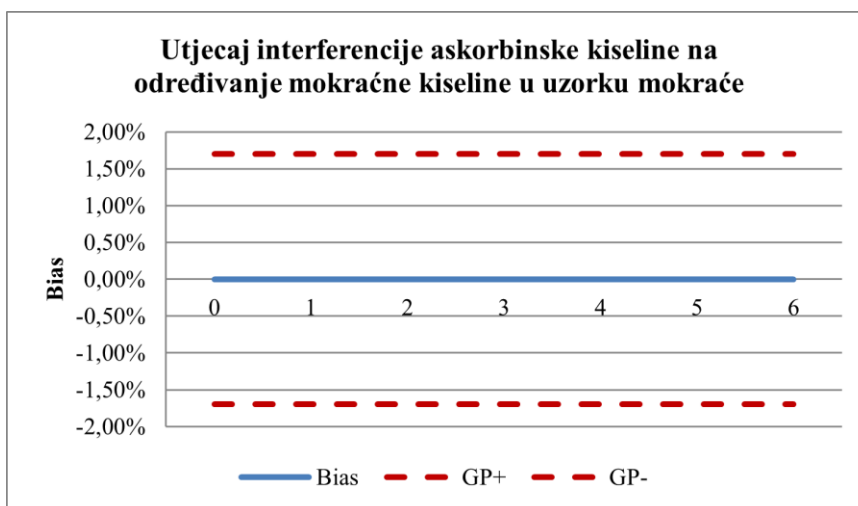


Slika 12 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje magnezija u uzorku mokraće

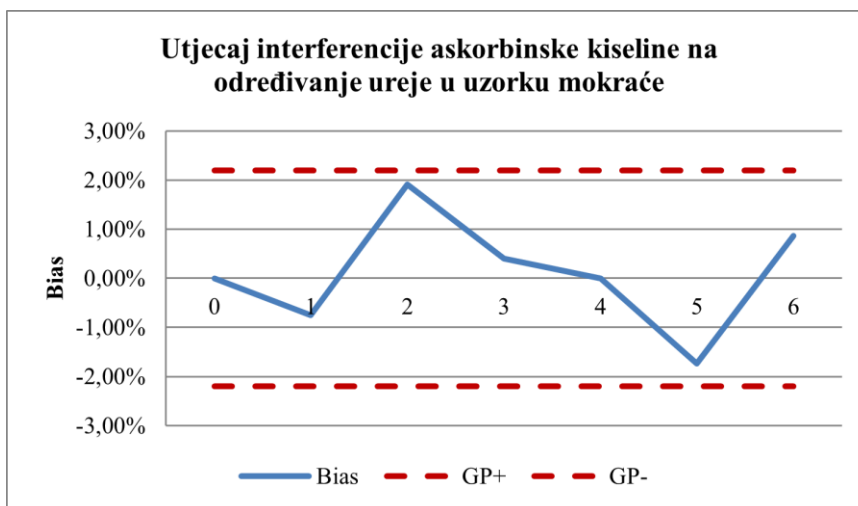
Askorbinska je kiselina dobro poznati interferirajući spoj u biokemijskim testovima koji uključuju indikatorske sustave s oksidazama i peroksidazama. Iako je zbog značajne redukcijske sposobnosti askorbinske kiseline bilo za očekivati da bi ista mogla uzrokovati promijenjene koncentracije kreatinina i mokraćne kiseline, askorbinska kiselina nije uzrokovala klinički značajnu interferenciju pri određivanju neproteinskih dušikovih spojeva.



Slika 13 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje kreatinina u uzorku mokraće



Slika 14 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje mokraćne kiseline u uzorku mokraće



Slika 15 Grafički prikaz utjecaja interferencije askorbinske kiseline na određivanje ureje u uzorku mokraće

#### 4.1.3 REZULTATI ISPITIVANJA INTERFERENCIJE GLUKOZE

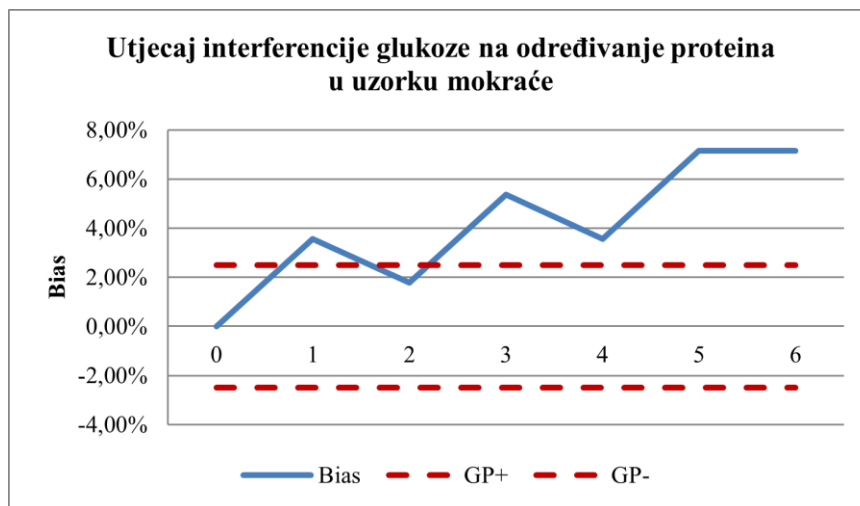
Tablica 7 Rezultati ispitivanja interferencije glukoze

