Umjetni urin u laboratoriju

Toma, Doris

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:752474

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Doris Toma

Umjetni urin u laboratoriju

(Artificial urine in laboratory)

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Berislav Marković

Neposredni voditelj: dr. sc. Anamarija Stanković, poslijedoktorant

Osijek, 2018.

SAŽETAK

Urin je tekući nusprodukt koji se izlučuje iz bubrega procesom koji se naziva uriniranje, odnosno mokrenje. Nastaje procesom filtracije iz viška vode i otpadnih metaboličkih produkata te je glavna izlučevina mokraćnog sustava. Regulacijom uklanjanja otpada putem urina, osmolalnosti plazme i volumena krvi, tijelo koristeći samo jedan proces obavlja mnoge funkcije.

Sustav za stvaranje, pohranu i prijenos urina se naziva mokraćni sustav kojeg čine različiti organi, mišići i živci koji djeluju kao cjelina. Dijelovi mokraćnog sustava su: dva bubrega, dva mokraćovoda, mjehur i mokraćna cijev. Bubrezi su organi koji imaju oblik graha i veličine su stisnute šake te se u njima stvara urin. Svaki bubreg je preko mokraćovoda, cijevi koja crpi urin iz bubrega, povezan s mjehurom gdje se urin doveden mokraćovodom skladišti prije nego se ukloni iz organizma. Kada se u mjehuru nakupi dovoljna količina urina, određeni živci šalju signal mozgu da je vrijeme za uriniranje pri čemu se mjehur prazni preko mokraćne cijevi koja je smještena na dnu mjehura.

S obzirom da je u normalnim uvjetima urin sterilan, odnosno ne sadrži bakterije, koristi se u dijagnostičke svrhe kako bi se isključili ili otkrili poremećaji rada bubrega i mokraćnog trakta. Upravo se preko različitih fizikalnih i kemijskih komponenata daje uvid u metaboličke procese koji se odvijaju u organizmu te na temelju toga uspostavlja određena dijagnoza. To se postiže analizom urina koja uključuje provjeru koncentracije, sadržaja i izgleda urina, odnosno različitih fizikalnih i kemijskih svojstava.

Ključne riječi: umjetni urin, kalcijev oksalat, COM, COD, urino-analiza

ABSTRACT

Urine is a liquid byproduct which is excreted from kidneys by a process called urination. It is formed by filtration of excess water and waste metabolic products and represents the main secretion of the urinary tract. By waste disposal regulation through urine, plasma osmolality and blood volume, body performs many functions using only one process.

Urinary system is the system that produces, stores and eliminates urine and consists of different organs, muscles and nerves that make one complex. Urinary system consists of two kidneys, two ureters, bladder and urethra. The kidneys are bean-shaped organs each about the size of a fist where urine is formed. Each kidney is connected to a bladder by ureter, tube that draws urine from kidneys, where urine is stored before it is disposed from organism. When the bladder is filled with enough amounts of urine, the nerves are sending a signal to the brain for urination while bladder empties through urethra which is located at the bottom of the bladder.

Under normal conditions, urine is sterile and does not contain any bacteria so it is used in diagnostic purposes to exclude or reveal kidney and urinary tract disorders. It gives insight into metabolic processes through different physical and chemical components that take place in organism and based on that, diagnosis is being set up. That is achieved with urinanalysis which includes analysis of urine concentration, content and appereance, also analysis of different physical and chemical properties.

Keywords: artifical urine, calcium oxalate, COM, COD, urinanalysis

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. STVARANJE URINA U VIŠIH PRIMATA.....1

