

Analiza rezultata ispitivanja utjecaja dodatka konzervansa (HCl) na rezultate biokemijskih i endokrinoloških parametara u 24-satnoj mokraći

Bađun, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:220426>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-10**



Repository / Repozitorij:

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



Marko Bađun

Analiza rezultata ispitivanja utjecaja dodatka konzervansa (HCl) na rezultate biokemijskih i endokrinoloških parametara u 24-satnoj mokraći

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice i Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Nore Nikolac Gabaj.

Zahvala

Prvo želim zahvaliti mentoricama doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura i doc. dr. sc. Nore Nikolac Gabaj na svakoj pruženoj pomoći i napomeni pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliku zahvalu želim dati svoj svojoj obitelji, posebice roditeljima, Jakovu, Nikoli, Nini, Neri, Zori i cimeru zamorcu Goetheu, na svakom trenutku u kojem su bili uz mene i pomogli mi za vrijeme studiranja. Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška i učinili da ovih 5 zabavnih godina projuri u sekundi.

Na kraju, želim zahvalit Emi na mnogobrojnim druženjima i zajedničkim alkoholiziranjima.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Mokraća..... | 1 |
| 1.2 Pretrage u mokraći | 4 |
| 1.2.1. Proteini | 6 |
| 1.2.2. Elektroliti | 7 |
| 1.2.3. Metaboliti..... | 10 |
| 1.2.4. Hormoni..... | 11 |
| 1.3 Vrste uzoraka mokraće..... | 13 |
| 1.4 Postupak prikupljanja mokraće..... | 14 |
| 1.4.1 Priprema bolesnika..... | 14 |
| 1.4.2 Spremnici za mokraću | 15 |
| 1.4.3 Postupak prikupljanja..... | 15 |
| 1.5 Konzervansi u mokraći..... | 16 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 18 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 19 |
| 3.1 Prikupljanje uzoraka..... | 19 |
| 3.2 Metode mjerenja | 21 |
| 3.2.1 Biokemijske metode..... | 21 |
| 3.2.2 Imunokemijske metode | 22 |
| 3.2.3 HPLC..... | 23 |
| 3.3 Statistička obrada podataka | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 27 |
| 4.1 Rezultati..... | 27 |
| 4.2. Rasprava | 32 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 34 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA..... | 35 |
| 7. LITERATURA | 36 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY..... | 38 |

1. UVOD

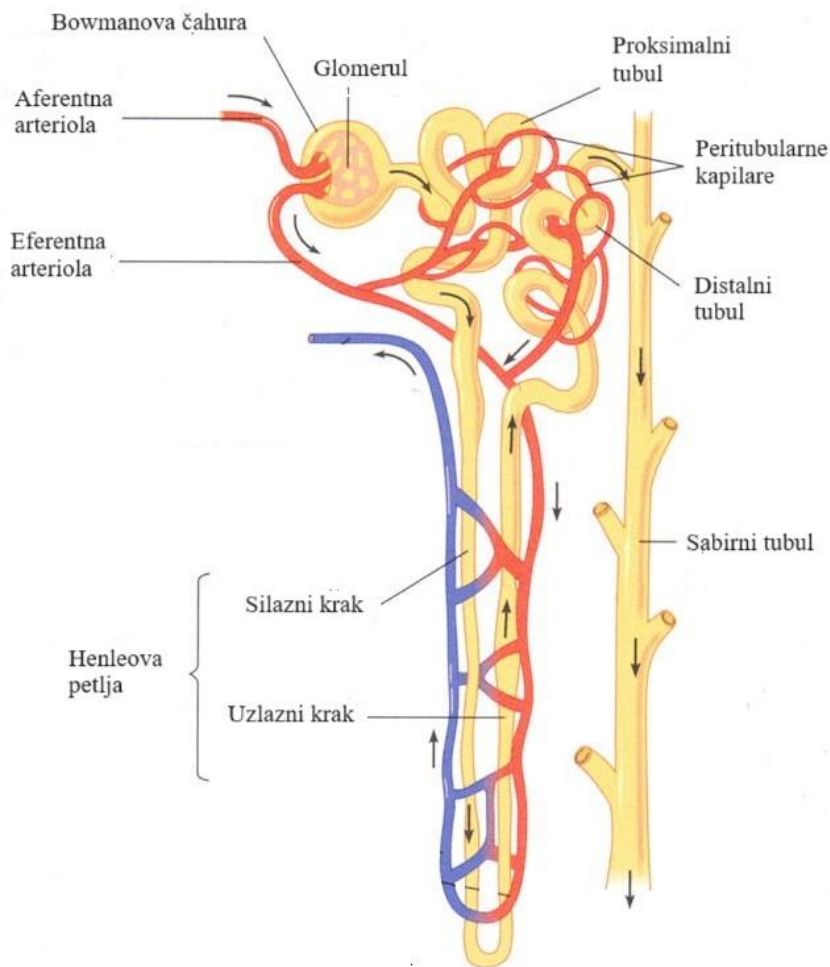
1.1 Mokraća

Zbog neinvazivnosti i jednostavnosti uzorkovanja te lakoće dobivanja velike količine uzorka, mokraća je najčešći ekstravaskularni uzorak u laboratorijskoj medicini. Osim navedenih prednosti postoje i nedostaci mokraće kao uzorka poput velike biološke varijabilnosti izlučivanja pojedinih sastavnica (dob, spol, laktacija, trudnoća), brojnih predanalitičkih čimbenika koji mogu utjecati na rezultate pretraga (prehrana, fizička aktivnost, unos tekućine, diureza) te također zbog svog kemijskog sastava broj analita koji se može određivati u mokraći je ograničen. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Usprkos navedenim manama, zbog svojih prednosti mokraća je neizostavan dio rutinskog pregleda pacijenta te ima važnu ulogu u testovima probira, postavljanju dijagnoze, praćenju tijeka bolesti i uspješnosti liječenja. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Topić i sur., 2018)

Mokraća nastaje u nefronima u bubrezima nakon čega se iz bubrega mokraćovodima (ureteri) odvodi u mokraćni mjehur te putem mokraćne cijevi (uretra) izbacuje iz organizma. Bubrezi su parni organ smješten u retroperitonealnoj šupljini u lumbalnom predjelu, a desni bubreg smješten je niže od lijevog. Bubreg je građen od kore (*cortex*) i srži (*medulla*). Osnovna funkcija bubrega je uklanjanje nepotrebnih i štetnih (soli, dušikovi spojevi, lijekovi i metaboliti lijekova, otrovi, produkti metabolizma, proteini), a zadržavanje korisnih tvari u organizmu (glukoza, elektroliti, proteini, aminokiseline). Bubrezi također imaju i funkciju u održavanju acido-bazne ravnoteže kontrolom reapsorpcije bikarbonata i ekskrecije protona u mokraću. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Nefron je osnovna funkcionalna jedinica bubrega i svaki bubreg sadrži prosječno 600 000 nefrona. Nefron (**Slika 1**) je građen od glomerula u kojem dolazi do ultrafiltracije krvne plazme u Bowmanovu čahuru i tubula u kojima se glomerularni filtrat (primarna mokraća) ukoncentrirava. Krv u glomerul dovodi aferentna, a odvodi eferentna arteriola. Kod tubula razlikujemo proksimalni tubul, silazni i uzlazni krak Henleove petlje te distalni tubul koji se nadovezuje na kortikalni sabirni tubul. Uzlazni krak Henleove petlje deblji je od silaznog. Većina nefrona nalazi se u kori bubrega dok se samo završni dio silaznog i početni dio uzlaznog kraka Henleove petlje nalazi u srži bubrega zajedno s donjim dijelom kortikalnog sabirnog tubula. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Čvorišćec i Čepelak, 2009)



Slika 1. Građa nefrona (preuzeto i prilagođeno prema www.pinterest.com).

Prvi korak u nastanku mokraće je glomerularna filtracija. Barijera kroz koju se krv filtrira sastoji se od tri sloja. Prvi sloj je endotel fenestriranih kapilara koji sadrže otvore (fenestre) veličine oko 60 nm kroz koje prolaze svi sastojci krvi osim krvnih stanica i većih proteina. Drugi sloj je bazalna membrana koja se sastoji od 3 sloja: *lamina rara interna* (najbliži fenestriranim kapilarama), *lamina densa* i *lamina rara externa* (najdalji od fenestriranih kapilara). *Lamina densa* glavni je sloj koji zaustavlja prolazak velikih proteina i molekula u primarnu mokraću. Sloj endotela kapilara i bazalne membrane negativno je nabijen zbog prisutnih glikoproteina, glukozaaminoglikana i proteoglikana što dodatno sprječava ulaz negativnih molekula u primarnu mokraću. Treći i zadnji sloj je sloj podocita, stanica koje imaju mnoge izdanke koji se međusobno isprepliću i tvore gusto sito promjera pora između 25 i 60 nm čime omogućuju filtriranje proteina većih od 60 kDa od ostatka tvari koji se na kraju filtriraju u Bowmanovu čahuru i tvore primarnu mokraću. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Drugi korak u nastanku mokraće je prolazak nastale primarne mokraće kroz tubule u kojima se događa reapsorpcija vode, elektrolita, određenih molekula poput ureje, glukoze,

aminokiselina i niskomolekularnih proteina te izlučivanja pojedinih tvari poput lijekova, kalija, amonijaka i manjeg dijela uratnih iona i kreatinina. Do reapsorpcije dolazi u mreži kapilara koja okružuje tubule. Mrežu kapilara tvore kapilare koje su nastale grananjem eferentne arteriole, a mreža se nastavlja na venulu koja odvodi krv iz nefrona i bubrega. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Iz glomerularnog filtrata reapsorbira se oko 99 % vode. Oko 80 % reapsorbira se u proksimalnom tubulu osmozom zbog reapsorpcije različitih niskomolekularnih tvari. Reapsorpcija u proksimalnom tubulu naziva se obligatorna reapsorpcija vode zbog toga što je konstantna, a određena je samo količinom reapsorbirane krute tvari. Ostatak reapsorpcije vode događa se u distalnom tubulu i koritkalmnom sabirnom tubulu pod učinkom antidiuretskog hormona (ADH) što se naziva fakultativnom reapsorpcijom jer je ona varijabilna, ovisi o stanju hidriranosti organizma te se regulira prema fiziološkim potrebama. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

ADH je peptid kojeg luči stražnji dio režnja hipofize, a primarno je odgovoran za povećano zadržavanje vode u organizmu tako što stimulira ugradnju akvaporina na apikalnu stranu distalnih tubula i kortikalnog sabirnog tubula te tako povećava propusnost tubula za vodu. Ukoliko organizam nije dovoljno hidriran, povećano lučenje ADH omogućit će manji gubitak vode mokraćom dok će kod dovoljnog unosa vode manjak ADH rezultirati manjom reapsorpcijom i većim prolaskom u mokraću. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

U proksimalnom tubulu dolazi do glavnine reapsorpcije tvari. Pomoću specifičnih transportera na membrani proksimalnog tubula, glukoza i aminokiseline u potpunosti se odvođe iz primarne mokraće u krvotok. Nadalje, reapsorbiraju se ioni kalija, bikarbonata, natrija, klora, fosfata i kalcija te uratni ioni i dio ureje. Također u proksimalnom tubulu dolazi i do sekrecije metabolita lijekova, amonijaka i manjeg dijela uratnih iona i kreatinina. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Na proksimalni tubul nastavlja se Henleova petlja. Silazni krak petlje propustan je za vodu no izrazito malo propustan za ione, dok je uzlazni krak nepropustan za vodu, a propustan za ione. Zbog toga se prolaskom mokraće kroz silazni krak mokraća ukoncentrirava zbog izlaska vode osmozom u hipertonični medularni prostor i pri samom dnu petlje je najkoncentriranija. Takva koncentrirana mokraća prolaskom kroz uzlazni krak Henleove petlje koji je propustan za ione ponovo se razrjeđuje izlaskom iona natrija i posljedično klora prvo pasivnim, a zatim aktivnim transportom iz tubula što ponovo medularni prostor čini hipertoničnim i u silaznom kraku petlje dolazi do ponovne osmoze vode iz tubula u medularni prostor. Posljedica takve fiziologije je da se u Henleovoj petlji reapsorbira oko 25 % natrijevih i kloridnih iona, a također i kako je donji dio Henleove petlje unutar medule bubrega u razini s donjim dijelom kortikalnog sabirnog kanala, zbog hipertoničnosti okoline omogućena je

reapsorpcija vode osmozom iz mokraće u sabirnom kanalu pod utjecajem ranije opisanog antidiuretskog hormona. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Guyton i Hall, 2017)

U distalnom tubulu pod utjecajem aldosterona dolazi do reapsorpcije iona natrija i klora uz bikarbonatne ione te sekrecije kalijevih i vodikovih iona. Aldosteron je steroidni hormon kojeg luči adrenalna žlijezda. Dio je renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava koji regulira krvni tlak i povećana mu je aktivnost kod hipotenzije, a djeluje u distalnom tubulu na način da povećava sekreciju kalija u mokraću u zamjenu za natrij iz mokraće u krvotok, a posljedično zbog reapsorpcije natrija dolazi i do reapsorpcije vode i povećavanja volumena krvi i krvnog tlaka. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Na kraju iz distalnog tubula mokraća prolazi u kortikalni sabirni kanal u kojem se sakuplja nastala mokraća iz različitih nefrona, dolazi do fakultativne reapsorpcije vode i nastala mokraća odvodi se ureterom iz bubrega u mokraćni mjehur. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