C <sub>glukoza</sub> /(mmol/L)	C <sub>0</sub> = 0	C <sub>1</sub> = 10	C <sub>2</sub> = 20	C <sub>3</sub> = 30	C <sub>4</sub> = 40	C <sub>5</sub> = 50	C <sub>6</sub> = 60
Ukupni proteini (mg/L)	280	290	285	295	290	300	300
Bias (%)	0,00	3,57	1,79	5,36	3,57	7,14	7,14
Albumin (mg/L)	203,5	204,0	203,5	202,0	206,5	203,5	205,5
Bias (%)	0,00	0,25	0,00	-0,74	1,47	0,00	0,98
Amilaza (U/L)	38,0	38,5	38,5	38,5	39,0	39,0	38,5
Bias (%)	0,00	1,32	1,32	1,32	2,63	2,63	1,32
Natrij (mmol/L)	58,5	58,5	58,0	59,0	58,5	59,0	59,0
Bias (%)	0,00	0,00	-0,85	0,85	0,00	0,85	0,85
Kalij (mmol/L)	19,65	19,75	19,75	19,80	19,75	19,90	19,95
Bias (%)	0,00	0,51	0,51	0,76	0,51	1,27	1,53
Kloridi (mmol/L)	53,0	53,0	53,0	53,0	53,5	53,5	54,0
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,94	1,89
Kalcij (mmol/L)	0,60	0,65	0,60	0,65	0,70	0,70	0,70
Bias (%)	0,00	8,33	0,00	8,33	16,67	16,67	16,67
Anorganski fosfati (mmol/L)	3,30	3,30	3,30	3,25	3,25	3,30	3,30
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	-1,52	-1,52	0,00	0,00
Magnezij (mmol/L)	1,50	1,55	1,50	1,50	1,50	1,55	1,55
Bias (%)	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	3,33	3,33
Kreatinin (mmol/L)	2,5	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Bias (%)	0,00	0,00	2,00	4,00	2,00	4,00	4,00

Ureja (mmol/L)	90,00	91,90	96,80	91,25	90,90	94,80	93,55
Bias (%)	0,00	2,11	7,56	1,39	1,00	5,33	3,94
Mokraćna kiselina (mmol/L)	0,90	0,90	0,90	0,95	0,95	1,00	1,00
Bias (%)	0,00	0,00	0,00	5,56	5,56	11,11	11,11

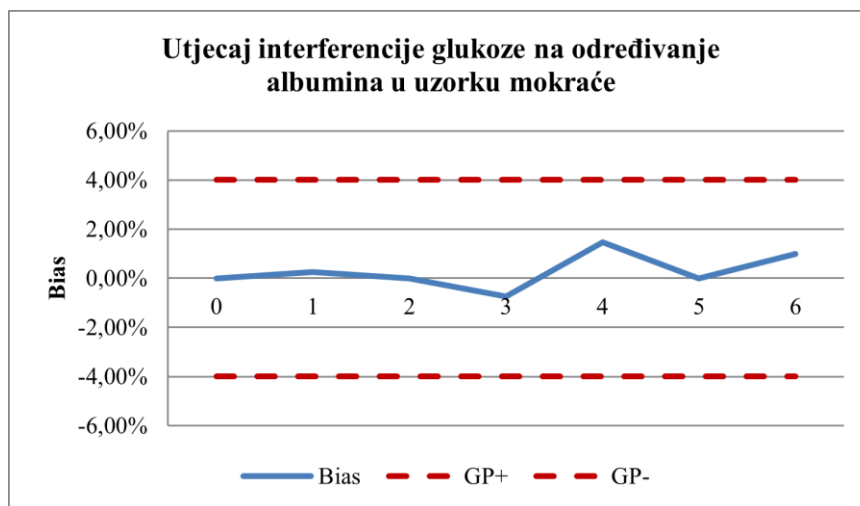
#### 4.1.4 UTJECAJ INTERFERENCIJE GLUKOZE NA PRETRAGE U MOKRAĆI

Povišena koncentracija glukoze pokazala je utjecaj na određivanje proteina u uzorku mokraće, pri čemu je dodatak glukoze u uzorke uzrokovao povišenje vrijednosti mjerenog analita.



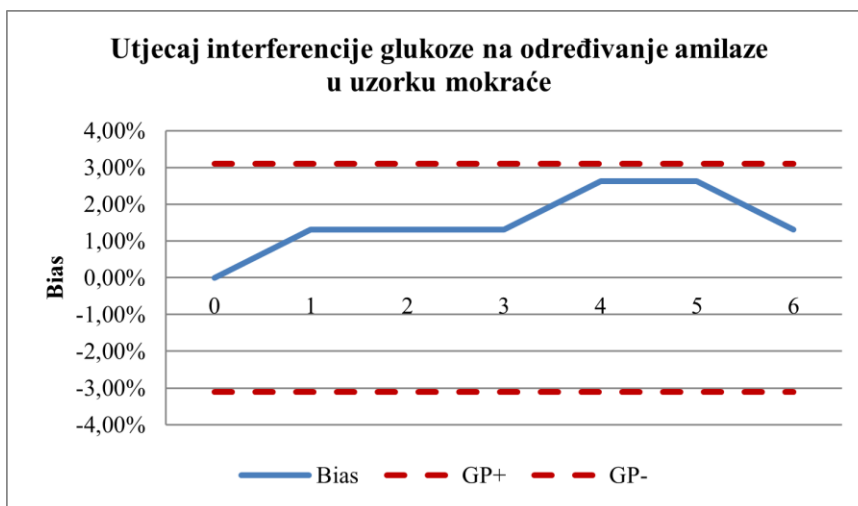
Slika 16 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje proteina u uzorku mokraće

Prema istraživanju provedenom 2016. godine utvrđeno je da koncentracija albumina raste s povećanjem koncentracije glukoze u uzorku (Chudar i sur., 2016). Međutim, ovo je istraživanje pokazalo da povišene koncentracije glukoze ne utječu na određivanje koncentracije albumina.