2.1 Mokraćni sustav.....1

2.1.1 Bubrezi.....1

2.1.2 Mokraćovodi, mjehur i mokraćna cijev.....2

2.2 Glomerularna filtracija.....3

2.3 Tubularna reapsorpcija.....4

2.4 Tubularna sekrecija.....5

2.5 Sastav urina.....6

2.6 Svojstva urina.....8

3.ANALIZA PRAVOG URINA U LABORATORIJU.....9

3.1 Metode analize urina u laboratoriju.....9

3.1.1 Vizualna provjera.....10

3.1.2 Analiza testnom trakom.....10

3.1.3 Mikroskopska analiza.....11

3.2 Specifični testovi urina.....11

3.2.1 Oralni glukoza tolerans test.....11

3.2.2 Ispitivanje specifične težine urina.....12

3.2.3 24-satni urin.....12

3.2.4 Urinokultura.....12

3.2.5 Kontrola pH urina.....13

3.2.6 Analiza mokraćne kiseline u urinu.....13

3.2.7 Klirens kreatinina.....14

3.2.8 Test na drogu.....14

4. URIN U LABORATORIJU.....15

4.1 Priprava umjetnog urina.....17

4.2 Svrha i primjena umjetnog urina.....18

4.2.1 Utjecaj pH urina na kristalizaciju i adheziju kalcijeva oksalata (CaOx).....18

4.2.1.1 Utjecaj pH na sposobnost vezanja COM-a i proteina apikalne membrane.....20

4.2.2 Precipitacija kalcijeva oksalata dihidrata (COD) u umjetnom urinu.....23

5. ZAKLJUČAK.....25

6. LITERATURA.....26

1. UVOD

Bubrežni kamenci su agregati mikrokristala koji sadrže mineral kalcijev oksalat monohidrat te su uobičajen klinički problem koji uzrokuje otkazivanje bubrega. Mehanizam nastajanja bubrežnih kamenaca je još uvijek nedovoljno istražen pa se upravo zbog toga pripravlja umjetni urin u laboratoriju pomoću kojeg se provode različita istraživanja. Bubrežni kamenci mogu usvojiti različite morfologije te prolaskom urina kroz mokraćovod uzrokuju veliku bol i smanjenu funkciju bubrega.[1]

U cilju otkrivanja ispravne terapije za prevenciju nastajanja bubrežnih kamenaca provode se istraživanja na umjetnom urinu pripravljenom u laboratoriju kako bi se ispitali kritični koraci u nastajanju bubrežnih kamenaca, a to su: nukleacija, rast kristala, agregacija i vezanje za stanicu.[1] Ovisno o svrsi proučavanja, razlikuje se nekoliko formula umjetnog urina od kojih je samo jedna unutar fiziološkog raspona normalnog ljudskog urina i naziva se "AU-Siriraj". Uspoređivanjem svojstava i sastava te formule s preostalim formulama umjetnih urina uspostavilo sa da je to najbolja formula koja se može upotrebljavati za različita proučavanja.[2]

2. STVARANJE URINA U VIŠIH PRIMATA

2.1.Mokraćni sustav

Mokraćni sustav je sustav organa čija je glavna uloga eliminiranje tekućeg otpada iz tijela, regulacija pH krvi, volumena krvi i tlaka te razine elektrolita i metabolita. Filtriranjem vode, metaboličkog otpada i viška iona iz krvi, koji iz tijela izlaze u obliku urina, održava se homeostaza. Organi koji čine mokraćni sustav su: bubrezi, mokraćovodi, mjehur i mokraćna cijev.[3]

2.1.1. Bubrezi

Bubrezi su dva organa u obliku graha čija je primarna uloga održavanje homeostaze za optimalan metabolizam stanica i tkiva te ga to čini najkritičnijim i najkompleksnijim dijelom mokraćnog sustava. Opskrbljen je velikim količinama krvi koja potječe iz bubrežnih arterija, a izlazi iz bubrega kroz bubrežne vene.[3]

Glavna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega je nefron koji se sastoji od bubrežnog tjelešca i sekretnih kanalića. Nefron filtrira krv kako bi se iz nje uklonili urea, otpadni produkti i ioni. Bubrežno tjelešce je zapravo glomerul, odnosno kapilarna mreža obavijena Bowmanovom čahurom. Tijekom filtracije, krv preko ulazne arteriole dolazi u glomerul gdje se voda i dušični otpad nakupljaju u samoj unutrašnjosti glomerula i formiraju glomerularni filtrat, a nefiltrirajuće tvari izlaze putem izlazne arteriole. Glomerularni filtrat se nakuplja u Bowmanovom prostoru, prostoru između Bowmanove čahure i glomerula, preko glomerularne filtracijske membrane koja propušta tvari koje su dovoljno male da prođu kroz nju.[3]