1.2 Pretrage u mokraći

Najčešća pretraga u mokraći je kvalitativna analiza mokraće koja se ugrubo dijeli na fizikalni pregled mokraće, kemijski pregled mokraće i mikroskopski pregled mokraćnog sedimenta. U fizikalni pregled mokraće spada vizualni pregled mokraće, odnosno utvrđivanje izgleda i boje mokraće u svrhu prvog probira na prisutnost patoloških elemenata. U kemijski pregled ubraja se određivanje pH i relativne volumne mase mokraće te prisutnost određenih otopljenih sastojaka mokraće, dok se u pregledu mokraćnog sedimenta određuje prisutnost staničnih elemenata, kristala, sluzi i mikroorganizama. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Najveći broj analita u mokraći određuje se kvantitativnim metodama. Najčešće kvantitativne pretrage u mokraći navedene su u **Tablici 1**. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Tablica 1. Kvantitativne pretrage u mokraći (preuzeto i prilagođeno prema Nikolac Gabaj i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača)

| GRUPA TESTOVA | PRETRAGE |
|---------------|--|
| Alkoholi | Metanol, etanol, izopropanol, etilen-glikol |
| Aminokiseline | Alanin, asparagin, arginin, beta-alanin, citrulin, cistein, etanolamin, glicin, glutamat, hidroksilizin, histidin, |

| | |
|------------------------------|---|
| | homocistein, leucin, lizin, metionin, ornitin, sarkozin, serin, taurin, tirozin, triptofan, valin, itd. |
| Elektroliti | Anorganski fosfati, kalcij, kalij, klor, magnezij, natrij, osmolalnost |
| Elementi u tragovima | Bakar, cink, fluor, jod, kobalt, krom, magnezij, molibden, nikal, selen, srebro |
| Enzimi | Amilaza, N-acetil- β -D-glukozaminidaza |
| Hormoni nadbubrežne žlijezde | Aldosteron, slobodni kortizol |
| Organske kiseline | 4-OH-fenilmliječna, 4-OH-fenilpropionska, hidroksimalonska, 2-OH-izovalerična, palmitinska, orotska, mandelična, mevalonska, itd. |
| Katekolamini | Adrenalin, homovanilinska kiselina (HVA), metaboliti dopamina, noradrenalin, vanilmandelična kiselina (VMA) |
| Metaboliti | Citrat, cistin, glukoza, kreatinin, urat, oksalat, urea |
| Metanefrini | Metanefrin, normetanefrin, metoksitiramin |
| Proteini | Albumin, α 1-mikroglobulin, cistatin C, NGAL (engl. <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> , lipokalin povezan s neutrofilnom želatinazom), Bence-Jonesov protein, KIM-1 (engl. <i>kidney injury molecule-1</i> , molekula ozljede bubrega-1), retinol vezujući protein (RBP), C-peptid, β 2-mikroglobulin, elektroforeza proteina mokraće, ukupni proteini |
| Serotonin i metaboliti | 5-hidroksiindolactena kiselina (5-HIAA), 5-hidroksitriptofan (5-HTP) |

| | |
|--------------------|---|
| Sredstva ovisnosti | Amfetamini, metamfetamin, benzodiazepini, barbiturati, LSD (engl. <i>lysergic acid diethylamide</i> , dietilamid lizerginske kiseline), fenciklidin, ketamin, kanabinoidi, kokain, opiodi |
| Toksični metali | Aluminij, antimon, arsen, kadmij, olovo, platina, talij, živa |
| Vitamini | 4-piridoksična kiselina, biotin (B7), pantotenska kiselina (B5), riboflavin (B2), askorbinska kiselina (vitamin C), N-metil-nikotinamid |

1.2.1. Proteini

Proteini su biološke makromolekule građene od aminokiselina spojenih peptidnom vezom. Svaki protein karakterističan je svojim slijedom aminokiselina koji uvjetuje njegovu funkciju. Proteini su međusobno heterogena skupina molekula i specifični su za pojedina tkiva i organe. Neke od mnogih funkcija koje proteini obavljaju u krvi su: zaštita organizma, transport molekula, održavanje koloidno-osmotskog tlaka, kataliziranje reakcija kao enzimi, održavanje pH krvi zbog toga što djeluju kao puferi, omogućavanje koagulacije krvi, skladištenje molekula, glasnici među stanicama i tkivima u obliku hormona. Fiziološki u mokraći zdravih osoba izlučuje se mali udio proteina i to onih koji su dovoljno mali da prođu u glomerularni filtrat, a to su proteini čija je molekulska masa manja od 70 kDa s time da se većina tih proteina ponovo reapsorbira u tubulima nazad u krvotok što na kraju rezultira da je ukupna količina proteina u mokraći zdrave osobe do 0,07 g/L. Tako niske koncentracije proteina se klasičnim rutinskim analitičkim metodama ne mogu kvalitativno dokazati pa se kolokvijalno kaže da mokraća zdrave osobe ne sadrži proteine. Povećane količine proteina u mokraći nazivaju se proteinurija, a dijele se na funkcionalne, organske i paraproteinurije. Funkcionalne proteinurije se pojavljuju nakon teže fizičkog napora, kod trudnica ili kao ortostatska proteinurija što je prisutna benigna proteinurija kod mladih osoba koja izostaje ukoliko osoba miruje ili leži. Organske proteinurije se ovisno o uzroku dijele na predbubrežne čiji najčešći su uzrok bolesti kardiovaskularnog sustava, bubrežne koje su posljedice bolesti bubrega i poslijebubrežne koje su posljedica bolesti urogenitalnog trakta, odnosno organa kroz koji mokraća prolazi nakon nastanka u bubrežima.

Organske proteinurije možemo podijeliti i na glomerularne, koje karakteriziraju pojave proteina molekulske mase veće od 70 kDa zbog veće propustljivosti glomerula, i tubularne proteinurije, koje su karakterizirane pojavom proteina manje molekulske mase koji se zbog bolesti tubula nisu reapsorbirali. Paraproteinurije su posebne vrste proteinurija kod kojih su u mokraći prisutni monoklonalni slobodni laki lanci imunoglobulina. Paraproteinurije su karakteristične za multiple mijelome i imunoproliferativne bolesti. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Albumin se sintetizira isključivo u jetri i u odnosu na ostale proteine u krvi je najzastupljeniji. Najvažnije funkcije u krvi su mu transport molekula i tvari te održavanje onkotskog tlaka. Iako i nekim stanjima poput dehidracije mu je količina u krvi povećana (hiperalbuminemija), klinički su značajnija stanja u kojima je njegova količina u krvi smanjena (hipoalbuminemija) što može ukazivati na bolesti jetre, bolesti bubrega, teške opekline i enteritis. Kako se sintetizira isključivo u jetri, zbog bolesti jetre posljedično dolazi do smanjenja sinteze albumina, a kod bolesti bubrega i enteritisa dolazi do gubitka albumina zbog veće propusnosti glomerula, odnosno tkiva crijeva. Posljedica hipoalbuminemije je narušavanje onkotskog tlaka i pojava edema. Hipoalbuminemija je posebno izražena kod nefrotskog sindroma kada je prisutna masovna proteinurija i gubitak albumina, ali i ostalih proteina mokraćom. Prisustvo albumina u mokraći također je značajno za određivanje razine oštećenja glomerula i određivanje selektivnosti proteinurije. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

1.2.2. Elektroliti

Metabolizam fosfora i kalcija usko je povezan, pa se uglavnom razmatraju zajedno i promjene u serumu su im recipročne. Kalcij i fosfor zajedno čine najveći dio mineralnog sastava kostiju pa je njihovo povećanje u serumu i mokraći pokazatelj bolesti povezanih s kostima. Paratireoidni hormon (PTH) i kalcitriol (aktivni oblik vitamina D) regulatori su reapsorpcije kalcija i fosfora u tubulima. Kalcitriol povećava reapsorpciju kalcija i fosfata, dok PTH povećava reapsorpciju kalcija, no smanjuje reapsorpciju fosfata u tubulima. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Fosfor u organizmu sastavni je dio fosfolipida, nukleinskih kiselina i nukleotida, adenozin trifosfata (ATP) i kofaktora u stanicima. Fosfor se u serumu nalazi u obliku primarnih i sekundarnih fosfata. Hiperfosfaturija prisutna je kod hiperparatireoidizma, hipovitaminoze D uz normalan unos fosfata i niski unos kalcija te bubrežne tubularne acidoze. Hipofosfaturija prisutna je kod hipoparatireoidizma, hipovitaminoze D uz visoki unos kalcija, osteomalacije, rahitisa, celijakije, steatoreje i kronične bubrežne insuficijencije kada zbog gubitka kalcija

mokraćom dolazi do retencije fosfata u serumu i manjeg gubljenja mokraćom. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Većina kalcija u organizmu nalazi se u kostima. Kalcij ima mnoge uloge u organizmu, ima ulogu kao sekundarni glasnik u stanici, u ekscitabilnosti neuromuskularnog tkiva, koagulaciji krvi, mišićnim kontrakcijama te aktivira pojedine enzime. Kalcij u serumu prisutan je kao difuzibilni koji može difundirati kroz polupropusne membrane i nedifuzibilni koji je vezan za albumin. Većina difuzibilnog kalcija otpada na ionizirani kalcij koji je fiziološki aktivan, a manji dio u krvi nalazi se u obliku soli fosfata, citrata i bikarbonata u čijim oblicima je kalcij neaktivan. Količina ioniziranog kalcija ovisi o pH krvi. Hiperkalcemija prisutna je kod hiperparatireoidizma, hipervitaminoze D, multiplog mijeloma i neoplastičnih bolesti kostiju te acidoze zbog povećanja ioniziranog kalcija u serumu što onda prati i povećanje izlučivanja kalcija mokraćom (hiperkalciurija). Hipokalcemija je prisutna kod hipoparatireoidizma, rahitisa, osteomalacije, hipovitaminoze D i proteinurija kada se kalcij gubi mokraćom vezan za albumine koji prolaze u mokraću. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Povećano izlučivanje kalcija u mokraći javlja se kod hiperparatireoidizma, koštanih metastaza, osteoporoze, Cushingovog sindroma, akromegalije, bubrežne tubularne acidoze, idiopatske hiperkalciurije, tireotoksikoze, Pagetove bolesti, sarkoidoze i Wilsonove bolesti, dok je hipokalciurija prisutna kod hipoparatireoidizma, rahitisa, osteomalacije, akutnog nefritisa, zloćudnih bolesti, hipotireoze, celijakije i steatoreje. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Natrij je najvažniji i najbrojniji izvanstanični kation. Bitan je kod održavanja osmotskog tlaka i reapsorpcije tvari sekundarnim aktivnim prijenosom. Na njegovu količinu u mokraći utječu hormon aldosteron koji povećava njegovu reapsorpciju u distalnim tubulima te srčani natrijuretски peptidi koji povećavaju njegovo izlučivanje mokraćom. Hiponatrijemija je prisutna kod povraćanja, jake diureze, smanjenog rada nabubrežne žlijezde i smanjenog izlučivanja aldosterona (Addisonova bolest), bubrežnim bolestima zbog većeg gubitka mokraćom i kod smanjenog unosa natrija hranom. Hipernatrijemija je prisutna kod pojačanog rada nadbubrežne žlijezde (Cushingov sindrom), dehidracije i nekontrolirane terapije NaCl. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Natrij u mokraći se određuje za razlikovanje predbubrežnog od bubrežnog zatajivanja, kod bubrežnih bolesti, procjene dnevnog unosa natrija, terapije diureticima, opekline i metaboličke alkaloze. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Povišene koncentracije u mokraći nalazimo kod adrenokortikalne insuficijencije, nefropatije s gubitkom soli, bubrežne tubularne acidoze, šećerne bolesti, neprikladnog lučenja ADH te alkaloze, a snižene kod izvanbubrežnog gubitka natrija, adrenokortikalne hiperfunkcije, smanjene glomerularne filtracije, oligurije i predbubrežne azotemije.