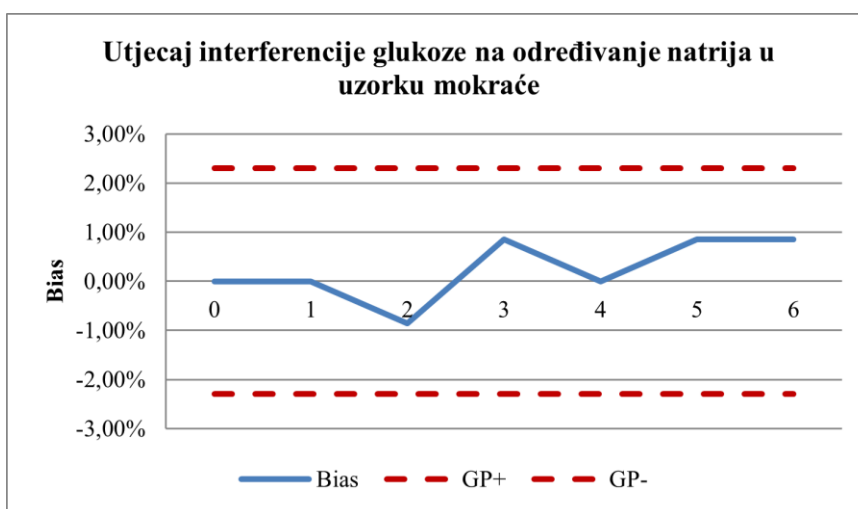
Slika 17 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje albumina u uzorku mokraće

Dodatak glukoze u uzorke mokraće nije uzrokovao klinički značajna odstupanja niti kod određivanja amilaze.



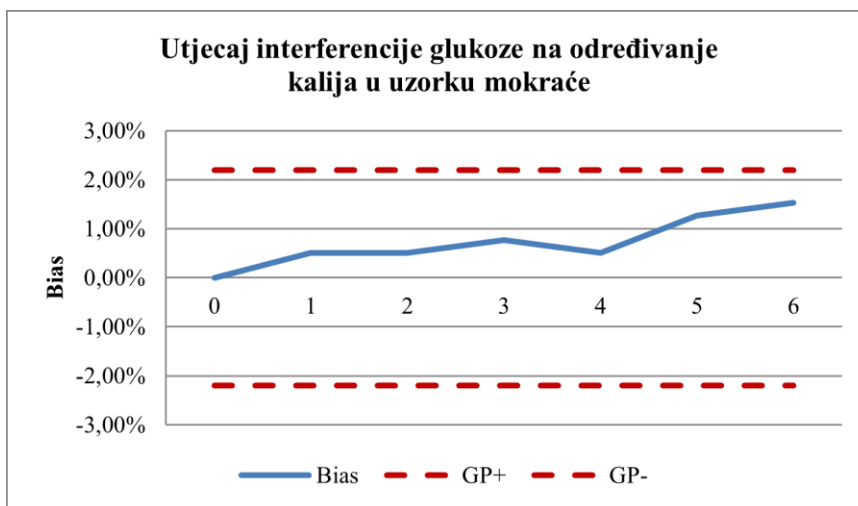
Slika 18 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje amilaze u uzorku mokraće

Kod određivanja elektrolita rezultati istraživanja ponovno se razlikuju ovisno o određivanom analitu. Iako su prethodna istraživanja pokazala da visoke koncentracije glukoze značajno ometaju određivanje natrijevih i kloridnih iona putem indirektna ISE (Grzegorzewska i sur., 2001), dodatak interferenta glukoze u ovom istraživanju nije imao utjecaja na određivanje natrija, kalija, klorida i fosfata, dok je kod određivanja koncentracije kalcijevih i magnezijevih iona vidljiv utjecaj interferencije na rezultate analize.

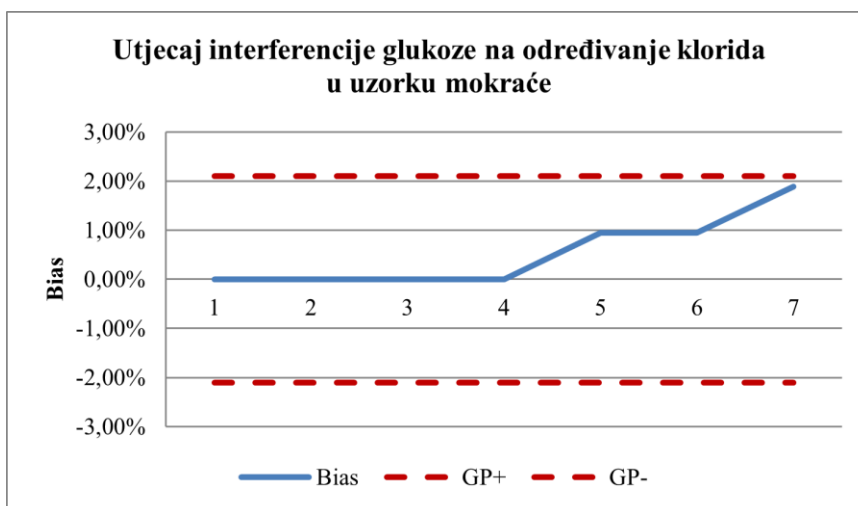


Slika 19 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje natrija u uzorku mokraće

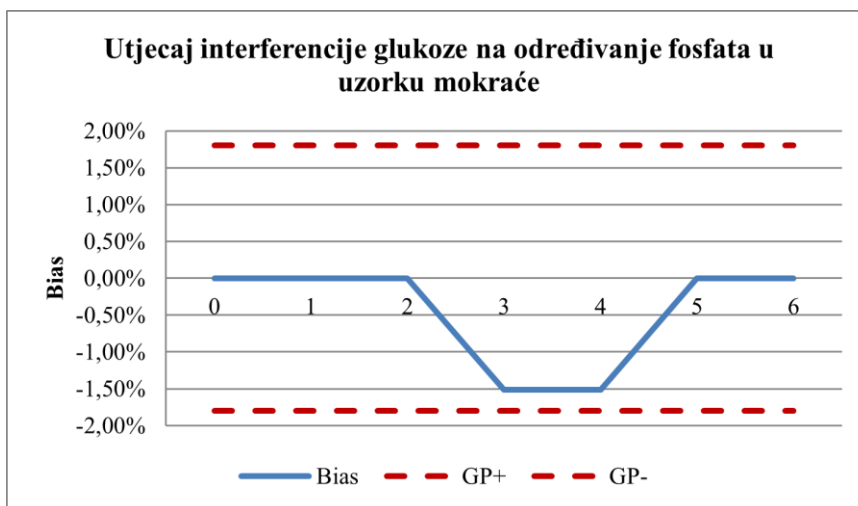




Slika 20 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje kalija u uzorku mokraće