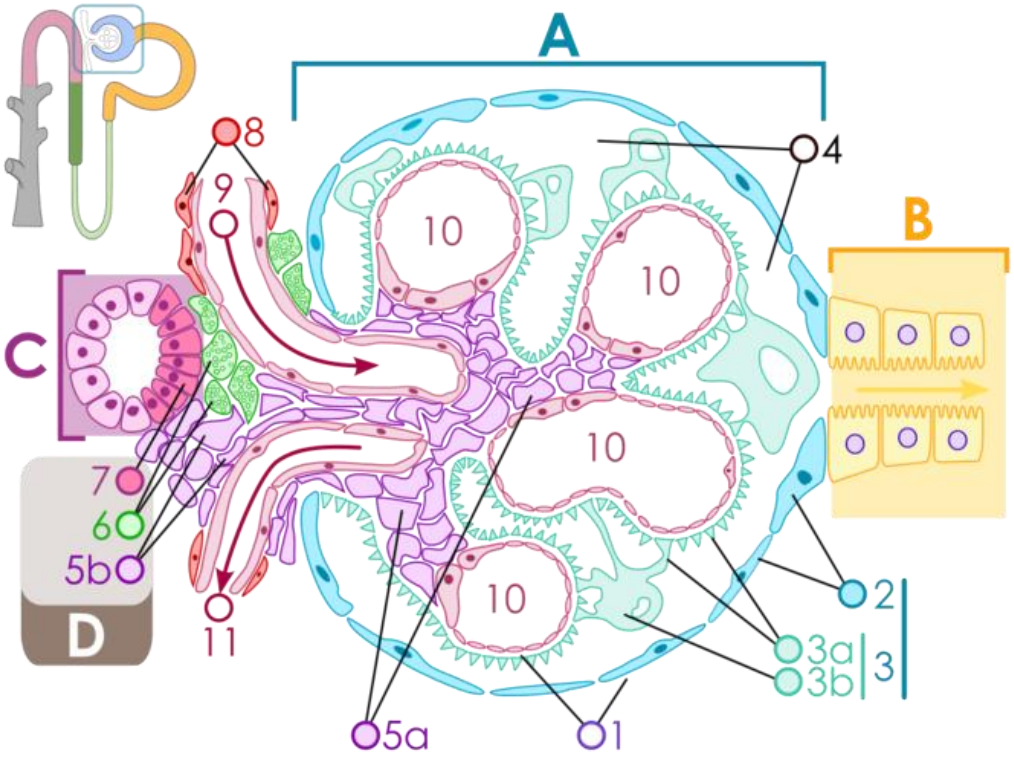
Nastali filtrat potom prolazi kroz 4 segmenta nefrona, a to su: proksimalno zavijeni kanalić u kojem se nutrijenti i tvari potrebne tijelu reapsorbiraju, Henleova petlja koja kontrolira koncentraciju urina, distalno zavijeni kanalić koji regulira kalij, natrij i pH te sabirne cjevčice koje reguliraju reapsorpciju vode i natrija.[4]

2.1.2. Mokraćovodi, mjehur i mokraćna cijev

Mokraćovodi su tanke mišićne cijevi koje odvlače urin iz svakog bubrega u mjehur te su jedni od esencijalnih organa koji kontroliraju transport urina. Procesom peristaltike se urin u malim mlazovima utiskuje u mjehur gdje mali nabori sluznice sprječavaju da se taj urin vrati nazad u mokraćovod. U mjehuru se urin skladišti sve dok se ne nakupi količina dovoljna za izlučivanje iz tijela. Mjehur je šupalj, mišićni i elastični organ te je smješten u dnu zdjelice. Punjenjem urinom nabubri i postane okruglog oblika pri čemu određeni živci daju signal mozgu da je vrijeme za uriniranje, a mozak istovremeno šalje signal mjehuru da se stisne i istisne urin, što dovodi do smanjenja mjehura. Glavnu ulogu u tom procesu ima sfinkter, cirkularni mišić čijim otvaranjem i opuštanjem urin kroz mokraćnu cijev izlazi iz mjehura, odnosno tijela. U suprotnom, kada mjehur nije dovoljno napunjen, sfinkter se snažno zatvori oko mokraćne cijevi i sprječava otjecanje urina iz mjehura.[3]

2.2. Glomerularna filtracija

Prvi proces tijekom kojeg se stvara urin naziva se glomerularna filtracija i podrazumijeva filtraciju fluida iz krvi preko glomerularnih kapilara, što je osnovna fiziološka uloga bubrega. Vrlo male molekule, kao što su: voda, glukoza, masne kiseline, aminokiseline, elektroliti, aminokiseline, vitamini i dušični otpad, prolaze kroz filtracijsku membranu u Bowmanovu čahuru, što se vidi iz **Slike 1.** te je njihova koncentracija u filtratu otprilike jednaka onoj u krvnoj plazmi. Uobičajeno 20 % cjelokupne krvi, koje pumpa srce, ulazi u bubrege gdje se filtrira, a ostalih 80 % prolazi ostatkom tijela i olakšava izmjenu plinova i prokrvljenost.[3]



Slika 1. Filtracija fluida iz glomerula (crveno) u Bowmanovu čahuru (plavo) te prijenos fluida iz Bowmanove čahure u nefron (žuto).[3]

Ovaj proces filtracije naziva se ultrafiltracija gdje je sila hidrostatskog tlaka pokretačka sila koja pumpa filtrat iz kapilara u otvore nefrona. S obzirom da krv u glomerul ulazi preko ulazne, a u obliku filtrata izlazi preko izlazne arteriole stvara se hidrostatski tlak jer izlazna

arteriola ima manji promjer od ulazne. Nastali hidrostatski tlak potom tjera molekule kroz filtracijsku membranu, a istovremeno mu se odupire (suprotstavlja) osmotski tlak krvi kojeg stvaraju proteini iz plazme.[3]