Kalij je glavni unutarstanični kation. U usporedbi s natrijem, ne postoji bubrežni prag za kalij već se reapsorpcija i sekrecija kalija u mokraći događa posredno djelovanjem na izlučivanje i reapsorpciju natrija na čiju koncentraciju u mokraći i serumu ima utjecaj aldosteron čiji je učinak reapsorpcija natrija u serum, u zamjenu za kalij iz seruma u mokraću. Smanjena koncentracija kalija u krvi (hipokalijemija) prisutna je kod povećanog gubitka kalija diurezom ili dijareom, dilucije izvanstanične tekućine zbog terapije fiziološkom otopinom i nedovoljnog unosa. Hiperkalijemija se pojavljuje pri dehidraciji ili kada se kalij daje terapijski i to u brže nego što se izlučuje mokraćom. Kako je koncentracija kalija u serumu pod kontrolom aldosterona, poremećaji u radu nadbubrežne žlijezde rezultiraju smanjenjem koncentracije kalija u mokraći kod Addisonove bolesti i povećanjem njegove koncentracije kod Cushingovog sindroma. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Osim kod bolesti nadbubrežne žlijezde, određivanje kalija u mokraći klinički je značajno kod bubrežnih bolesti, procjene dnevnog unosa natrija, gastrointestinalnih gubitaka i terapije diureticima. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Kloridi su glavni anioni izvanstanične tekućine. Prolaze u glomerularni filtrat, no gotovo čitavi se pasivno reapsorbiraju. Zajedno s natrijem povećano se izlučuju i u znoju. Hiperkloremija prisutna je kod dehidracije, dekompenziranih srčanih bolesti i u respiracijskoj alkalozii. Hipokloremija prisutna je kod povraćanja jer dolazi do gubitka klora preko HCl iz želudca, proljeva zbog gubitka tekućine, plućnih bolesti i nastanka edema. Kod kroničnih bubrežnih bolesti zbog smanjene reapsorpcije u tubulima dolazi do povećanja koncentracije klorida u mokraći i smanjenja koncentracije klorida u serumu. U pravilu promjene koncentracije klora prate promjene koncentracije natrija pa je određivanje klora u mokraći značajno i kod bolesti koje imaju utjecaj na količinu natrija u mokraći poput Cushingovog sindroma i primarnog aldosteronizma. U metaboličkoj alkalozii dolazi do povećanog gubitka klorida mokraćom zbog povećane reapsorpcije bikarbonatnog aniona. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Nakon kalija, drugi najzastupljeniji unutarstanični kation je magnezij. Magnezij ima brojne uloge kao aktivator enzima, sudjeluje u regulaciji stanične propusnosti i neuromuskularne podražljivosti. Većina unesenog magnezija eliminira se fecesom, no kod velikog unosa povećava se njegova eliminacija mokraćom. Metabolizam magnezija kontroliran je paratiroidnim hormonom (PTH), koji smanjuje njegovu reapsorpciju i povećava izlučivanje mokraćom, mineralokortikoidima, inzulinom i hormonima štitnjače koji također povećavaju njegovo izlučivanje mokraćom, dok adrenalin povećava koncentraciju magnezija u serumu. Većina magnezija u krvi je difuzibilna, između 70 i 85 %, dok je ostatak vezan za albumin. Diuretici Henleove petlje djeluju na način da inhibiraju reapsorpciju magnezija u uzlaznom

kraku petlje te zbog toga dolazi do povećanja koncentracije magnezija u mokraći. Promjene koncentracije magnezija prate promjene koncentracije kalija i kalcija. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Pojačano izlučivanje magnezija mokraćom karakteristično je za hiperaldosteronizam i bolesti bubrega, dok je sniženo najčešće posljedica nedovoljnog unosa i gastrointestinalnih bolesti. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

1.2.3. Metaboliti

Kreatinin je produkt spontanog metabolizma kreatina i kreatin-fosfata koji služi kao donor fosfata za nastanak ATP-a u mišićima. Kreatinin se eliminira mokraćom u koju većim dijelom dolazi glomerularnom filtracijom. Dio u mokraću dolazi i izlučivanjem u tubulima, no taj dio u mokraći je izrazito mali pa je klinička važnost kreatinina vezana za bolesti bubrega. Kako gotovo cijeli kreatinin u mokraću dolazi glomerularnom filtracijom, kreatinin nam služi za određivanje brzine glomerularne filtracije (GFR, engl. *glomerular filtration rate*), praćenje akutnih i kroničnih bubrežnih bolesti i zajedno s urejom služi za diferencijalnu dijagnozu prerenalnih i postrenalnih stanja. Koncentracija kreatinina u serumu raste ukoliko dolazi do smanjenja brzine glomerularne filtracije. Njegovo izlučivanje u mokraću je konstanta pa se također koristi i za provjeru je li sakupljena cijela 24-satna mokraća ili je uzorak razrijeđen i modificiran. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Povišene koncentracije u mokraći nalazimo u akromegaliji, gigantizmu, šećernoj bolesti i hipotireoidizmu, dok su klinički puno značajnije snižene koncentracije kod bubrežnih bolesti, hipertireoidizma, mišićne distrofije, anemija i leukemija.

Ureja je glavni metabolički produkt kod eliminacije dušika iz organizma. Sintetizira se ureja ciklusom u jetri. Oko 90 % ureje eliminira se iz organizma bubrežima i mokraćom pa je klinički značaj ureje kod određivanja bubrežne funkcije. Posebice zajedno s koncentracijom kreatinina u mokraći i serumu jer usporedbom ta dva parametra možemo diferencijalno dijagnosticirati prerenalne, renalne i postrenalne hiperuremije. Hiperuremija prisutna je kod teških dehidracija, akutnih i kroničnih bubrežnih bolesti, povećanog katabolizma proteina, zatajenja srca i smanjenja brzine glomerularne filtracije i perfuzije bubrega te kod dugotrajne terapije glukokortikoidima. Hipouremija prisutna je kod dugotrajnog gladovanja, metaboličkih poremećaja ureja ciklusa i teškog oštećenja jetre kada je smanjena sinteza ureje. Serumaska koncentracija ureje nešto je viša kod osoba koje unose više proteina nego osoba koje unose manje proteina. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Koncentracija ureje u mokraći također se određuje kod pacijenata na parenteralnoj prehrani i za procjenu količine dušika u organizmu. (Nikolac

Gabaj i sur., 2019) Povišene koncentracije nalazimo u hiperparatireoidizmu, a snižene u jetrenim bolestima, toksemiji i bubrežnom oštećenju.

Mokraćna kiselina ili urat konačni je produkt metabolizma purina (adenin, gvanin). Urati se većim dijelom izlučuju mokraćom i prolaze u glomerularni filtrat, no reapsorbiraju se i konačna količina mokraćne kiseline u mokraći dolazi od sekrecije urata u distalnim tubulima. S izlučivanjem urata u mokraću interferiraju ketonske kiseline i mliječna kiselina. Hiperuricemija prisutna je kod pojačane sinteze purina, povećanog unosa purina mesom i smanjenog izlučivanja bubregom. Upalna bolest koja se razvija kod hiperuricemije kada se mokraćna kiselina taloži u zglobove naziva se giht. Kod hiperuricemije također su česti bubrežni kamenci mokraćne kiseline koji su posljedica velike količine mokraćne kiseline u mokraći. Izlučivanje urata mokraćom smanjeno je kod akutnih i kroničnih bubrežnih bolesti. Hipouricemija je rjeđa, a najčešće se pojavljuje kod terapije gihta alopurinolom koji inhibira nastanak mokraćne kiseline. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) U mokraći količina mokraćne kiseline određuje se kod pacijenata na terapiji urikozuričnim lijekovima, dijagnostike gihta i dijagnostike i praćenja nefrolitijaze kada se pojavljuju kamenci mokraćne kiseline i kalcija u bubregu. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Povišene koncentracije nalazimo kod leukemije, Wilsonove bolesti, virusnog hepatitisa i anemije srpastih stanica, a snižene kod nedostatka folne kiseline te trovanja olovom.

1.2.4. Hormoni

Kortizol je glavni predstavnik skupine hormona pod nazivom glukokortikoidi koje izlučuje nadbubrežna žlijezda, specifičnije zona fasciculata. Glavni učinak kortizola je povećanje razine glukoze u krvi na način da stimulira glukoneogenezu povećanom razgradnjom proteina, glikogenezu u jetri i glikogenolizu u skeletnom mišiću. Kortizol također potiče i lipolizu što rezultira povećanjem slobodnih masnih kiselina u krvotoku, a također smanjuje apsorpciju kalcija iz crijeva i reapsorpciju kalcija i fosfata u bubregu. Osim navedenih metaboličkih utjecaja, kortizol ima ulogu i u imunosupresiji što se koristi terapijski korištenjem njegovih analoga. Kronična primjena njegovih analoga u terapijske svrhe rezultira simptomima koji su jednaki simptomima hiperfunkcije nadbubrežne žlijezde (Cushingov sindrom), a to su osteoporoza zbog povećanja katabolizma proteina koštanog matriksa i smanjene apsorpcije kalcija, hiperglikemija i pojava dijabetesa što može rezultirati i pojavom glukoze u mokraći, hipertenzijom, debljinom, hirzuitizmom. Smanjene koncentracije kortizola u krvi rezultiraju hipoglikemijom, hipotenzijom i gubitkom na težini. Kortizol prati cirkadijani ritam izlučivanja

što znači da su mu koncentracije najviše ujutro, a smanjuju se tokom dana. Kortizol u krvi većim dijelom vezan je za specifični transporter transkortin, manjim dijelom za albumin, a samo par posto je u slobodnoj frakciji i biološki aktivno. (Čvorišćec i Čapelak, 2009) U mokraći se određuje slobodna frakcija kortizola koja je biološki aktivna, to jest nije prošla metaboličke promjene. Količina slobodnog kortizola u mokraći i serumu je proporcionalna, odnosno povećanje kortizola u serumu očituje se kao povećanje koncentracije kortizola u mokraći. Prednost određivanja kortizola u 24-satnoj mokraći je ta da se izbjegava utjecaj cirkadijanog ritma njegovog izlučivanja na rezultate pretrage. Takav test je osjetljiv za dijagnostiku hiperkortizolizma, odnosno Cushingovog sindroma i primjeren je kao test probira za višak kortizola. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Koncentracija kortizola povišena je kod hiperfunkcije nadbubrežne žlijezde (tumor nadbubrežne žlijezde, tumor hipofize, ektopično lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH, engl. *adrenocorticotropic hormone*).

5-HIAA glavni je metabolit serotonina u organizmu. Sintetizira se iz aminokiseline triptofan, a u normalnim okolnostima oko 3 % triptofana unesenog hranom pretvara se u serotonin. Kod karcinoidnih tumora je postotak pretvorbe triptofana u serotonin čak do 60 % što rezultira povećanom koncentracijom njegovog metabolita 5-HIAA u mokraći. Karcinoidni tumori, koji su sporo rastući neuroendokrini tumori, najčešće zahvaćaju organe probavnog sustava, bronhe i timus, a klinički simptomi su im proljev, crvenilo lica, srčani poremećaji i krvarenje koji su rezultat povećane koncentracije transmitera serotonina u krvi. (Čvorišćec i Čapelak, 2009)

VMA krajnji je produkt metabolizma katekolamina adrenalina i noradrenalina. Kliničko značenje određivanja VMA je kod dijagnoze neurokromafinih tumora poput feokromocitoma, neuroblastoma i paraganglioma. Feokromocitom je tumor srži nadbubrežne žlijezde, paragangliom tumor kromafinih stanica izvan nadbubrežne žlijezde, a neuroblastom tumor živčanog tkiva te su specifični po tome što kod njih dolazi do velikog otpuštanja katekolamina adrenalina, noradrenalina i dopamina u krvotok pa su u mokraći prisutne veće koncentracije njihovih metabolita. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Klinički simptomi navedenih tumora su tahikardija, glavobolja, hipertenzija, hiperglikemija, crvenilo, anksioznost i ostali simptomi povezani s povećanim otpuštanjem katekolamina u organizmu. (Čvorišćec i Čapelak, 2009)

1.3 Vrste uzoraka mokraće

Ovisno o pretragama i okolnostima pacijenta, postoji više vrsta uzoraka mokraće. Razlikujemo slučajan uzorak, uzorak prve jutarnje mokraće, uzorak druge jutarnje mokraće i 24-satnu mokraću. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Uzorak mokraće potrebno je što prije analizirati jer stajanjem dolazi do djelovanja mikroorganizama i oksidacijskih procesa što rezultira promjenom koncentracije analita, odnosno promjenom izgleda i sastava mokraće te pojave lažnih rezultata. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Kod kvalitativne analize mokraće najčešći uzorak je prva jutarnja mokraća, a za kvantitativnu analizu uzorak je 24-satna mokraća. Sastav prve jutarnje mokraće najbliži je prosječnom sastavu 24-satne mokraće. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Također uzorak prve jutarnje mokraće koncentriraniji je od slučajnog uzorka mokraće zbog toga što je prva jutarnja mokraća u pravilu duže zadržana u tijelu čime je omogućeno dovoljno vrijeme za rast bakterija u mjehuru i smanjena je vjerojatnost lažno negativnog rezultata na bakterijsku infekciju mokraćnih puteva. Uzorak prve jutarnje mokraće prikladan je za bolničke pacijente. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

24-satna mokraća obuhvaća svu mokraću izmokrenu nakon prve jutarnje mokraće jednog dana do prve jutarnje mokraće sljedećeg dana uključujući i nju. Da bi se spriječilo djelovanje mikroorganizama ili promjena sastava mokraće, kod sakupljanja 24-satne mokraće u bocu za sakupljanje ponekad se dodaje konzervans. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Slučajan uzorak mokraće nema definiran volumen, vrijeme uzorkovanja niti je osoba prethodno pripremljena za uzorkovanje pa su česti lažno pozitivni ili negativni rezultati. Takav uzorak najčešći je kod akutnih stanja i pacijenata na hitnoj pomoći. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Uzorak druge jutarnje mokraće prikupljen je 2-4 sata nakon prve jutarnje mokraće te zbog toga na njezin sastav imaju utjecaj fizička aktivnost i unesena hrana nakon buđenja. Kako bi se povećala osjetljivost otkrivanja bakterijske infekcije, za uzorak druge jutarnje mokraće potrebno je ograničiti unos vode na maksimalno 200 mL nakon 22 sata prethodnog dana. U suprotnom se takav uzorak ne može klasificirati kao uzorak druge jutarnje mokraće već kao slučajan uzorak. Uzorak druge jutarnje mokraće najčešći je kod ambulantnih pacijenata. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