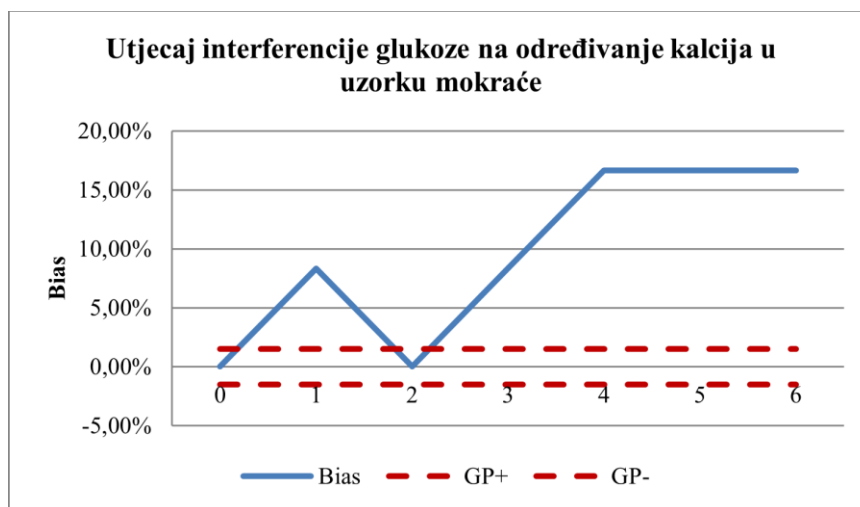
Slika 21 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje klorida u uzorku mokraće



Slika 22 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje fosfata u uzorku mokraće

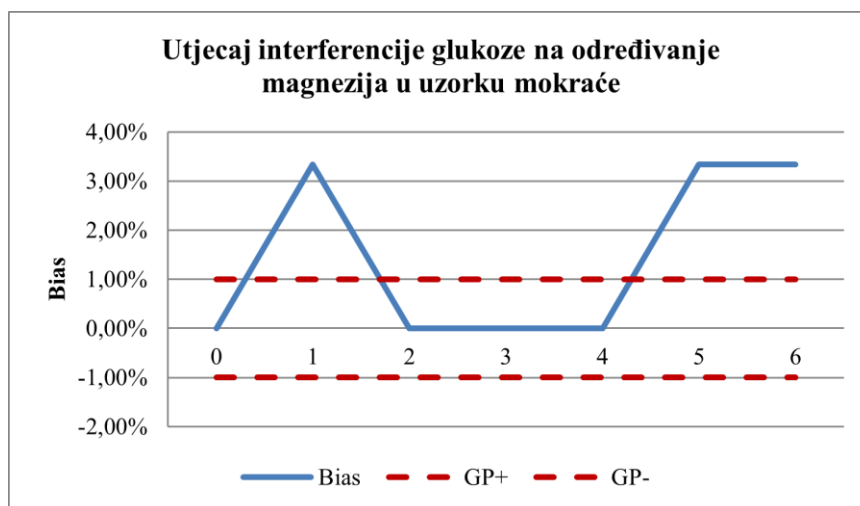
Jedno od provedenih istraživanja pokazalo je da dodatak glukoze ima negativan utjecaj na određivanje koncentracije kalcija (Chudar i sur., 2016), dok je ovo istraživanje pokazalo

drugačije rezultate. Iz grafičkog je prikaza vidljivo da s povećanjem koncentracije interferenta, raste i izmjerena koncentracija kalcija, a značajna interferencija uočena je pri najnižoj testiranoj koncentraciji glukoze.



Slika 23 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje kalcija u uzorku mokraće

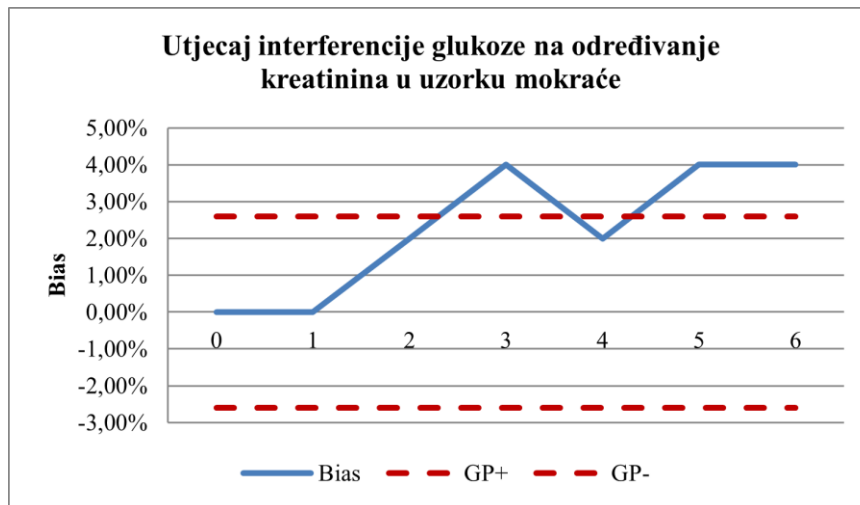
Što se tiče određivanja magnezija u uzorku mokraće, iz grafa se uočava odstupanje izvan granica prihvatljivosti bez linearnog porasta. U uzorcima s glukozom kod kojih je primijećeno odstupanje izmjerena je veća koncentracija magnezija nego u matičnom uzorku.