Upravo ovi faktori utječu na stopu glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR), odnosno mjere koja opisuje ukupnu količinu filtrata nastalog u bubrežnim tjelešcima. Svaka promjena u tlaku utječe na GFR jer je izravno proporcionalan gradijentu tlaka. Kod odraslih osoba GFR iznosi 125 mL/min, odnosno svaki dan u bubrezima nastaje 180 litara filtrata te se smatra najboljim pokazateljem bubrežne funkcije za potrebe klasifikacije, dijagnosticiranja i odgovarajućeg liječenja kronične bubrežne bolesti.[5]

2.3.Tubularna reapsorpcija

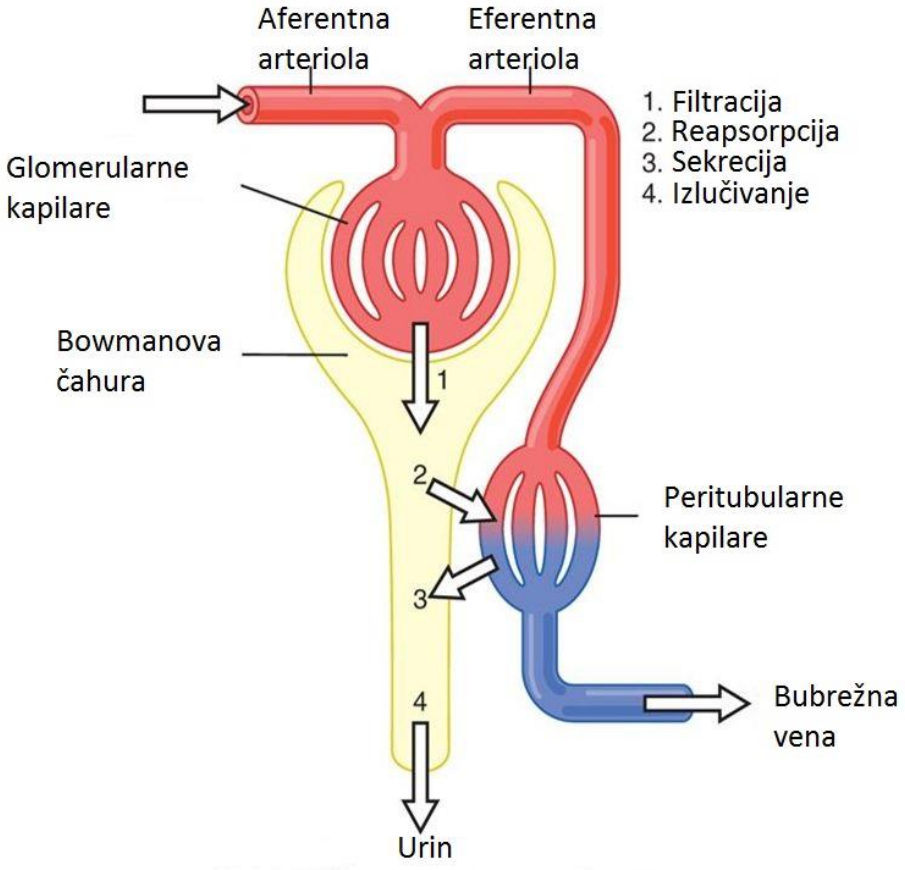
Proces tijekom kojeg se otopljene tvari i voda reapsorbiraju preko peritubularnih kapilara u krvožilni sustav naziva se tubularna reapsorpcija te se te tvari ne izlučuju kao urin. Njime se održava homeostaza krvnog volumena, osmolalnosti plazme, krvnog tlaka i pH krvi.

Reapsorpcija se odvija trima različitim načinima, a to su: aktivni transport, pasivna difuzija i kotransport. Tvari kao što su: glukoza, aminokiseline i vitamini se reapsorbiraju aktivnim transportom preko plazmatske membrane pomoću specifičnih proteinskih nosača kojima je potrebna energija ATP-a, zbog čega se ti nosači nazivaju ATP-azne crpke. Za razliku od aktivnog transporta, pasivna difuzija podrazumijeva prolaz kroz plazmatsku membranu pomoću koncentracijskog gradijenta, a kotransport, proces koji je važan za reapsorpciju vode, uključuje aktivni transport molekula u nefron koje prati voda te se na taj način reapsorbira.[3] Upravo je reapsorpcija vode značajna funkcija bubrega, jer se reapsorbira onoliko vode koliko je tijelu potrebno.