1.4 Postupak prikupljanja mokraće

1.4.1 Priprema bolesnika

Prije samog prikupljanja uzorka mokraće potrebno je pripremiti pacijenta za uzorkovanje. Potrebno je izbjegavati intenzivnu fizičku aktivnost i promjenu uobičajene količine unesene hrane i tekućine dan prije samog prikupljanja mokraće. Također pojedina hrana može utjecati na boju mokraće pa se preporuča izbjegavati unos cikle, kupina i rabarbare jer boja mokraće može postati bliža crvenoj; šparoga jer mokraća postaje zelenkaste boje i ima karakterističan miris te hrane bogate karotenima jer mokraći daju tamnožutu boju, dan prije samog prikupljanja mokraće. Osim hrane, lijekovi i dodaci prehrani također mogu utjecati na boju, ali i na sastav mokraće. Unos dodataka prehrani s vitaminima B-kompleksa daje mokraći tamno žutu boju. Kako bi se izbjegli lažni rezultati i interferencije kod laboratorijskih pretraga, potrebno je navesti sve lijekove i suplemente koje pacijent konzumira te obavijestiti pacijenta da prije uzorkovanja izbjegne konzumaciju svih dodataka prehrani i lijekova koje nije propisao liječnik. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Kod određivanja pojedinih analita u mokraći potrebno je izbjegavati unos određenih namirnica nekoliko dana prije uzorkovanja kako bi se izbjegli lažni rezultati. Primjer takvog analita je 5-HIAA koja je glavni metabolit serotonina i određuje se u 24-satnoj mokraći. Kako serotonin nastaje iz triptofana, unos hrane koja je bogata tom aminokiselinom rezultirat će povećanim stvaranjem serotonina u tijelu te posljedično većom količinom metabolita serotonina koji će proći u mokraću i lažno povišenom koncentracijom 5-HIAA. Primjeri takve hrane koja se zbog navedenog razloga mora izbjegavati 3 dana prije sakupljanja mokraće za određivanje koncentracije 5-HIAA su avokado, banana, šljive, orašasti plodovi, ananas, patlidžan i rajčica. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; <https://klinkemija.kbcm.hr/>)

Određeni lijekovi također utječu na rezultate određivanja koncentracije 5-HIAA u mokraći. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Acetaminofen, fenacetin, metokarbamol, rezerpin, kofein, nikotin, efedrin, diazepam i fenobarbital povećavaju količinu 5-HIAA u mokraći. Lijekovi koji mogu smanjiti koncentraciju 5-HIAA u mokraći su acetilsalicilna kiselina, etanol, imipramin, fenotiazin, levodopa, metildopa, inhibitori monoamin-oksidge (MAO), heparin, izoniazid i triciklički antidepresivi. (<https://labos.ba>; <https://medlineplus.gov>) Ovisno o izvoru preporuča se izbjegavanje konzumacije hrane bogate triptofanom i lijekova koji utječu na koncentraciju 5-HIAA u mokraći 24 do 72 sata prije sakupljanja same 24-satne mokraće. (Burks i Bao, 2016)

1.4.2 Spremnici za mokraću

Za prikupljanje primarnog uzorka mokraće koriste se posebni spremnici i čaše napravljene od posebnog materijala koji je inertan za adsorpciju sastavnica mokraće. To je posebno važno zbog proteina u mokraći jer ih se fiziološki u mokraći nalazi malo pa bi adsorpcija na materijal spremnika značajno utjecala na rezultat pretrage. Uzorak mokraće ne smije se sakupljati u priručnim spremnicima. Preporuča se korištenje sterilnih spremnika za prikupljanje svih uzoraka mokraće iako se sterilan spremnik mora koristiti samo kod uzoraka za mikrobiološku analizu. Za prikupljanje jednokratne mokraće koriste se čaše, a za 24-satnu mokraću spremnici većeg volumena. Čaše i spremnici imaju čep i ne smiju se otvarati sve do uzorkovanja, a čep sadrži i integrirani zatvoreni sustav s iglom za prijenos uzorka mokraće iz čaše ili spremnika u epruvetu za analizu kako bi se spriječio doticaj mokraće s okolinom i što manje kontaminirao uzorak mokraće. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Čaše za prikupljanje mokraće imaju volumen između 100 i 150 mL i otvor promjera veći od 5 cm radi lakšeg prikupljanja uzorka. Spremnici za 24-satnu mokraću imaju volumen između 2 i 3 L. Spremnici za 24-satnu mokraću moraju biti graduirani kako bi se omogućilo očitavanje volumena skupljene mokraće bez otvaranja spremnika. Spremnici moraju biti neprozirni kako bi se spriječilo izlaganje svjetlu, a za fotoosjetljive analite poput porfirina načinjeni i od tamnijeg materijala. Spremnik je potrebno označiti naljepnicom na kojoj su napisani podaci o pacijentu i uzorku, a naljepnicu zalijepiti na spremnik, a ne na čep jer je tako manja vjerojatnosti zamjene uzorka i pojave identifikacijskih pogrešaka. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Za analizu mokraće najčešće se koriste epruvete s okruglim dnom bez aditiva sa žutim čepom volumena između 6 i 10 mL. Za kompletan pregled mokraće preporuča se korištenje epruveta s konusnim dnom. Kada se zna da analiza neće biti unutar 2 sata od primitka uzorka, potrebno je koristiti epruvete s konzervansom. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

1.4.3 Postupak prikupljanja

Kod uzorkovanja mokrenjem, prvo je potrebno oprati ruke i genitalije blagim sapunom i obrisati ručnikom. Ne preporuča se korištenje antiseptika i jakih sapuna jer mogu utjecati na rast bakterija, lizirati stanice i utjecati na kemijske reakcije na test traci (Topić i sur., 2018), dok nepranje dovodi do pojave lažno pozitivnih rezultata na prisustvo bakterija. Prvi mlaz kontaminiran je florom koja se nalazi u uretri pa se zbog toga sakuplja srednji mlaz mokraće. Posljednji mlaz mokraće također je potrebno odbaciti. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Prilikom sakupljanja 24-satne mokraće potrebno je pratiti posebne upute. Mokraća se skuplja u posebne standardizirane spremnike, a ovisno o pretragama koje će se obavljati, u spremniku se može nalaziti i konzervans. (Nikolac Gabaj i sur., 2019) Ukoliko se jedan spremnik napuni mokraćom prije nego što završi period sakupljanja 24-satne mokraće, nastavlja se sakupljanje u novi spremnik. Spremnike je potrebno čuvati na hladnom i tamnom mjestu kako bi se rast mikroorganizama i promjena sastava mokraće ograničili na najmanju mjeru. Tijekom sakupljanja potrebno je zadržati uobičajen unos hrane i vode, a preporuča se izbjegavanje kofeina i alkohola (etanola). Potrebno je naznačiti koje lijekove uzima pacijent koji sakuplja 24-satnu mokraću. (<https://klinkemija.kbcsm.hr>)

Sakupljanje 24-satne mokraće započinje mokrenjem prve jutarnje mokraće nakon buđenja koja se baca, ali se zapisuje vrijeme mokrenja. Navedeno vrijeme je vrijeme u kojem se sljedeći dan mora pomokriti u spremnik kao zadnja skupljena mokraća. Tokom cijelog dana počevši od prvog mokrenja nakon buđenja, mokraća se sakuplja u spremnik na način da pacijent mokraću prvo izbacuje u prikladnu čistu čašu iz koje onda mokraću izlije u spremnik. Ne uzorkuje se direktno u spremnik jer time se povećava vjerojatnost kontaminacije mokraće stanicama i ostalim kontaminatima. Ukoliko dođe do kontaminacije mokraće nekim stranim tijelom, nije poželjno da pacijent samostalno izvadi kontaminant nego je potrebno naglasiti kontaminaciju prilikom dostave 24-satne mokraće. (Čvorišćec i Čepelak, 2009; <https://klinkemija.kbcsm.hr>)

1.5 Konzervansi u mokraći

Konzervansi su tvari koje se upotrebljavaju prilikom prikupljanja ili pohrane uzorka mokraće kako bi povećali stabilnost uzorka mokraće na način da spriječe rast mikroorganizama, razgradnju sastavnica i oksidaciju analita u mokraći te održe analite otopljene u mokraći odnosno spriječe njihovo taloženje na dno. Od konzervansa najčešće se koriste kiseline, a najčešće su klorovodična kiselina, octena kiselina, nitratna kiselina i borna kiselina, no mogu se koristiti i ostali pripravci kao što su formaldehid, natrijev karbonat, toluen, timol i parabeni. U posljednje vrijeme kao konzervans koristi se i citrat (soli citrata) kao alternativa jakim kiselinama pošto su one opasne kemikalije. (Eugster i sur., 2021; Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Konzervansi mogu biti integrirani u primarne ili sekundarne spremnike za mokraću, mogu se dodati prije ili neposredno nakon sakupljanja mokraće, a postoje i komercijalni pripravci koji dolaze u obliku tableta koje se sastoje od nekoliko pripravaka u obliku soli i otope se u mokraći. Takve tablete često sadrže soli kalija i natrija što interferira s određivanjem

elektrolita u mokraći pa se za navedenu pretragu ne smiju koristiti ukoliko je sastav tablete nepoznat. Neke tablete sadrže i formaldehid koji se oslobađa i djeluje antimikrobno, no u većim količinama formaldehid otopljen u vodi (formalin) potiče taloženje ureje te inhibira neke kemijske reakcije kao što je reakcija dokazivanja prisutnosti leukocita u mokraći test trakom koja se temelji na reakciji u kojoj sudjeluje leukocitna esteraza, a formalin je inhibitor navedenog enzima što može rezultirati lažno negativnim rezultatom na prisutnost leukocita. Zakiseljavanje mokraće ispod $\text{pH} = 3$ korisno je kod određivanja steroida, adrenalina, noradrenalina i vanilmandelične kiseline, no kiseli pH pogoduje taloženju urata pa se zakiseljavanje ne koristi kod određivanja koncentracije urata. Kod određivanja koncentracije urata, urobilinogena i porfirina kao konzervans dodaje se blaga baza, najčešće natrijev karbonat, kako bi pH bio između 8 i 9 jer je stabilnost navedenih analita u tom području veća. (Nikolac Gabaj i sur., 2019)

Zakiseljavanje je obavezno kod određivanja katekolamina, metanefrina i homovanilinske kiseline (HVA) jer su ti analiti stabilni pri kiselom pH i u protivnom će se navedene molekule razgraditi što će rezultirati lažno sniženom koncentracijom. (Nikolac Gabaj i sur., 2019; Corcuff i sur., 2017) Najčešći konzervans koji se koristi kod prikupljanja mokraće za određivanje katekolamina i metanefrina je klorovodična kiselina.

Dodatan problem kod izrazito niskog pH je hidroliza sulfatiranih i konjugiranih metanefrina i katekolamina što interferira kod određivanja njihove slobodne frakcije u mokraći. To je najviše izraženo kod prve skupljene mokraće u spremnik za 24-satnu mokraću jer je volumen skupljene mokraće još uvijek izrazito malen i pH je niži nego što je na kraju kada je skupljena cijela mokraća. (Eugster i sur., 2021) Preporučeni pH mokraće kod određivanja katekolamina jest između 3 i 4. (Corcuff i sur., 2017)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Povećane koncentracije katekolamina adrenalina, noradrenalina, dopamina i njihovih metabolita u mokraći prisutne su kod različitih tumora koji ih luče pa je zbog toga analiza mokraće neophodna kod dijagnoze, praćenja i liječenja takvih tumora kao što su feokromocitom i neuroblastom. Za određivanje navedenih pretraga neophodno je dodavanje HCl-a u uzorak 24-satne mokraće. Ostale biokemijske i endokrinološke pretrage prilikom obrade takvih pacijenata određuju se u uzorku 24-satne mokraće bez dodatka HCl-a. Stoga su se kod pacijenata s navedenim tumorima u Kliničkom zavodu za kemiju dosad sakupljala dva uzorka 24-satne mokraće, jedan s konzervansom HCl u kojem su se određivali katekolamini i metanefrini, a drugi bez konzervansa u kojem su se određivali ostali analiti.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi utječe li dodatak konzervansa HCl, koji je neophodan za stabilnost katekolamina i njihovih metabolita na stabilnost analita u mokraći za koje inače nije potrebno dodavati konzervans prilikom sakupljanja kako bi se utvrdilo je li umjesto sakupljanja dva uzorka 24-satne mokraće, jednom s i jednom bez konzervansa, moguće sakupiti samo jedan uzorak s konzervansom i u takvom uzorku provesti željene pretrage. Ukratko, u ovom radu smo analizirali rezultate ispitivanja utjecaja dodatka HCl-a u uzorak 24-satne mokraće na promjene koncentracije proteina, elektrolita, ureje, urata, kreatinina, 5-HIAA, VMA i slobodnog kortizola.