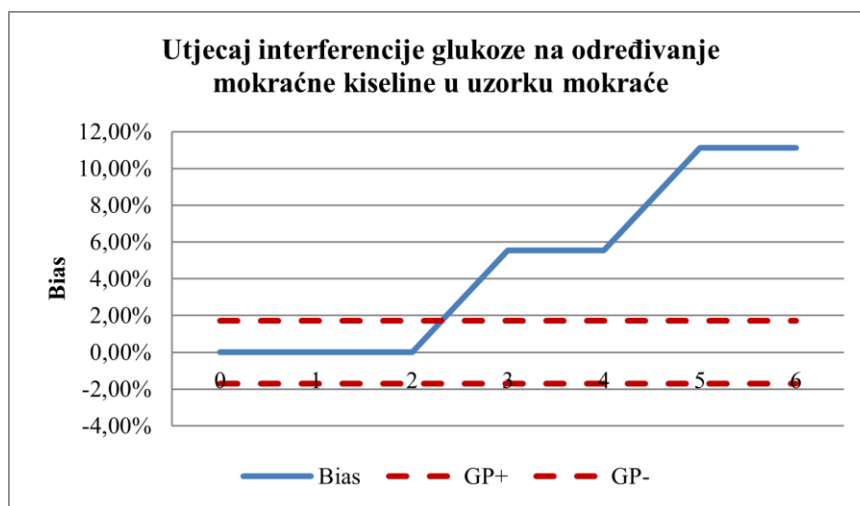
Slika 24 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje magnezija u uzorku mokraće

Prethodna su istraživanja pokazala da povišene koncentracije glukoze u biološkim uzorcima najviše utječu na određivanje koncentracije kreatinina. Kao što je očekivano, povišena je koncentracija glukoze utjecala na rezultate analize i u ovom istraživanju. Kao što su i prethodna istraživanja pokazala, interferencija glukoze na određivanje kreatinina i mokraćne kiseline pokazuje rastući pozitivan bias koji raste s porastom

koncentracije glukoze. Povišena koncentracija glukoze uzrokuje značajno odstupanje prilikom određivanja koncentracije kreatinina pri koncentraciji glukoze > 30 mmol/L.

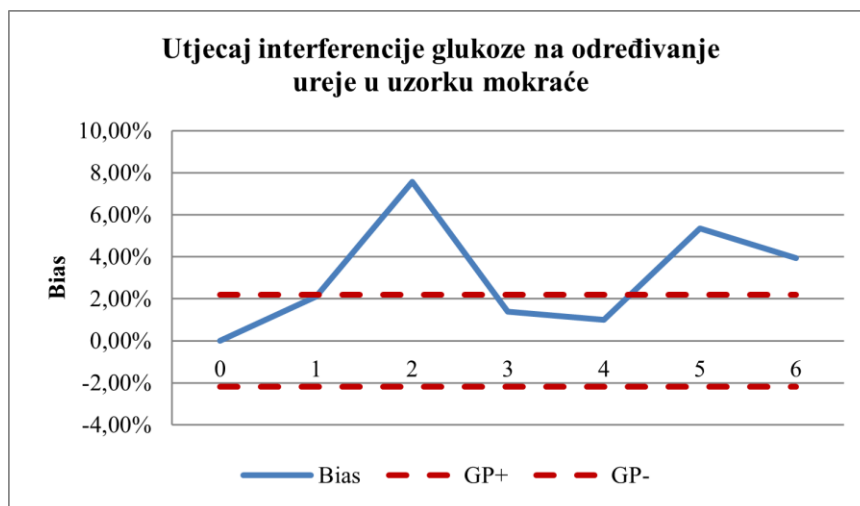


Slika 25 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje kreatinina u uzorku mokraće



Slika 26 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje mokraćne kiseline u uzorku mokraće

Glukoza je interferirala i s određivanjem ureje u uzorku mokraće te je uzrokovala povećanje koncentracije ureje naspram one izmjerene u uzorku u kojem interferent nije bio prisutan.



Slika 27 Grafički prikaz utjecaja interferencije glukoze na određivanje ureje u uzorku mokraće

## 4.2 Rasprava

### 4.2.1 ASKORBINSKA KISELINA

Dodatak askorbinske kiseline u uzorak mokraće nije utjecao na određivanje koncentracije ukupnih proteina, albumina, amilaze, natrija, kalija, fosfata, kreatinina, mokraćne kiseline i ureje, dok je interferencija zamijećena kod određivanja kloridnih, kalcijevih i magnezijevih iona.

Budući da se koncentracija askorbinske kiseline u mokraći ne određuje rutinski prilikom analize ovog uzorka, njezin potencijalni utjecaj na rezultate pretraga često može ostati neprepoznat. Prema smjernicama Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, jedno od pitanja koje bi se trebalo postaviti pacijentima prije uzorkovanja određenih vrsta uzoraka za određene pretrage glasi: Koristite li vitamine, dodatke prehrani, biljne ili prirodne lijekove? Pod obrazloženjem je objašnjeno da dodaci prehrani mogu imati analitički utjecaj na mjerenje, primjerice vitamin C na test za fekalno okultno krvarenje, a riboflavin na kemijsku analizu mokraće test trakom (<https://www.hdmbim.hr/>). Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da bi se navedeno pitanje trebalo postavljati pacijentima i prije uzorkovanja mokraće za određivanja kloridnih, kalcijevih i magnezijevih iona, budući da je primijećen utjecaj povišenih koncentracija vitamina C u mokraći na određivanje navedenih analita.

#### 4.2.2 GLUKOZA

Povišena koncentracija glukoze u uzorcima nije interferirala s određivanjem albumina, amilaze, natrija, kalija, klorida i fosfata, ali je klinički značajno odstupanje primijećeno kod određivanja proteina, kalcija, magnezija i neproteinskih dušikovih spojeva – kreatinina, ureje i mokraćne kiseline.

Za razliku od askorbinske kiseline, koncentracija glukoze u mokraći određuje se mnogo češće, ali ne određuje se rutinski kod svake analize uzoraka mokraće. S obzirom na rezultate ovog istraživanja, određivanje koncentracije glukoze u mokraći trebalo bi se raditi prilikom svake analize uzoraka mokraće pacijenata s dijagnosticiranom šećernom bolešću kako bi se potencijalni utjecaj povišenih koncentracija glukoze na rezultate parametara kod kojih je utvrđen utjecaj interferencije uzeo u obzir prilikom tumačenja nalaza.