Samo 60 – 70 % filtrata dospijeva do Henleove petlje gdje se voda, natrij i klor reapsorbiraju, što znači da u distalnu zavijenu cjevčicu dospijeva 15 – 20 % početnog filtrata. Filtrat koji ulazi u sabirne cjevčice je vrlo razrijeđen s obzirom da se u distalno zavijenoj cjevčici reapsorbira većina filtrata.[5]

2.4. Tubularna sekrecija

Obrnuti proces od tubularne reapsorpcije koji uključuje izlučivanje kemikalija iz peritubularnih kapilara u tubularni fluid naziva se tubularna sekrecija. Prouzrokovana je aktivnim transportom i pasivnom difuzijom te omogućuje uklanjanje otpada i održavanje kiselo-bazne ravnoteže. Lučenjem uree, mokraćne kiseline, kreatinina i amonijaka krv se pročišćava, a krajnji produkt je urin koji se potom izlučuje iz organizma. Neki lijekovi se ne mogu u potpunosti filtrirati iz krvi jer se kratko zadržavaju u glomerulu pa se pročišćavaju lučenjem iz peritubularnih kapilara u zavijenim cjevčicama. Tubularna sekrecija vodikovog i amonijevog iona je važna za održavanje normalnog pH krvi koji iznosi 7,35 ili 7,45, dok pH urina iznosi 6,0.[3]



Slika 2. Mehanizam formiranja i izlučivanja urina nastalog u bubrezima.[3]

2.5. Sastav urina

Ljudski urin se sastoji većinom od vode, dušičnih molekula kao što je urea te isto tako kreatinina i drugih otpadnih metaboličkih produkata. Uz ove komponente mogu se pojaviti i neke druge ukoliko dođe do infekcije glomerula, što mijenja sposobnost filtracije i reapsorpcije različitih komponenata krvne plazme u nefronu. Ljudski urin se sastoji od različitih spojeva koji se razlikuju po zastupljenosti u urinu, što se najbolje može vidjeti iz **Tablice 1.**

Komponenta koja je najzastupljenija u urinu je voda i čini 95 % urina dok se vrijednosti od uree prema anorganskom sumporu smanjuju. S obzirom da se proteini i glukoza uobičajeno ne nalaze u urinu, njihovo prisustvo ukazuje na zdravstvene probleme. Prisutne su i manje količine drugih iona i spojeva uključujući: fosfor, glukuronsku kiselinu, amonijak, hipurinsku kiselinu i mnoge druge. Ukupna količina krutina koja je prisutna u urinu iznosi oko 59 g po osobi.[6]

Urea, krajnji produkt katabolizma proteina, je netoksičan oblik amonijaka te je njezino izlučivanje direktno proporcionalno unosu proteina. Ukoliko dođe do dijabetesa ili temperature, dolazi do povećanog izlučivanja uree, zbog povećanog katabolizma proteina.[7] S druge strane, amonijak koji je vrlo toksičan nastaje u bubrezima iz glutamina ili aminokiselina prilikom acidoze. Uz ureu i amonijak, važnija komponenta je i mokraćna kiselina koja je krajnji produkt oksidacije purina u tijelu te je djelomično topljiva u vodi. Čista mokraćna kiselina je bezbojna, a specifičnost analize mokraćne kiseline je tretiranje enzimom urikaza koji ju razgrađuje do alantoina.

Tablica 1. Sastav ljudskog urina.[8]

	FORMULA	TEŽINA	KOLIČINA mg/L
ANORGANSKE SOLI			14,157
natrijev klorid	NaCl	58.4	8,001
kalijev klorid	KCl	74.6	1,641
kalijev sulfat	K_2SO_4	174.3	2,632
magnezijev sulfat	$MgSO_4$	120.4	783
magnezijev karbonat	$MgCO_3$	84.3	143
kalijev hidrogenkarbonat	$KHCO_3$	100.1	661
kalijev fosfat	K_3PO_4	212.3	234
kalcijev fosfat	$Ca_3(PO_4)_2$	310.2	62
UREA	H_2NCONH_2	60.1	13,400
ORGANSKI SPOJEVI			5,369
kreatinin	$C_4H_7N_3O$	113.1	1,504
uropepsin	$HO{\cdot}C_6H_4{\cdot}C_2H_3(NH_2){\cdot}CO_2H$	181.2	381
kreatin	$HN{:}C(NH_2)N(CH_3){\cdot}CH_2{\cdot}CO_2H{\cdot}H_2O$	149.2	373
glicin	$NH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CO_2H$	75.1	315
fenol	$C_6H_5{\cdot}OH$	94.1	292
histidin	$C_3H_3N_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH{\cdot}(NH_2){\cdot}CO_2H$	155.2	233
androsteron	$C_{19}H_{30}O_2$	290.5	174
1-metilhistidin	$C_3H_3N_2CH_2CH(NH{\cdot}CH_3){\cdot}COOH$	169.2	173
imidazol	$C_3H_4N_2$	68.1	143
glukoza	$C_6H_7O_6(COCH_3)_5$	390.4	156
taurin	$NH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}SO_3H$	125.2	138
cistin	$[HO_2C{\cdot}CH(NH_2){\cdot}CH_2S{\cdot}]_2$	240.3	96
citrulin	$NH_2CONH(CH_2)_3{\cdot}CH{\cdot}(NH_2){\cdot}CO_2H$	175.2	88
aminoizobutirična kiselina	$H_2N{\cdot}CH_2{>}CH{\cdot}COOH$ (CH_3)	103.1	84
treonin	$C_4H_9O_3N$	119.1	83
lizin	$(NH_2)_2C_5H_9{\cdot}CO_2H$	146.2	73
m-hidroksihipurična kiselina	$C_4H_4COHC(CONH{\cdot}CH_2COOH)$	195.2	70
inozitol	$C_6H_{12}O_6$	180.2	70
urobilin	$C_{33}H_{40}O_6N_4$	588.7	63
tirozin	$HO{\cdot}C_6H_4{\cdot}C_2H_3(NH_2){\cdot}CO_2H$	181.2	54
asparagin	$HO_2C{\cdot}CH(NH_2){\cdot}CH_2{\cdot}CONH_2$	132.1	53
organski spojevi u količini manjoj od 50mg/L			606
ORGANSKE AMONIJEVE SOLI			4,131
AMONIJEV:			
hipurat	$NH_4C_6H_5CO{\cdot}NHCH_2{\cdot}CO_2$	196.2	1,250
citrat	$(NH_4)_2HC_6H_5O_7$	226.2	756
glukuronat	$NH_4C_6H_9O_7$	211.1	663
urat	$NH_4C_5H_3O_3N_4$	185.1	518
laktat	$(NH_4)_2C_3H_5O_3$	127.1	394
L-glutamat	$NH_4HO_2C{\cdot}CHNH_2{\cdot}(CH_2)_2{\cdot}CO_2$	164.1	246
aspartat	$NH_4C_4H_6O_4N$	150.1	135
format	NH_4HCO_2	63.1	88
piruvat	$NH_4CH_3{\cdot}CO{\cdot}CO_2$	88.1	44
oksalat	$(NH_4)_2C_2O_4$	124.0	37
UKUPNO			37,057