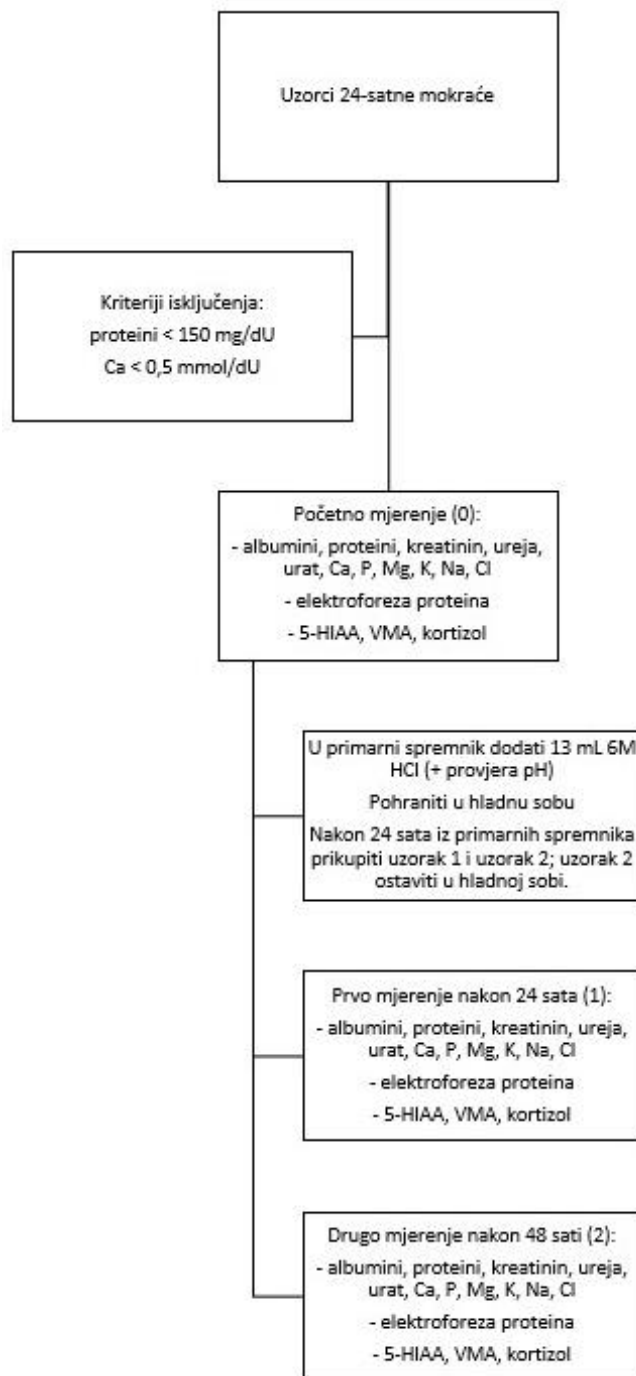
3. MATERIJALI I METODE

3.1 Prikupljanje uzoraka

Za provođenje ovog istraživanja korišteni su ostatni uzorci 24-satne mokraće koji su rutinski analizirani u Kliničkom zavodu za kemiju. Uzorci su sakupljeni u 2 navrata, 8.1.2024. i 22.1.2024. te je prikupljeno ukupno 19 uzoraka 24-satne mokraće. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice (Klasa: 003-06/24-03/026; ur. broj: 251-29-11/3-24-12).

10 mL 24-satne mokraće ambulantnih pacijenata koji su taj dan donijeli mokraću na analizu uzorkovano je u epruvete za mokraću (VACUETTE® TUBE 10 ml Z Urine No Additive 16x100 yellow cap-yellow ring, Round Base, non-ridged; Greiner Bio-One, Austrija). Kriteriji kod odabira uzoraka mokraće za mjerenja su koncentracija ukupnih proteina veća od 150 mg/dU i koncentracija kalcija veća od 0,5 mmol/dU kako bi se osigurale vrijednosti iznad donje granice mjernog raspona metode. Ukoliko su koncentracije ukupnih proteina i kalcija bile veće od donje granice mjernog raspona, uzorak u epruveti je zadržan za daljnju analizu biokemijskih parametara i uzet je još jedan uzorak iz primarnog spremnika u kojem su se određivali kortizol, 5-HIAA i VMA. Mjerenje u trenutku uključenja u istraživanje bez dodatka HCl-a označeno je kao mjerenje 0.

Nakon uzetih uzoraka za početno mjerenje, u primarni spremnik s uzorkom dodano je 13 mL 6 M klorovodične kiseline (HCl) i zapisano je vrijeme dodatka kiseline. Pomoću indikatorskog papira provjeren je pH kako bi se utvrdilo da je uzorak dovoljno zakiseljen. Cilj je bio da pH iznosi između 2 i 3 što je postignuto u svakom uzorku. Takav zakiseljeni uzorak je pohranjen u hladnu sobu na +4 °C. Nakon 24 sata uzeta su po četiri nova uzorka iz svake boce s mokraćom te su dva uzorka ostavljena u hladnoj sobi do sljedećeg dana kada su provedene pretrage, a iz dva uzorka su provedene prethodno navedene biokemijske i endokrinološke pretrage. Rezultati pretraga nakon 24 sata od dodatka kiseline zabilježeni su pod mjerenjem 1, a rezultati nakon 48 sati od dodatka kiseline pod mjerenjem 2. Protokol je u obliku hodograma prikazan na **Slici 2**.



Slika 2. Protokol istraživanja

3.2 Metode mjerenja

3.2.1 Biokemijske metode

Biokemijski parametri određeni su na biokemijskom analizatoru Abbott Alinity-c upotrebom originalnih reagensa tvrtke Abbott (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD).

Metoda kojom se određuje koncentracija ukupnih proteina u mokraći temelji se na turbidimetriji. Turbidimetrija je analitička metoda koja se temelji na smanjenju intenziteta propuštene svjetlosti kroz neki zamućeni uzorak. Što je uzorak više zamućen, to je pad intenziteta svjetlosti veći i količina ispitivanog analita veća. Reagens za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mokraći sadrži benzetonijev klorid, agens koji denaturira proteine u uzorku što rezultira nastankom suspenzije koja se turbidimetrijski kvantificira na 404 nm. Izmjerena apsorbanacija proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku.

Albumini u mokraći određuju se imunoturbidimetrijskom metodom. Reagens sadrži kozja poliklonalna protutijela na ljudski albumin te miješanjem reagensa i uzorka dolazi do nastanka netopljivog kompleksa albumin-antitijelo što se očituje zamućenjem uzorka i mjeri turbidimetrijom. Koncentracija albumina proporcionalna je zamućenju uzorka i padu intenziteta propuštene svjetlosti.

Kreatinin se određuje modificiranom Jaffe-ovom metodom koja se temelji na reakciji pikrinske kiseline i kreatinina u alkalnom mediju u kojoj nastaje narančasto obojen kompleks kreatinin-pikrat. Porast apsorbanacije pri 500 nm proporcionalan je koncentraciji kreatinina u uzorku.

Anorganski fosfat određuje se spektrofotometrijski. Reagens koji se koristi za određivanje koncentracije anorganskih fosfata sadrži surfaktante koji omogućuju da se anorganski fosfat određuje u uzorku koji sadrži proteine bez zasebnog koraka deproteinizacije, a amonijev molibdat iz reagensa tvori kompleks s anorganskim fosfatom koji apsorbira na valnoj duljini od 340 nm. Porast apsorbanacije direktno je proporcionalan količini anorganskog fosfata u uzorku.

Kalcij u kiseloj otopini reagira s arsenazo III bojom i tvori plavo-ljubičasti kompleks koji se mjeri fotometrijski na 660 nm. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini kalcija u uzorku.

Elektroliti natrij, kalij i klor određuju se indirektnom potenciometrijom pomoću ion selektivnih elektroda. Uzorak se razrjeđuje i ion koji se određuje migrira na membranu vlastite selektivne elektrode gdje uzrokuje određeni električni potencijal koji se uspoređuje s

referentnom elektrodom koja je vodikova elektroda. Razlika u električnim potencijalima pretvara se u koncentracije svakog od navedenih iona.

Magnezij u uzorku određuje se fotometrijskom enzimatskom metodom s izocitrat dehidrogenazom. Magnezij je kofaktor za navedeni enzim. Reaktanti NADP i D-izocitratna kiselina u enzimatskoj reakciji s magnezijem kao kofaktorom prelaze u produkte CO₂, 2-oksoglutarat i NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) koji apsorbira elektromagnetsko zračenje na 340 nm. Prati se porast apsorbancije zbog nastanka NADPH koji je proporcionalan koncentraciji magnezija u uzorku.

Za određivanje koncentracije ureje koristi se kinetička metoda s ureazom. Test ima dva stupnja, u prvoj reakciji koju katalizira ureaza, dolazi do hidrolize ureje na amonijak i ugljikov dioksid. U drugoj reakciji nastali amonijak reagira s α -ketoglutaratom te nastaje glutaminska kiselina i voda. Drugu reakciju katalizira enzim glutamat dehidrogenaza, a u reakciji se troši kofaktor NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) pa nastaje NAD⁺. Kako NADH apsorbira pri valnoj duljini od 340 nm, dolazi do pada apsorbancije. U početku je pad apsorbancije linearan te u tom periodu brzina opadanja ovisi samo o količini ureje u uzorku iz čega se onda izračunava početna koncentracija ureje. Za svaki 1 mol ureje oksidira se 2 mola NADH.

Mokraćna kiselina određuje se fotometrijski reakcijom u dva stupnja. U prvoj reakciji urat se pomoću enzima urikaze oksidira u allantoin i nastaje vodikov peroksid kao nusprodukt reakcije. U drugoj reakciji nastali vodikov peroksid reagira s 4-aminoantipirinom, N,N-bis-(4-sulfobutil)-3-metilanilinom i dinatrijevom soli te uz prisustvo peroksidaze kao produkt nastaje kinoniminska boja. Nastala boja apsorbira svjetlost valne duljine 604 nm te se prati povećanje apsorbancije koje je proporcionalno koncentraciji mokraćne kiseline u uzorku.

3.2.2 Imunokemijske metode

Kortizol u mokraći određuje se kompetitivnom imunokemijskom metodom koja se temelji na elektrokemiluminiscenciji, specifičnije ECLIA metodi (engl. *electrochemiluminescence immunoassay*). Uređaj na kojem je učinjena analiza je Cobas e801 tvrtke Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) korištenjem originalnog reagensa proizvođača (Elecsys Cortisol III). Prvo se uzorak mokraće inkubira s 6 μ L biotiniziranih monoklonskih antitijela na kortizol te dolazi do nastanka kompleksa kortizol-antitijelo čija je količina proporcionalna koncentraciji kortizola u mokraći. Antitijelo se dodaje u suvišku i nakon prve inkubacije postoje još antitijela koja nisu vezana za kortizol. U drugoj inkubaciji u smjesu se dodaju mikročestice obložene streptavidinom i otopina derivata kortizola obilježenog

rutenijem. Derivat kortizola veže se na ostatak biotiniliranih antitijela koji nije vezao kortizol iz uzorka. Streptavidin ima vrlo visoki afinitet za biotin te je njihova interakcija jedna od najjačih nekovalentnih interakcija između dvaju molekula. Zbog navedene interakcije, na kraju druge inkubacije u otopini su prisutni kompleksi mikročestica i antitijela međusobno povezani pomoću biotina i streptavidina. Navedena otopina aspirira se u reakcijsku kivetu gdje se kompleks mikročestica-antitijelo magnetski veže za elektrodu, a ostatak otopine se ispire iz reakcijske posude pomoću ProCell II M otopine koja sadrži tripropilamin. Primjenom električnog potencijala na elektrodu dolazi do redoks reakcije između rutenija i tripropilamina u kojoj tripropilamin reducira rutenij, rutenij prelazi u ekscitirani oblik i vraćanjem u ne-ekscitirani oblik emitira elektromagnetsko zračenje odnosno svjetlost koja se detektira fotomultiplikatorom. Što je veća koncentracija kortizola u uzorku, u prvoj inkubaciji će se više antitijela vezati za kortizol iz uzorka što posljedično znači da će se manje derivata kortizola obilježenog rutenijem vezati za ostatak antitijela i signal će biti manji. Odnos koncentracije kortizola i signala je obrnuto proporcionalan, a točna koncentracija se očitava iz kalibracijske krivulje.

3.2.3 HPLC

Za određivanje endokrinoloških parametara korišten je sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti Prominence HPLC (engl. *high-performance liquid chromatography*) uz elektrokemijski detektor (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

HPLC metoda je analize i razdvajanja uzorka na pojedine sastavnice na temelju njihove veličine i adsorpcije na čestice u koloni. Unutar kolone nalaze se čestice koje imaju ulogu stacionarne faze, a otapalo koje se miješa s uzorkom i provodi ga kroz stacionarnu fazu ima ulogu pokretne faze. Čestice unutar kolone imaju oblik kugle, a promjer čestice uvjetuje sposobnost razdvajanja sastavnica. Većim promjerom čestica postiže se manja površina, dok se manjim promjerom čestica postiže veća površina stacionarne faze i time je omogućeno bolje razdvajanje, no pritisak i vrijeme koje je potrebno da sastavnice prođu kolonu su veći. Također čestice stacionarne faze su porozne i sadrže udubljenja i kanaliće u koje ulaze manji analiti i time zaostaju za većim analitima čime je omogućena separacija sastavnica ovisno o veličini analita. Analiti stupaju i u različite nekovalentne interakcije sa stacionarnom fazom što dodatno povećava rezoluciju na kromatografu odnosno postiže se bolje razdvajanje uzorka na sastavnice. Kako bi se analiti mogli kvantitativno i kvalitativno odrediti, potrebno je prije same

analize provesti standarde i kalibratore poznatih koncentracija kako bi se odredilo retencijsko vrijeme za pojedini analit i povezoao intenzitet signala s koncentracijom.