## 5 ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja nisu pokazali statistički značajno odstupanje ni za jedan ispitivani interferent prema definiranim kriterijima prihvatljivosti za određivanje koncentracije albumina, amilaze, natrija, kalija i fosfata.

Askorbinska je kiselina pokazala značajan utjecaj interferencije na određivanje kloridnih, kalcijevih i magnezijevih iona. S druge strane, povišena koncentracija glukoze interferirala je s određivanjem proteina, kalcija, magnezija i neproteinskih dušikovih spojeva – kreatinina, ureje i mokraćne kiseline.

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja zaključujemo da je potreban dodatan oprez kod tumačenja laboratorijskih nalaza pacijenata koji koriste askorbinsku kiselinu kao dodatak prehrani i kod pacijenata s nekontroliranom šećernom bolešću za parametre kod kojih je dokazan utjecaj interferencije.

## 6 POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ATP – adenzin trifosfat

CRP – C-reaktivni protein

GGT – gama glutamil transferaza

GLDH – glutamat-dehidrogenaza

hCG – humani koriontski gonadotropin

HDL – engl. *high density lipoprotein*, lipoprotein visoke gustoće

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

ISE – ionselektivna elektroda

KIM-1 – engl. *kidney injury molecule-1*, molekula ozljede bubrega-1

LSD – dietilamid lizerginske kiseline

NADH, NAD<sup>+</sup> – nikotinamid adenin dinukleotid

NGAL – *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, lipokalin povezan s neutrofilnom želatinazom

## 7 LITERATURA

Brunzel NA. Fundamentals of urine & body fluid analysis, Elsevier, St. Louis, 2018, str. 18-67, 85-125

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Urinalysis: approved guideline, ed 3, CLSI Document GP16-A3, CLSI, Wayne, PA, 2009.

Çuhadar S, Köseoğlu M, Çinpolat Y, Buğdaycı G, Usta M, Semerci T. The effect of extremely high glucose concentrations on 21 routine chemistry and thyroid Abbott assays: interference study. *Biochem Med*, 2016, 26, 53-60.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 55-83, 176-215, 245-313, 472-504

Guyton AC. Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti, Zagreb, Medicinska naklada 1995, str. 186-236

Hemamalini R. Effect of hemolysis and high glucose concentration on routine chemistry analytes and thyroid assay, doktorski rad, Stanley Medical College, Chennai, 2020

Nikolac Gabaj N. i sur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 8-39.

Nikolac Gabaj N, Miler M, Unic A, Milevoj Kopcinovic L, Vrtaric A, Culej J. Ascorbic acid in urine still compromises urinalysis results. *Ann Clin Biochem* 2020;57:64-8. doi: 10.1177/0004563219882051.

Unic A, Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J, Lisac A, Horvat A, Vrkic N. Ascorbic acid – black hole of urine chemistry screening. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22390. doi: 10.1002/jcla.22390.

Rave K. i sur. Renal glucose excretion as a function of blood glucose concentration in subjects with type 2 diabetes – results of a hyperglycaemic glucose clamp study, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 21, Issue 8, 2006, 2166-2171 .

Saibaba, KSS, Bhaskar, MV, Rao, PVLNS i sur. Interferences in clinical chemistry analysis. *Indian J Clin Biochem* 13, 55–62, 1998

<https://www.hdmbim.hr/images/preporuke/Nacionalne-preporuke-za-uzorkovanje-venske-krvi.pdf>, pristupljeno, 8.6.2023.



<https://medlineplus.gov/>, pristupljeno 25.4.2023.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-Acid>, pristupljeno: 28.4.2023.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5793>, pristupljeno 30.4.2023.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912005003383?via%3Dihub>, pristupljeno, 28.4.2023.

## 8 SAŽETAK

Analiza mokraće jedan je od najčešće korištenih dijagnostičkih postupaka, a osim u dijagnostici koristi se kao uzorak izbora za probir različitih bolesti te u praćenju tijeka bolesti i uspješnosti terapije.

Interferencije su glavni izvor predanalitičkih pogrešaka u laboratorijskoj medicini. Prisutnost različitih egzogenih ili endogenih tvari može ometati mjerenje i dovesti do lažno povišenih ili lažno sniženih rezultata kemijske analize zbog čega je potrebno za svaku pretragu poznavati moguće interferencije kako bi se izbjeglo izdavanje neispravnih nalaza i usmjeravanje dijagnostike u krivom smjeru.

Askorbinska je kiselina snažan redukcijski i antioksidativni agens te najčešće korišteni vitaminski dodatak prehrani. To je kemijski aktivna molekula koja se lako apsorbira iz probavnog trakta i brzo raspoređuje u tjelesna tkiva. Budući da vitamin C pripada skupini vitamina topljivih u vodi, ako se unese u suvišku brzo se nepromijenjen eliminira iz organizma putem mokraće. Posljedično, mokraća takvih pacijenata sadržava veću koncentraciju ovog vitamina od uobičajene. Zbog svoje reduktivne sposobnosti askorbinska je kiselina poznati interferirajući spoj u biokemijskim testovima koji uključuju indikatorske sustave s oksidazama i peroksidazama. Ovi se testovi koriste pri mjerenju glukoze, ukupnog kolesterola, triglicerida i mokraćne kiseline, a askorbinska kiselina također može interferirati u određivanju bilirubina, fosfata, ureje, kreatinina i različitih enzima.