Pri uvjetima koji uzrokuju abnormalne tipove urina važniji su: proteinurija, oligurija, poliurija, dizurija, hematurija i glikozurija. Prisustvo albumina i globulina u većim koncentracijama u urinu naziva se proteinurija ili albuminurija te može biti fiziološka ili patološka. Razlikuju se po tome što se fiziološka javlja nakon intenzivnog vježbanja ili obroka bogatog proteinima, a patološka kod upale glomerula koja može rezultirati trovanjem bubrežnih kanalića teškim metalima. Prilikom krvarenja bubrega ili urinarnog trakta dolazi do pojave hemoglobina u urinu kao posljedice hematurije. [7]

Normalna količina glukoze koja se izluči urinom dnevno iznosi 16 – 300 mg, a svaki veći iznos ukazuje na glikozuriju koja može biti prolazna, a isto tako i nasljedni poremećaj.[7] Prolazna glikozurija javlja se nakon emocionalnog stresa, ali se ponekad kod nekih osoba razvije šećerna bolest te je zbog toga potrebno obaviti Benediktov test koji je osnova kvalitativnih i kvantitativnih kliničkih testova na ugljikohidrate.[34] Benediktova reakcija se temelji na reakciji Cu^{2+} iona iz Benediktovoga reagensa s reducirajućim šećerima pri čemu dolazi do redukcija bakar(II) iona u bakar(I) iona te u konačnici nastaje Cu_2O koji se taloži i ciglasto-crvene je boje. Ukoliko dolazi do promjene boje iz plave u crvenu radi se o pozitivnom testu što ukazuje na prisutnost šećera u urinu. Osim glukoze u urinu se mogu pojaviti i drugi šećeri kao što su: fruktoza, galaktoza, laktoza i neke pentoze.[35]

Urinom se normalno izlučuje manje od 1 mg ketonskih tijela dnevno, a u većim količinama u slučaju gladovanja, dijabetesa i nekih tipova alkaloza.[7] Izlučivanjem soli žučnih kiselina može doći i do izlučivanja bilirubina u slučaju žutice koji nastaje razgradnjom hema, a da bi se izlučio mora se prevesti u tvar topivu u vodi u pet faza. Bilirubinuriju uzrokuje samo konjugirana hiperbilirubinemija, odnosno povećana koncentracija konjugiranog bilirubina u u serumu.[9]

Normalno se u urinu mogu pronaći naslage oksalata, fosfata i urata od čega se kod lužnatog urina nalaze fosfati te isto tako i kalcijev oksalat. Za razliku od lužnatog, u kiselom urinu nalaze se kalcijev oksalat i urati. Od fosfata najčešće je prisutan magnezijev fosfat, a nešto manje kalcijev hidrogenfosfat te se oni pojavljuju zbog promjene pH urina pri njegovom prolasku.[7]