Prije same analize uzorka i određivanja koncentracija VMA i 5-HIAA, potrebno je navedene analite ekstrahirati iz uzorka. Ekstrakcija se provodi u digestoru. Osim ekstrakcije u uzorcima mokraće, isti postupak ekstrakcije provodi se i u kalibracijskom standardu te normalnoj i patološkoj kontroli kako bi se osigurala uspješnost ekstrakcije. Prvo se u plastičnu epruvetu doda 0,3 g NaCl, 400 μ L mokraće ili kontrole, 200 μ L demineralizirane vode, 50 μ L 6 M klorovodične kiseline, 25 μ L izvorne otopine internog standarda i 3 mL etil acetata te se smjesa stavi na tresilicu 5 minuta, a zatim na centrifugu 5 minuta. Natrijev klorid služi za čišćenje uzorka od grubih nečistoća. Interni standard sadrži analit sličan analitu od interesa koji nije prisutan u mokraći, a služi nam za korekciju rezultata. Prilikom svake ekstrakcije gubi se dio molekula pa se dodaje interni standard u smjesu za ekstrakciju i na kraju usporedbom signala internog standarda i uzorka načini korekcija rezultata. Etil acetat je organska faza u kojoj se nakon centrifugiranja nalaze VMA i 5-HIAA u gornjem sloju iznad vodenog sloja u epruveti. Zatim se iz sloja etil acetata prikupi pipetom 2,5 mL i prebaci u novu plastičnu epruvetu u koju se još doda 400 μ L K₂HPO₄ te ponovo stavi prvo 5 minuta na tresilicu pa 5 minuta na centrifugu. Nakon centrifuge postoje dva sloja u epruveti, gornji sloj je sloj etil acetata, a donji je sloj K₂HPO₄ u kojem su prisutni analiti VMA i 5-HIAA. Iz donjeg sloja odvoji se 200 μ L u bočice za HPLC, doda se 20 μ L 6 M HCl i promiješa se na vrtložnoj miješalici te je tako pripremljen uzorak spreman za analizu na HPLC uređaju. Uvjeti HPLC analize navedeni su u **Tablici 2**.

Tablica 2. Uvjeti HPLC analize

| Uvjeti HPLC | |
|-----------------------|---|
| Kromatografska kolona | C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m |
| Protok pokretne faze | 1 mL/min |
| Pokretna faza | 90 mL pufer 0,025 M NaH ₂ PO ₄ + 10 mL metanol |
| Vrijeme analize | 19 minuta |
| Detektor | ECD (engl. <i>electrochemical detector</i> , elektrokemijski detektor), 800 mV, 50 nA, 0,5 Hz |
| Temperatura | 25 °C |
| Volumen injektiranja | 2 mL |

3.3 Statistička obrada podataka

Izračunato je odstupanje (*bias*) u postocima između pojedinih mjerenja 1 i 2 (C_{1-19}) od mjerenja 0 (C_0) za svaki analit i uzorak prema formuli:

$$Bias (1 - 19) = \frac{(C_{1-19}) - C_0}{C_0} * 100 \%$$

Srednje odstupanje izračunato je kao aritmetička sredina svih odstupanja analita za pojedino mjerenje od mjerenja 0. Srednje odstupanje uspoređeno je s kriterijima prihvatljivosti. Utjecaj konzervansa HCl na stabilnost analita u mokraći smatra se značajnim ukoliko je odstupanje veće od kriterija prihvatljivosti dobavljača vanjske kontrole kvalitete (VKK) koji se koriste za ocjenu metoda u Kliničkom zavodu za kemiju navedenih u **Tablici 3**.

Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti i izvori za odstupanja pri ispitivanju pojedinih analita u mokraći

| Analit | Kriterij prihvatljivosti [%] | Izvor kriterija |
|---------------|-------------------------------------|------------------------|
| Albumin | 15 | CROQALM |
| Proteini | 24 | INSTAND |
| Kreatinin | 14 | CROQALM |
| Ureja | 13,5 | RfB |
| Urat | 9,2 | RIQAS |
| Kalcij | 17 | INSTAND |
| Fosfati | 20,5 | INSTAND |
| Magnezij | 20 | INSTAND |
| Kalij | 15 | INSTAND |
| Natrij | 12 | RfB |
| Kloridi | 14 | RfB |
| 5-HIAA | 30 | EQAS Biorad |
| VMA | 30 | EQAS Biorad |
| Kortizol | 20 | UKNEQAS |

CROQALM - Hrvatski centar za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu; INSTAND - engl. *Society for Promotion of Quality Assurance in Medical Laboratories*; RfB - njem. *Referenzinstitut für Bioanalytik*; RIQAS - engl. *External quality assessment scheme from Randox Laboratories*;

EQAS - engl. *External Quality Assessment Services*; UKNEQAS - engl. *United Kingdom National External Quality Assessment Service*.

Dodatno, načinjena je Passing-Bablokova regresijska analiza podataka kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje za svaki analit između pojedinih mjerenja, odnosno između mjerenja 1 i 0 te mjerenja 2 i 0. Dobivene jednadžbe pravca ($y = a + bx$) prikazane su s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti za koeficijent smjera pravca i odsječak na osi y. Ukoliko 95 % interval pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*) odsječka na osi y (a) ne obuhvaća 0, tj. obje granice intervala su ili manje (npr. -5,0 do -0,2) ili veće (npr. 0,9 do 4,3) od nule, postoji statistički značajno konstantno odstupanje između metoda. Ukoliko 95 % CI koeficijenta smjera pravca (b) ne obuhvaća 1, tj. obje granice intervala su ili manje (npr. 0,4 do 0,9) ili veće (npr. 1,1 do 8,3) od jedinice, postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje između metoda.

Statistička obrada podataka načinjena je u statističkom programu MedCalc v11.5.1.0 (Mariakerke, Belgija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati

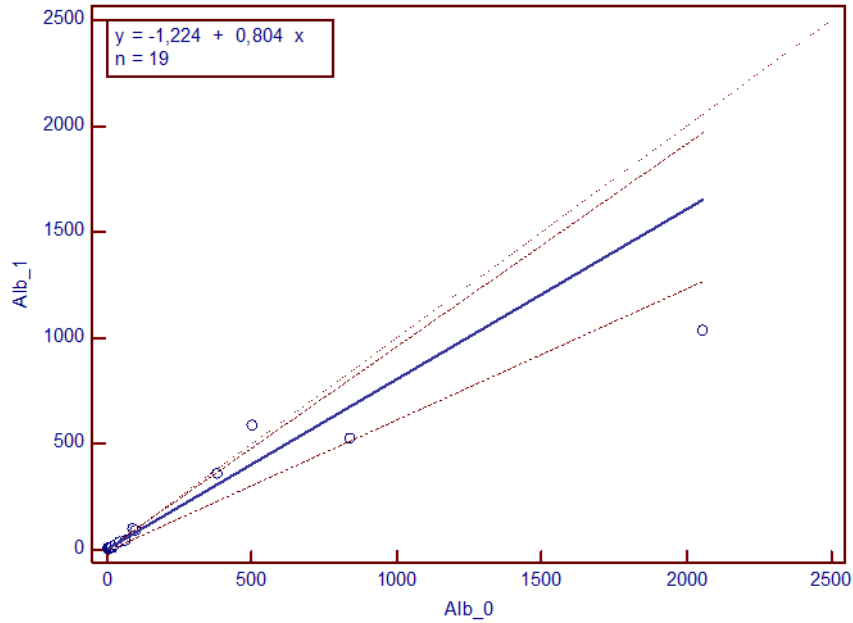
Zbirni rezultati istraživanja prikazani su u **Tablici 4**. Dodatak HCl-a u uzorak 24-satne mokraće nije doveo do statistički značajne promjene koncentracije za kreatinin, ureu, urat, kalcij, fosfate, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA nakon 24 sata niti nakon 48 sati, dok je statistički značajan utjecaj zabilježen za albumin, proteine, kloride i kortizol.

Tablica 4. Rezultati ispitivanja stabilnosti analita u zakiseljenom uzorku

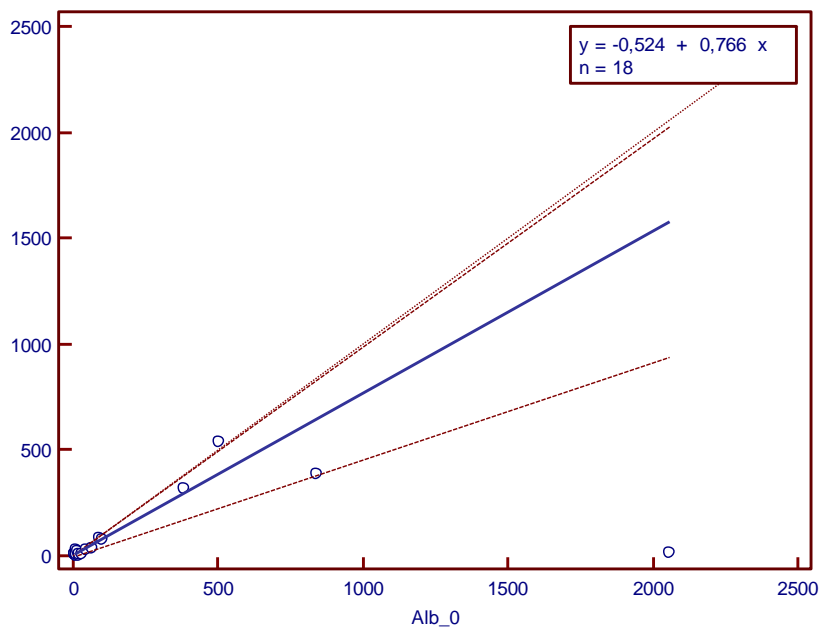
| Analit | Srednje odstupanje nakon 24 sata (%) | Srednje odstupanje nakon 48 sati (%) | Kriterij prihvatljivosti (%) |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Albumin | -23,5 % | -22,4 % | 15,0 % |
| Proteini | -35,5 % | -39,4 % | 24,0 % |
| Kreatinin | -2,2 % | 0,4 % | 14 % |
| Ureja | -1,9 % | 1,7 % | 13,5 % |
| Urat | -9,0 % | -7,4 % | 9,2 % |
| Kalcij | -3,0 % | 0,4 % | 17 % |
| Fosfati | -3,8 % | -0,9 % | 20,5 % |
| Magnezij | 3,8 % | 4,8 % | 20,0 % |
| Kalij | -1,5 % | 0,8 % | 15 % |
| Natrij | -1,1 % | 0,0 % | 12 % |
| Kloridi | 71,5 % | 70,5 % | 14,0 % |
| 5-HIAA | -0,7 % | -1,6 % | 30 % |
| VMA | 0,0 % | 0,1 % | 30 % |
| Kortizol | 107,8 % | 112,7 % | 20 % |

Vrijednosti označene podebljano predstavljaju odstupanja veća od kriterija prihvatljivosti.

Koncentracija albumina statistički je značajno pala više od dozvoljene granice prihvatljivosti već nakon 24 sata. Pad koncentracije ostao je konstantan i nakon 48 sati. Passing-Bablokova regresijska analiza je pokazala prisutnost statistički značajnog proporcionalnog odstupanja bez konstantnog odstupanja nakon 24 sata (**Slika 3**) i 48 sati (**Slika 4**).



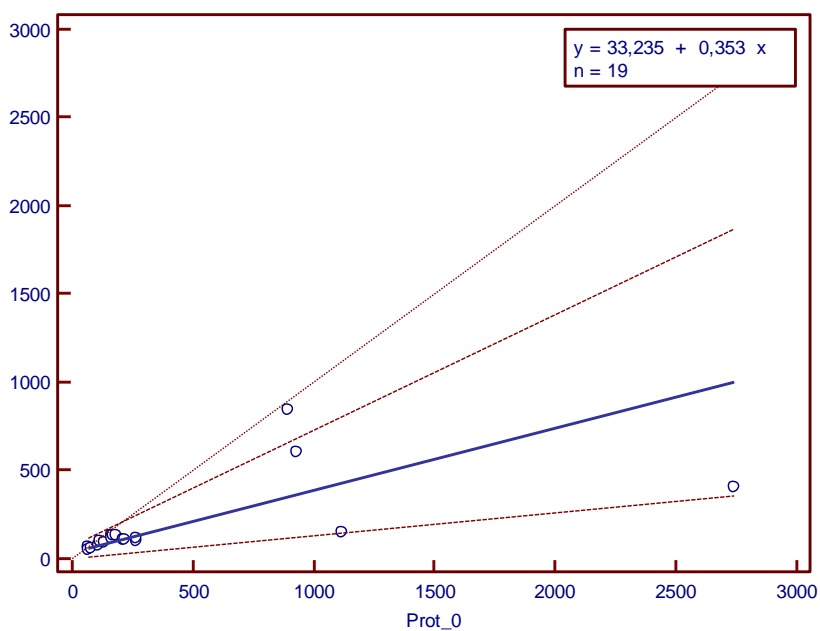
Slika 3. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije albumina u zakiseljenoj mokraći nakon 24 sata ($y = -1,22 (-4,72 \text{ do } 2,60) + 0,80 (0,62 \text{ do } 0,96) x$)



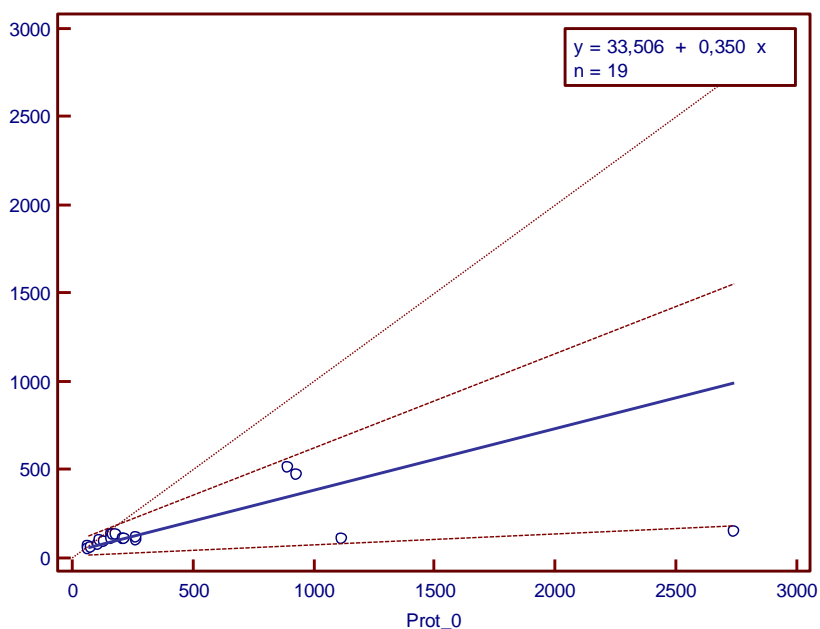
Slika 4. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije albumina u zakiseljenoj mokraći nakon 48 sati ($y = -0,52 (-7,04 \text{ do } 3,99) + 0,77 (0,45 \text{ do } 0,98) x$)

Koncentracija proteina također je statistički značajno pala više od dozvoljene granice prihvatljivosti već nakon 24 sata. Pad koncentracije ostao je konstantan i nakon 48 sati i bio je veći od pada koncentracije albumina. Passing-Bablokova regresijska analiza je pokazala

prisutnost statistički značajnog proporcionalnog i konstantnog odstupanja nakon 24 sata (**Slika 5**) i 48 sati (**Slika 6**).