S druge strane, šećerna je bolest najbrže rastuća kronična bolest u svijetu. Kod nekontrolirane šećerne bolesti, koncentracija glukoze u krvi kontinuirano je visoka, što rezultira pojačanim izlučivanjem glukoze putem bubrega. Glukoza je monosaharid za koji je poznato da može imati utjecaj na različite metode kemijske analize. Najpoznatija je interferencija glukoze u određivanju kreatinina Jaffeovom metodom, ali interferencija je do sad uočena i prilikom određivanja albumina i pojedinih elektrolita.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječu li povišene koncentracije askorbinske kiseline i glukoze na laboratorijske pretrage u mokraći. Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice. Za istraživanje je korišten nasumično odabrani uzorak 24 satne mokraće, a parametri koje smo određivali su ukupni proteini, albumin, amilaza, natrij, kalij, kloridi, kalcij, anorganski fosfati, magnezij, kreatinin, ureja i mokraćna kiselina. Pripremljeno je 7 uzoraka različite koncentracije dodanog interferenta. Askorbinska je kiselina pripremljena u koncentracijama 0, 0,2, 0,4, 0,5, 1, 2 i 5 g/L, a glukoza u koncentracijama 0, 10,

20, 30, 40, 50 i 60 mmol/L. Sva mjerenja rađena su u duplikatu, za statističku analizu korišten je program Microsoft Excel.

Rezultati istraživanja nisu pokazali statistički značajno odstupanje prema definiranim kriterijima prihvatljivosti za određivanje koncentracije albumina, amilaze, natrija, kalija i fosfata. Međutim, askorbinska je kiselina interferirala u određivanju kloridnih, kalcijevih i magnezijevih iona. S druge strane, povišena koncentracija glukoze interferirala je s određivanjem proteina, kalcija, magnezija, kreatinina, ureje i mokraćne kiseline.

Na temelju dobivenih rezultata zaključujemo da rezultate analize određenih parametara kod pacijenata koji imaju povišene koncentracije glukoze i/ili askorbinske kiseline u mokraći treba tumačiti s oprezom.

## **SUMMARY**

Urine analysis is one of the most used diagnostic procedures, and in addition to being diagnostic tool, it is used as the sample of choice for screening various diseases, in monitoring the course of the disease and treatment progress.

Interferences are a major source of preanalytical errors in laboratory medicine. The presence of various exogenous or endogenous substances can interfere with the measurement and lead to falsely elevated or falsely reduced results of chemical analysis, which is why it is necessary to know possible interferences for each test to avoid issuing incorrect laboratory reports and directing diagnostics in the wrong direction.

Ascorbic acid is a powerful reducing and antioxidant agent and the most commonly used vitamin food supplement. It is a chemically active molecule that is easily absorbed from the digestive tract and rapidly distributed to body tissues. Since vitamin C belongs to the group of water-soluble vitamins, if taken in excess, it is quickly eliminated unchanged from the body through the urine. Consequently, the urine of such patients contains a higher concentration of this vitamin than usual. Due to its reductive ability, ascorbic acid is a known interfering compound in biochemical tests that include indicator systems with oxidases and peroxidases. These tests are used to measure glucose, total cholesterol, triglycerides and urate, while ascorbic acid can also interfere with the determination of bilirubin, phosphate, urea, creatinine and various enzymes.

On the other hand, diabetes is the fastest growing chronic disease in the world. In poorly controlled diabetes, the concentration of glucose in the blood is continuously high, which results in increased excretion of glucose through the kidneys. Glucose is a monosaccharide that is known to affect various methods of chemical analysis. The most well-known is the interference of glucose in the determination of creatinine by the Jaffe method, but the interference has so far also been observed in the determination of albumin and certain electrolytes.

The aim of this research was to determine whether elevated concentrations of ascorbic acid and glucose affect laboratory tests in urine. The research was conducted at the Clinical Institute of Chemistry, KBC Sestre milosrdnice. A randomly selected 24-hour urine sample was used for the research, and the parameters we determined were total proteins, albumin, amylase, sodium, potassium, chlorides, calcium, inorganic phosphates, magnesium, creatinine, urea and uric acid. 7 samples of different concentrations of the added interferent were prepared. Ascorbic acid was prepared in concentrations of 0, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2 and 5 g/L, and glucose in concentrations of 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 mmol/L. All measurements were made in duplicate, while the Microsoft Excel program was used for statistical analysis.

The results of the research showed no statistically significant deviation according to the defined acceptance criteria for determining the concentration of albumin, amylase, sodium, potassium and phosphate. However, ascorbic acid interfered in the determination of chloride, calcium and magnesium ions. On the other hand, elevated glucose concentration interfered with the determination of protein, calcium, magnesium, creatinine, urea and uric acid.

Based on the obtained results, we conclude that the results of the analysis of certain parameters in patients with elevated concentrations of glucose and/or ascorbic acid in the urine should be interpreted with caution.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Klinička biokemija organa i organskih sustava 2  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## ISPITIVANJE INTERFERENCIJE ASKORBINSKE KISELINE I GLUKOZE PRI ODREĐIVANJU ANALITA U MOKRAĆI

Sara Mašković

### SAŽETAK

Analiza mokraće jedan je od najčešće korištenih dijagnostičkih postupaka, a osim u dijagnostici koristi se kao uzorak izbora za probir različitih bolesti te u praćenju tijeka bolesti i uspješnosti terapije.

Interferencije su glavni izvor predanalitičkih pogrešaka u laboratorijskoj medicini. Prisutnost različitih egzogenih ili endogenih tvari može ometati mjerenje i dovesti do lažno povišenih ili lažno sniženih rezultata kemijske analize zbog čega je potrebno za svaku pretragu poznavati moguće interferencije kako bi se izbjeglo izdavanje neispravnih nalaza i usmjeravanje dijagnostike u krivom smjeru.