2.6. Svojstva urina

Glavna fizikalna svojstva urina su: boja, pH, miris, zamućenost i gustoća. Većinom se ta svojstva mogu vidjeti golom okom, ali za neke je potrebno provesti laboratorijsko ispitivanje. Golim okom se može vidjeti boja urina koja je uobičajeno svijetložute ili jantarne boje te ovisi o prehrani i koncentraciji urina. Ukoliko dođe do dehidratacije, urin poprima tamniju boju, što znači da unosom veće količine vode u organizam dolazi do smanjenja koncentracije urina, a samim time boja urina postaje svjetlija.[7] Crvenkasta boja urina predstavlja prisutstvo crvenih krvnih stanica u urinu, što može biti znak oštećenja ili bolesti bubrega, dok kod bolesti jetre može biti smeđe, zelene ili tamnožute boje koje potječu od žučnih pigmenata.[3]

Miris urina ovisi o hrani i lijekovima koji se unose u organizam te je zajedno s bojom indikator zdravstvenog stanja. Uobičajeno ima slabi miris, a stajanjem poprima jači miris amonijaka. Za dijabetičare je specifičan slatkast miris urina kao posljedica prisustva ketona ili glukoze.

Normalni pH urina je 6,0, a može varirati između vrijednosti 4,6 - 8,0 ovisno o prehrani.[7] Pri većim unosima proteina, pH urina se smanjuje, odnosno povećava se kiselost urina jer katabolizmom proteina nastaje višak fosfata i sulfata. Stajanjem urin postaje lužnatiji jer dolazi do pretvorbe uree u amonijak i gubitka CO_2, ali isto tako i unosom dovoljne količine $NaHCO_3$.

Gustoća ili specifična težina urina iznosi između 1,003 i 1,030 te se mijenja ovisno o koncentraciji otopljenih tvari u urinu, odnosno unosom vode i hrane, a ovisi i o aktivnosti pojedinca. Povećava se izlučivanjem tvari kao što su albumin ili glukoza, dehidracijom i adrenalnom insuficijencijom, a smanjuje prekomjernim unosom tečnosti i kod određenih bolesti bubrega.[7]

Svježi urin je uobičajeno bistar ili vrlo malo zamućen, a povećanje zamućenosti je posljedica prisustva suspendiranih tvari. Uzrok njihovog prisustva određuje se analizom sedimenta urina koja može odrediti radi li se o infekciji urinarnog trakta, opstrukciji ili višku stanica u urinu.

3. ANALIZA PRAVOG URINA U LABORATORIJU

3.1. Metode analize urina u laboratoriju

Testovi koji se provode za otkrivanje urinarnih infekcija ili bolesti bubrega zajednički se nazivaju urino-analiza. Obuhvaćaju provjeru izgleda, koncentracije i sadržaja urina te je glavna svrha, osim otkrivanja bolesti, provjera cjelokupnog zdravlja te samo nadgledanje zdravstvenog stanja. Analiza urina sastoji se od: vizualne provjere, analize testnom trakom te mikroskopskog testa, a uzorak urina koji se ispituje skuplja se u rano jutro kada je najveća koncentracija urina. Mnoge bolesti utječu na način kojim tijelo izbacuje toksine i otpad, a svaki problem s plućima, bubrezima, mjehurom, urinarnim traktom i kožom utječu na izgled, koncentraciju i sadržaj urina.[13]

3.1.1. Vizualna provjera

U laboratoriju se provjerava sam izgled urina koji je inače bistar te svaka zamućenost ili pojava smeđe ili crvene boje može biti indikator za nekakvu abnormalnost koja može biti infekcija ili u najboljem slučaju samo posljedica prehrane koja je dovela do promjene boje urina (**Slika 3.**). Ukoliko se vizualnom provjerom pretpostavi prisutnost abnormalnosti, urin se dalje provjerava analizom testnom trakom.[13]



Slika 3. Vizualna provjera urina.[16]

3.1.2. Analiza testnom trakom

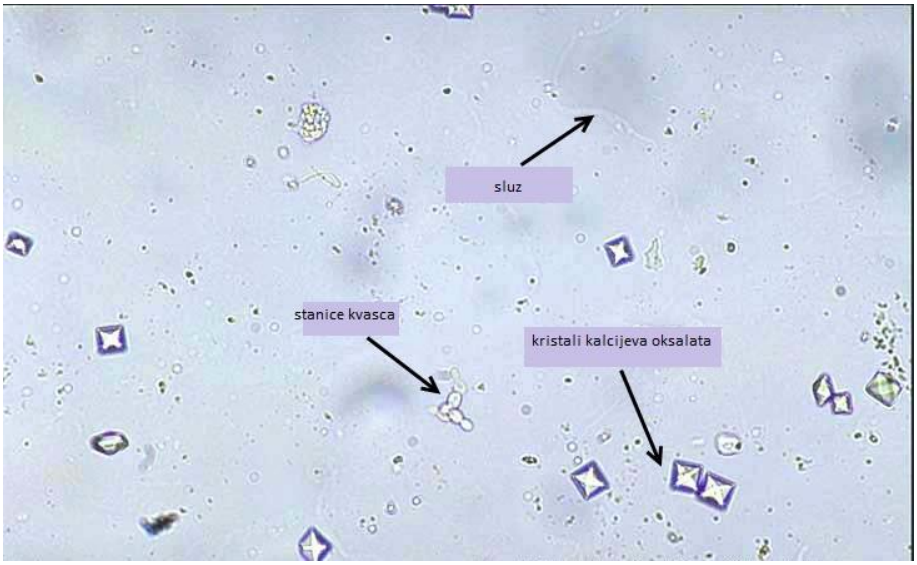
Provodi se na način da se testna traka stavi u urin te se zabilježavaju svake abnormalnosti na način da trakice promijene boju ukoliko su tvari prisutne u većim količinama od normalnog. Analizom testnom trakom provjeravaju se: koncentracija, krv, bilirubin, pH, proteini, šećeri i ketoni.[13]