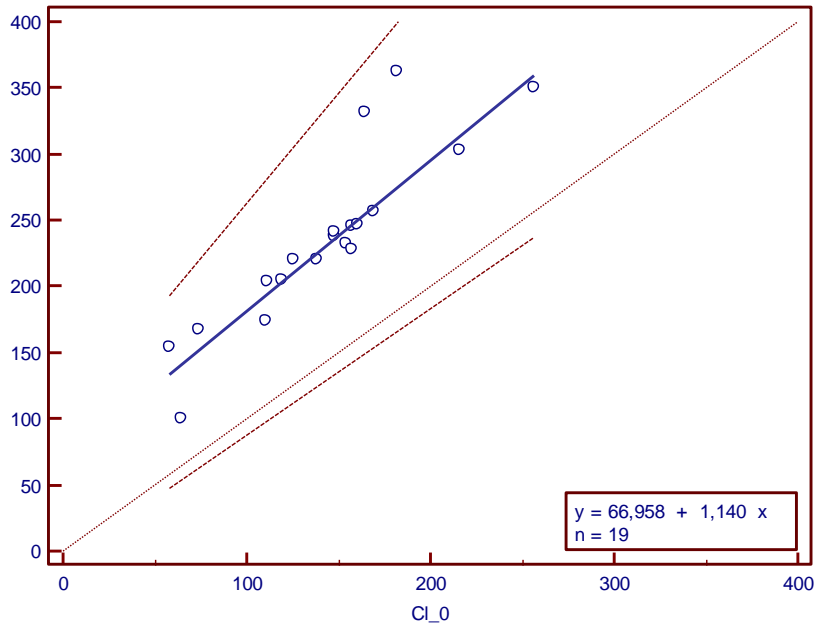


Slika 5. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije ukupnih proteina u zakiseljenoj mokraći nakon 24 sata ($y = 33,3$ (3,63 do 76,7) + $0,35$ (0,13 do 0,65) x)

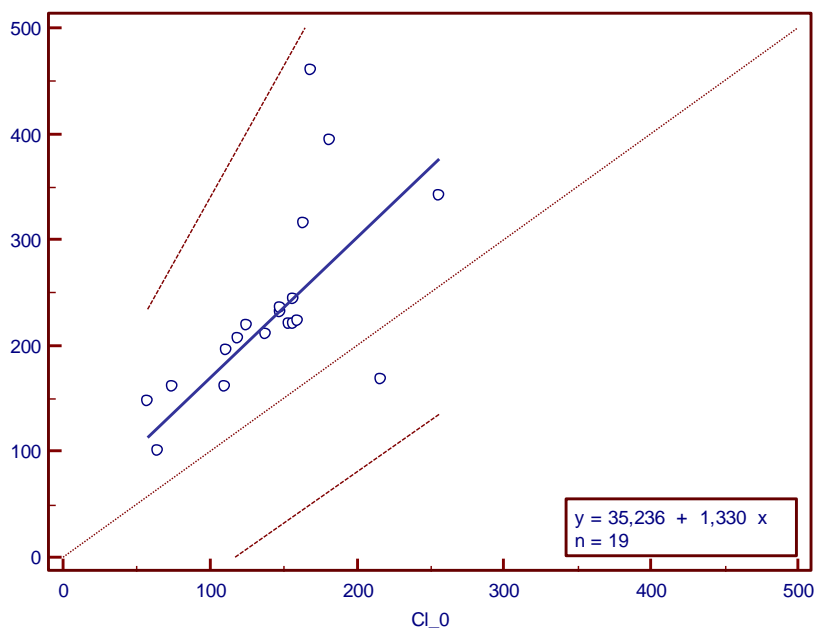


Slika 6. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije ukupnih proteina u zakiseljenoj mokraći nakon 48 sati ($y = 33,50$ (13,93 do 91,72) + $0,35$ (0,06 do 0,53) x)

Za razliku od proteina i albumina, utvrđene su lažno povišene koncentracije klorida nakon 24 sata i 48 sati. Iako Passing-Bablokova regresijska analiza nije utvrdila statistički značajna odstupanja nakon 24 sata (**Slika 7**) niti nakon 48 sati (**Slika 8**) sva pojedinačna odstupanja su istog smjera s prosječnim odstupanjem od 71,5 (70,5) % te stoga ovo odstupanje smatramo klinički značajnim.

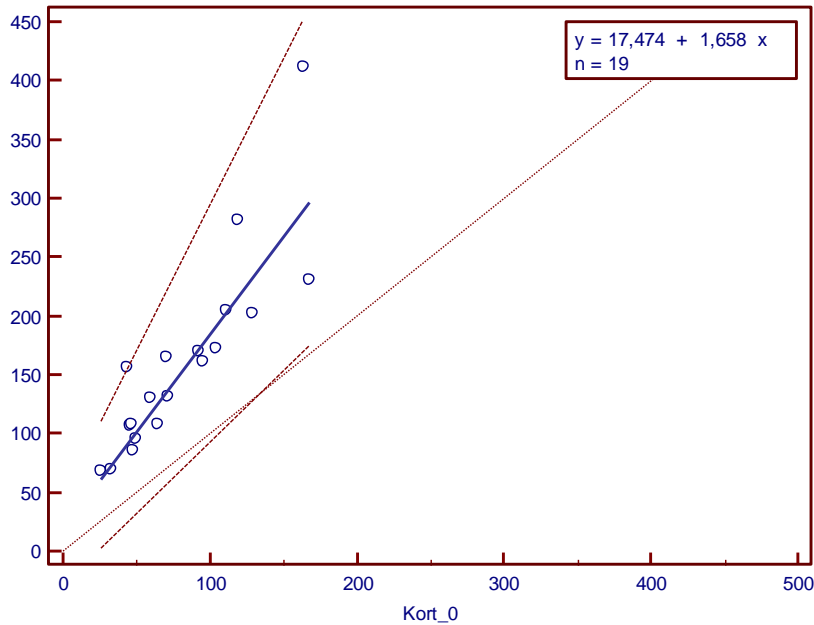


Slika 7. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije klorida u zakiseljenoj mokraći nakon 24 sata ($y = 66,95 (-8,67 \text{ do } 96,12) + 1,14 (0,96 \text{ do } 1,67) x$)

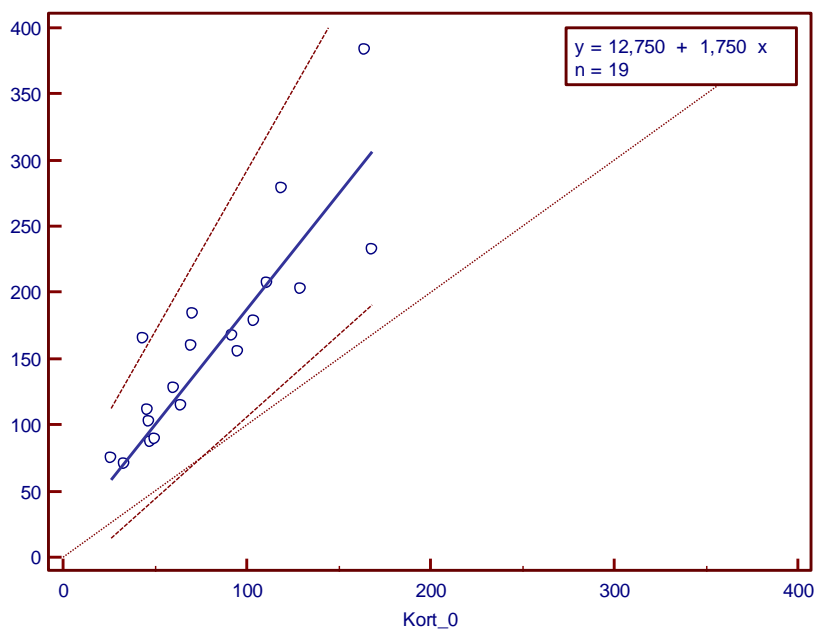


Slika 8. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije klorida u zakiseljenoj mokraći nakon 48 sati ($y = 35,23 (-114,00 \text{ do } 88,9) + 1,33 (0,97 \text{ do } 2,5) x$)

Zakiseljavanje mokraće pokazalo je najsnažniji učinak na određivanje koncentracije kortizola. Dvostruko veće koncentracije utvrđene su već nakon 24 sata. Passing-Bablokova regresijska analiza pokazala je statistički značajno proporcionalno odstupanje bez konstantnog odstupanja nakon 24 sata (**Slika 9**) i nakon 48 sati (**Slika 10**).



Slika 9. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije kortizola u zakiseljenoj mokraći nakon 24 sata ($y = 17,4 (-28,91 \text{ do } 45,9) + 1,65 (1,21 \text{ do } 2,47) x$)



Slika 10. Passing-Bablokova analiza određivanja koncentracije kortizola u zakiseljenoj mokraći nakon 48 sati ($y = 12,75 (-17,81 \text{ do } 49,13) + 1,75 (1,24 \text{ do } 2,43) x$)

4.2. Rasprava

Dodatak klorovodične kiseline (HCl) u uzorak 24-satne mokraće doveo je do lažno sniženih koncentracija albumina i ukupnih proteina. Do lažno sniženih koncentracija albumina i ukupnih proteina dolazi zbog denaturacije proteina u kiselom mediju. Proteini se u kiselom mediju zbog promjene naboja bočnih lanaca aminokiselina i promjene u elektrostatskim interakcijama denaturiraju te se gubi struktura proteina. Za proteine koji se određuju imunokemijskim metodama (albumin) mijenjaju se antigenska vezna mjesta na koja se vežu antitijela koje koristimo kod analize. Zbog navedene konformacijske promjene antitijelo u reagensu ne prepoznaje denaturirane molekule albumina što dovodi do lažno snižene koncentracije. Slično tomu, za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mokraći neophodne su intaktne proteinske molekule. Promjena naboja na karboksilnim skupinama aminokiselinskih ostataka onemogućuje vezanje benzetonijeva klorida i posljedično rezultira lažno sniženom koncentracijom. Rezultati su u skladu s očekivanim te potvrđuju rezultate stabilnosti albumina i proteina u zakiseljenoj mokraći iz 2011. godine. (Feres i sur., 2011)

Klinički učinci određivanja proteina i albumina u zakiseljenoj mokraći bili bi brojni jer je prisutnost proteina u mokraći klinički pokazatelj mnogih patoloških stanja. Proteinurija je prisutna kod bolesti srca i kardiovaskularnog sustava, posebice kod stanja praćenih hipertenzijom i stanjima kod kojih je smanjena perfuzija bubrega i smanjen protok krvi kroz glomerul. Proteinurija je prisutna i kod upalnih bolesti mokraćnog sustava, a posebice upalnih bolesti glomerula i bolesti tubula nefrona čiji je proteinurija glavni pokazatelj oštećenja. Proteinurija može biti pokazatelj i povećane koncentracije proteina u krvotoku kao što je primjer s paraproteinurijama kod imunoproliferativnih bolesti. Osim što ukazuje na navedene poremećaje, proteinurija ima važnu ulogu kao prognostički biljeg bubrežnog oštećenja jer je dokazana korelacija stupnja bubrežnog oštećenja i stupnja proteinurije. (Čvorišćec i Čepelak, 2009) Zbog navedenog razloga lažno snižene koncentracije proteina u zakiseljenoj mokraći dovele bi do propuštanja postavljanja dijagnoze bubrežnog oštećenja što bi moglo imati značajne posljedice za bolesnike.