Askorbinska je kiselina snažan redukcijski i antioksidativni agens te najčešće korišteni vitaminski dodatak prehrani. To je kemijski aktivna molekula koja se lako apsorbira iz probavnog trakta i brzo raspoređuje u tjelesna tkiva. Budući da vitamin C pripada skupini vitamina topljivih u vodi, ako se unese u suvišku brzo se nepromijenjen eliminira iz organizma putem mokraće. Posljedično, mokraća takvih pacijenata sadržava veću koncentraciju ovog vitamina od uobičajene. Zbog svoje reduktivne sposobnosti askorbinska je kiselina poznati interferirajući spoj u biokemijskim testovima koji uključuju indikatorske sustave s oksidazama i peroksidazama. Ovi se testovi koriste pri mjerenju glukoze, ukupnog kolesterola, triglicerida i mokraćne kiseline, a askorbinska kiselina također može interferirati u određivanju bilirubina, fosfata, ureje, kreatinina i različitih enzima.

S druge strane, šećerna je bolest najbrže rastuća kronična bolest u svijetu. Kod nekontrolirane šećerne bolesti, koncentracija glukoze u krvi kontinuirano je visoka, što rezultira pojačanim izlučivanjem glukoze putem bubrega. Glukoza je monosaharid za koji je poznato da može imati utjecaj na različite metode kemijske analize. Najpoznatija je interferencija glukoze u određivanju kreatinina Jaffeovom metodom, ali interferencija je do sad uočena i prilikom određivanja albumina i pojedinih elektrolita.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječu li povišene koncentracije askorbinske kiseline i glukoze na laboratorijske pretrage u mokraći. Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice. Za istraživanje je korišten nasumično odabrani uzorak 24 satne mokraće, a parametri koje smo određivali su ukupni proteini, albumin, amilaza, natrij, kalij, kloridi, kalcij, anorganski fosfati, magnezij, kreatinin, ureja i mokraćna kiselina. Pripremljeno je 7 uzoraka različite koncentracije dodanog interferenta. Askorbinska je kiselina pripremljena u koncentracijama 0, 0,2, 0,4, 0,5, 1, 2 i 5 g/L, a glukoza u koncentracijama 0, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 mmol/L. Sva mjerenja rađena su u duplikatu, za statističku analizu korišten je program Microsoft Excel.

Rezultati istraživanja nisu pokazali statistički značajno odstupanje prema definiranim kriterijima prihvatljivosti za određivanje koncentracije albumina, amilaze, natrija, kalija i fosfata. Međutim, askorbinska je kiselina interferirala u određivanju kloridnih, kalcijevih i magnezijevih iona. S druge strane, povišena koncentracija glukoze interferirala je s određivanjem proteina, kalcija, magnezija, kreatinina, ureje i mokraćne kiseline.

Na temelju dobivenih rezultata zaključujemo da rezultate analize određenih parametara kod pacijenata koji imaju povišene koncentracije glukoze i/ili askorbinske kiseline u mokraći treba tumačiti s oprezom.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 27 grafičkih prikaza, 7 tablica i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Interferencije, mokraća, askorbinska kiselina, glukoza

Mentor: **Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Ivana Čelap**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Clinical biochemistry of organs and organ systems 2  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### EXAMINATION OF THE INTERFERENCE OF ASCORBIC ACID AND GLUCOSE IN THE DETECTION OF ANALYTES IN URINE

Sara Mašković

#### SUMMARY

Urine analysis is one of the most used diagnostic procedures, and in addition to being diagnostic tool, it is used as the sample of choice for screening various diseases, in monitoring the course of the disease and treatment progress.

Interferences are a major source of preanalytical errors in laboratory medicine. The presence of various exogenous or endogenous substances can interfere with the measurement and lead to falsely elevated or falsely reduced results of chemical analysis, which is why it is necessary to know possible interferences for each test to avoid issuing incorrect laboratory reports and directing diagnostics in the wrong direction.

Ascorbic acid is a powerful reducing and antioxidant agent and the most commonly used vitamin food supplement. It is a chemically active molecule that is easily absorbed from the digestive tract and rapidly distributed to body tissues. Since vitamin C belongs to the group of water-soluble vitamins, if taken in excess, it is quickly eliminated unchanged from the body through the urine. Consequently, the urine of such patients contains a higher concentration of this vitamin than usual. Due to its reductive ability, ascorbic acid is a known interfering compound in biochemical tests that include indicator systems with oxidases and peroxidases. These tests are used to measure glucose, total cholesterol, triglycerides and urate, while ascorbic acid can also interfere with the determination of bilirubin, phosphate, urea, creatinine and various enzymes. On the other hand, diabetes is the fastest growing chronic disease in the world. In poorly controlled diabetes, the concentration of glucose in the blood is continuously high, which results in increased excretion of glucose through the kidneys. Glucose is a monosaccharide that is known to affect various methods of chemical analysis. The most well-known is the interference of glucose in the determination of creatinine by the Jaffe method, but the interference has so far also been observed in the determination of albumin and certain electrolytes.

The aim of this research was to determine whether elevated concentrations of ascorbic acid and glucose affect laboratory tests in urine. The research was conducted at the Clinical Institute of Chemistry, KBC Sestre milosrdnice. A randomly selected 24-hour urine sample was used for the research, and the parameters we determined were total proteins, albumin, amylase, sodium, potassium, chlorides, calcium, inorganic phosphates, magnesium, creatinine, urea and uric acid. 7 samples of different concentrations of the added interferent were prepared. Ascorbic acid was prepared in concentrations of 0, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2 and 5 g/L, and glucose in concentrations of 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 mmol/L. All measurements were made in duplicate, while the Microsoft Excel program was used for statistical analysis.

The results of the research showed no statistically significant deviation according to the defined acceptance criteria for determining the concentration of albumin, amylase, sodium, potassium and phosphate. However, ascorbic acid interfered in the determination of chloride, calcium and magnesium ions. On the other hand, elevated glucose concentration interfered with the determination of protein, calcium, magnesium, creatinine, urea and uric acid.

Based on the obtained results, we conclude that the results of the analysis of certain parameters in patients with elevated concentrations of glucose and/or ascorbic acid in the urine should be interpreted with caution.

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

Thesis includes: 48 pages, 27 figures, 7 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Interference, urine, ascorbic acid, glucose

Mentor: **Nora Nikolac Gabaj, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nora Nikolac Gabaj, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Čelap, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.