Proteinurija je čest komorbiditet i važan je biljeg oštećenja bubrega kod osoba s dijabetesom jer kronična hiperglikemija dovodi do oštećenja nefrona i povećane propusnosti glomerula pa je iznimno važno da u dijabetesu ne dođe do lažno sniženih koncentracija proteina u mokraći kako bi se pravovremeno uočilo i izbjeglo daljnje oštećenje bubrega što bi mogao biti slučaj ukoliko se koristi zakiseljeni uzorak mokraće.

Albumin je protein koji se najčešće nalazi u proteinuriji. Kako je njegova koncentracija u krvi velika i ima molekulsku masu manju od 70 kDa, povećane razine albumina u mokraći prvi su pokazatelj povećane propusnosti glomerula. Ukoliko bi se koncentracija albumina u mokraći određivala iz uzorka zakiseljene mokraće, veća je vjerojatnost da se stanje neće primijetiti čime se riskira pogoršanje stanja i nastanak kroničnih bubrežnih bolesti i ireverzibilnog oštećenja bubrega.

U istraživanju Feres i sur. (2011), navedeno je da se kod određivanja klorida ne smije koristiti konzervans HCl pošto njegovo dodavanje utječe na koncentraciju klorida u uzorku, odnosno izravno je povećava, što je utvrđeno i u ovom istraživanju.

Iako su u istraživanjima iz 2008. i 2011. godine zabilježena odstupanja u koncentraciji mokraćne kiseline nakon zakiseljavanja mokraće zbog nastanka i precipitacije kristala mokraćne kiseline, u ovom istraživanju nije utvrđeno statistički značajno odstupanje te je mokraćna kiselina bila stabilna u zakiseljenim uvjetima tijekom 48 sati. (Feres i sur., 2011; Yilmaz i sur., 2008)

Uzrok pojave lažno povišenih koncentracija kortizola u zakiseljenoj mokraći teško je predvidjeti pošto se radi o kemiluminiscentnoj metodi. Određivanje koncentracije kortizola u zakiseljenoj mokraći moglo bi dovesti do sumnje na hiperfunkciju nadbubrežne žlijezde i dodatnih testova čime se osim bespotrebnog gubitka vremena i reagensa u laboratoriju, dodatno inducira i stres kod samih pacijenata. Također neki od testova kod postavljanja dijagnoze takvih stanja su invazivni.

5. ZAKLJUČCI

U zakiseljenom uzorku 24-satne mokraće možemo određivati kreatinin, ureju, urat, kalcij, fosfate, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA. Takav uzorak stabilan je tijekom 48 sati, što je korisno jer bolesnici najčešće prikupljaju uzorak vikendom.

U zakiseljenoj mokraći ne možemo određivati albumine, proteine, kloride i kortizol jer im stabilnost u zakiseljenoj mokraći nije prihvatljiva.

Naše istraživanje pomoći će u promjeni Uputa za bolesnike Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre Milosrdnice gdje više neće biti potrebno sakupljati 24-satnu mokraću u dva navrata, bez i s konzervansom, ako se uz katekolamine i metanefrine u mokraći traže pretrage kreatinin, ureja, urat, kalcij, fosfati, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA pošto im je stabilnost u zakiseljenoj mokraći prihvatljiva tijekom 48 sati.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina

ACTH – adrenokortikotropni hormon

ADH – antidiuretski hormon

ATP – adenzin trifosfat

CI – engl. *confidence interval*, interval pouzdanosti

CROQALM – Hrvatski centar za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

ECD – engl. *electrochemical detector*, elektrokemijski detektor

ECLIA – engl. *electrochemiluminescence immunoassay*, elektrokemiluminiscentni imunotest

EQAS – engl. *External Quality Assessment Services*, usluge vanjske kontrole kvalitete

HPLC – engl. *high performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HVA – homovanilinska kiselina

INSTAND – engl. *Society for Promotion of Quality Assurance in Medical Laboratories*, Društvo za promicanje osiguranja kvalitete u medicinskim laboratorijima

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

LSD – engl. *lysergic acid diethylamide*, dietilamid lizerginske kiseline

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

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

RfB – njem. *Referenzinstitut für Bioanalytik*, Referentni institut za bioanalitiku

RIQAS – engl. *External quality assessment scheme from Randox Laboratories*, Shema vanjske procjene kvalitete iz Randox laboratorija

UKNEQAS – engl. *United Kingdom National External Quality Assessment Service*, Nacionalna služba za vanjsku procjenu kvalitete Ujedinjenog Kraljevstva

VKK – vanjska kontrola kvalitete

VMA – vanilmandelična kiselina

7. LITERATURA

Burks ML, Bao S. The 24-hour urinary 5-HIAA: A simple test with a common pitfall. *AACE Clin. Case Rep*, 2016, 2(3), 186-188.

Corcuff JB, Chardon L, El Hajji Ridah I, Brossaud J. Urinary sampling for 5HIAA and metanephrines determination: revisiting the recommendations. *Endocr Connect*, 2017, 6(6), 87-98.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 319-332, 360-364, 472-504.

Eugster PJ, Centeno C, Dunand M, Seghezzi C, Grouzmann E. Stabilization of urinary biogenic amines measured in clinical chemistry laboratories. *Clin Chim Acta*, 2021, 514, 24-28.

Feres MC, Bini R, De Martino MC, Biagini SP, de Sousa AL, Campana PG, Tufik S. Implications for the use of acid preservatives in 24-hour urine for measurements of high demand biochemical analytes in clinical laboratories. *Clin Chim Acta*, 2011, 412, 2322-2325.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija – udžbenik trinaesto izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 323-333.

Nikolac Gabaj N. i sur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 8-37.

Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 218-237.

Uputstva proizvođača Abbott za određivanje biokemijskih pretraga u mokraći na analizatoru Alinity-c

Yilmaz G, Yilmaz FM, Hakligör A, Yücel D. Are preservatives necessary in 24-hour urine measurements?. *Clin Biochem.* 2008, 41, 899-901.

Kako se pripremiti za laboratorijsku pretragu, 2024., <https://www.kbcm.hr>, pristupljeno 20. 4. 2024.

5-HIAA urine test, 2022., <https://medlineplus.gov>, pristupljeno 18. 3. 2024.

5 HIAA, 2023., <https://labos.ba>, pristupljeno 18. 3. 2024.

8. SAŽETAK

Analiza mokraće ima važnu ulogu kod dijagnoze i probira na bolesti te praćenju tijeka bolesti i uspješnosti terapije. Određeni endokrinološki analiti zahtijevaju dodatak kiseline kao konzervansa u spremnik za sakupljanje mokraće kako bi im stabilnost ostala očuvana do analize, dok se za određivanje biokemijskih parametara ne mora sakupljati zakiseljeni uzorak. Kako se uzorak 24-satne mokraće najčešće sakuplja tijekom vikenda, u ovom istraživanju ispitivan je utjecaj dodatka HCl na stabilnost proteina, albumina, kreatinina, ureje, urata, kalcija, fosfata, magnezija, kalija, natrija, klorida, kortizola, VMA i 5-HIAA u mokraći tijekom 24 i 48 sati kako bi se utvrdilo je li moguće u jednom zakiseljenom uzorku određivati navedene analite čime bi se izbjeglo sakupljanje dva uzorka 24-satne mokraće (s i bez konzervansa).

Rezultati istraživanja pokazali su da su parametri kreatinin, ureja, urat, kalcij, fosfati, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA stabilni u zakiseljenom uzorku tijekom 24 i 48 sati. Kod određivanja koncentracije proteina i albumina primijećeno je smanjenje koncentracije tijekom 24 i 48 sati, dok je kod određivanja kortizola i klorida uočeno lažno povišenje koncentracije.

Iz dobivenih rezultata zaključujemo da ukoliko se uz katekolamine i metanefrine u mokraći traže pretrage kreatinin, ureja, urat, kalcij, fosfati, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA, navedene pretrage mogu se provesti iz jednog zakiseljenog uzorka 24-satne mokraće čime se smanjuje broj uzoraka koji dolaze u laboratorij na analizu što olakšava pacijentima sakupljanje uzorka, a u laboratoriju se smanjuje mogućnost pojave pogrešaka.

SUMMARY

Urine analysis plays an important role in the diagnosis and screening of diseases, as well as in monitoring the course of diseases and the effectiveness of therapy. Certain endocrinological analytes require the addition of acid as a preservative in the urine collection container to maintain their stability until analysis, while the collection of an acidified sample is not necessary for the determination of biochemical parameters. Since the 24-hour urine sample is often collected over the weekend, this study examined the effect of adding HCl on the stability of proteins, albumin, creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, chloride, cortisol, VMA, and 5-HIAA in urine over 24 and 48 hours to determine whether it is possible to measure these analytes in a single acidified sample, thus avoiding the collection of two 24-hour urine samples (with and without preservatives).

The results of the study showed that creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, 5-HIAA, and VMA are stable in acidified samples over 24 and 48 hours. However, a decrease in the concentration of proteins and albumin was observed over 24 and 48 hours, while a false increase in the concentration of cortisol and chloride was noted.

From the obtained results, we conclude that if tests for creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, 5-HIAA, and VMA are required along with catecholamines and metanephrines in urine, these tests can be performed from a single acidified 24-hour urine sample. This reduces the number of samples submitted to the laboratory for analysis, making sample collection easier for patients and reducing the likelihood of errors in the laboratory.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za Medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA UTJECAJA DODATKA KONZERVANSA (HCl) NA REZULTATE BIOKEMIJSKIH I ENDOKRINOLOŠKIH PARAMETARA U 24-SATNOJ MOKRAĆI

Marko Bađun

SAŽETAK

Analiza mokraće ima važnu ulogu kod dijagnoze i probira na bolesti te praćenju tijeka bolesti i uspješnosti terapije. Određeni endokrinološki analiti zahtijevaju dodatak kiseline kao konzervansa u spremnik za sakupljanje mokraće kako bi im stabilnost ostala očuvana do analize, dok se za određivanje biokemijskih parametara ne mora sakupljati zakiseljeni uzorak. Kako se uzorak 24-satne mokraće najčešće sakuplja tijekom vikenda, u ovom istraživanju ispitivan je utjecaj dodatka HCl na stabilnost proteina, albumina, kreatinina, ureje, urata, kalcija, fosfata, magnezija, kalija, natrija, klorida, kortizola, VMA i 5-HIAA u mokraći tijekom 24 i 48 sati kako bi se utvrdilo je li moguće u jednom zakiseljenom uzorku određivati navedene analite čime bi se izbjeglo sakupljanje dva uzorka 24-satne mokraće (s i bez konzervansa).

Rezultati istraživanja pokazali su da su parametri kreatinin, ureja, urat, kalcij, fosfati, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA stabilni u zakiseljenom uzorku tijekom 24 i 48 sati. Kod određivanja koncentracije proteina i albumina primijećeno je smanjenje koncentracije tijekom 24 i 48 sati, dok je kod određivanja kortizola i klorida uočeno lažno povišenje koncentracije.

Iz dobivenih rezultata zaključujemo da ukoliko se uz katekolamine i metanefrine u mokraći traže pretrage kreatinin, ureja, urat, kalcij, fosfati, magnezij, kalij, natrij, 5-HIAA i VMA, navedene pretrage mogu se provesti iz jednog zakiseljenog uzorka 24-satne mokraće čime se smanjuje broj uzoraka koji dolaze u laboratorij na analizu što olakšava pacijentima sakupljanje uzorka, a u laboratoriju se smanjuje mogućnost pojave pogrešaka.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 13 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mokraća, stabilnost, HCl, konzervans

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*;
Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj, *naslovna docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Nora Nikolac Gabaj, *naslovna docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Roberta Petlevski, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: srpanj, 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYSIS OF THE EFFECTS OF PRESERVATIVE (HCl) ADDITION ON BIOCHEMICAL AND ENDOCRINOLOGICAL PARAMETERS IN 24-HOUR URINE SAMPLES

Marko Bađun

SUMMARY

Urine analysis plays an important role in the diagnosis and screening of diseases, as well as in monitoring the course of diseases and the effectiveness of therapy. Certain endocrinological analytes require the addition of acid as a preservative in the urine collection container to maintain their stability until analysis, while the collection of an acidified sample is not necessary for the determination of biochemical parameters. Since the 24-hour urine sample is often collected over the weekend, this study examined the effect of adding HCl on the stability of proteins, albumin, creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, chloride, cortisol, VMA, and 5-HIAA in urine over 24 and 48 hours to determine whether it is possible to measure these analytes in a single acidified sample, thus avoiding the collection of two 24-hour urine samples (with and without preservatives).

The results of the study showed that creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, 5-HIAA, and VMA are stable in acidified samples over 24 and 48 hours. However, a decrease in the concentration of proteins and albumin was observed over 24 and 48 hours, while a false increase in the concentration of cortisol and chloride was noted.

From the obtained results, we conclude that if tests for creatinine, urea, urate, calcium, phosphate, magnesium, potassium, sodium, 5-HIAA, and VMA are required along with catecholamines and metanephrines in urine, these tests can be performed from a single acidified 24-hour urine sample. This reduces the number of samples submitted to the laboratory for analysis, making sample collection easier for patients and reducing the likelihood of errors in the laboratory.

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

Thesis includes: 39 pages, 10 figures, 4 tables and 13 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Urine, stability, HCl, preservative

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

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nora Nikolac Gabaj, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Roberta Petlevski, Ph. D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2024.