Slika 4. Analiza testnom trakom.[17]

3.1.3. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom analizom dodatno se provjerava prisutnost leukocita, eritrocita, bakterija i kristala. Leukociti i bakterije ukazuju na infekciju, eritrociti u urinu su znak bolesti bubrega, a kristali mogu biti znak bubrežnog kamenca.[14] Pod mikroskopsku analizu spada i test kojim se provjerava količina epitelnih stanica u urinu. Ukoliko prijeđe normalnu razinu, indicira infekciju i bolesti bubrega. Epitelne stanice su pločaste stanice bubrežnih kanalića koje oblažu uretru te su dijagnostički važne samo stanice tubula koje se teško razlikuju od tranzicijskih ako nisu uklopljene u cilindre. Isto tako u urinu je prisutna i određena količina sluzi koja u većim količinama predstavlja infekciju urinarnog trakta, bolesti bubrega, a u najgorem slučaju rak mjehura.[15]



Slika 5. Mikroskopski prikaz uzorka urina.[18]

3.2. Specifični testovi urina

3.2.1. Oralni glukoza tolerans test

Oralni glukoza tolerans test (OGTT) je test koji služi za otkrivanje poremećaja metabolizma šećera i pokazuje sposobnost preuzimanja glukoze u organizmu, a test traje dva sata. U određenim vremenskim razmacima se mjeri razina glukoze u vremenu od 0 do 120 min dok se kod trudnica mjeri u vremenu od 0, 30 i 120 min. Prije početka testa pacijent popije točno određenu količinu glukoze otopljene u vodi te se ne smije kretati s

obzirom da svako kretanje uzrokuje potrošnju glukoze, a uz to se ne smije ni mokriti unutar dva sata.[19] Normalne količine glukoze u urinu iznose od 0 do 0,8 mmol/L, a svako povećanje ukazuje na zdravstveni problem gdje je najčešći uzrok dijabetes.[14] Povećana razina glukoze u urinu može biti posljedica bubrežne glikozurije, stanja kod kojeg se glukoza izlučuje u urin unatoč normalnoj razini glukoze u krvi, zbog lošeg rada bubrežnih kanalića. Glikozurija nema ozbiljnih učinaka, ali se ponekad kod osoba s glikozurijom razvije šećerna bolest.

3.2.2. Ispitivanje specifične težine urina

Uspoređivanjem gustoće urina s gustoćom vode određuje se koliko dobro bubrezi razrjeđuju urin. Ukoliko je urin koncentriraniji, bubrezi ne funkcioniraju dobro ili se radi o dehidriranosti, a nedovoljna koncentracija urina ukazuje na dijabetes insipidus koji uzrokuje žeđ i izlučivanje velikih količina razrijeđenog urina.[14]

3.2.3. 24-satni urin

Test kojim se provjerava razina proteina u urinu se sastoji od nekoliko uzoraka urina sakupljenih u periodu od 24 sata. Najčešće se radi kada se pojave simptomi glomerulonefritisa ili nefrotičkog sindroma. Povećana razina proteina u urinu ukazuje na oštećenje ili bolest bubrega, ali isto tako može biti i posljedica stresa ili infekcije.[14] Biokemijski pregled urina obuhvaća pregled: glukoze, ketona, urobilinogena, nitrata i bilirubina. Kada se sumnja na oštećenje bubrega, radi se određivanje proteina u 24-satnom urinu. Ukupna količina proteina (normalno 150 - 200 mg) određuje se Biuret metodom, a pojedini tipovi proteina (albumin, globulin) elektroforezom.[20] Najčešća metoda za mjerenje glomerularne filtracije je klirens kreatinina, a mjeri se matematičkim izračunom vrijednosti: koncentracije kreatinina u 24-satnom urinu, volumena 24-satnog urina i koncentracije kreatinina u serumu.[20] Prvi jutarnji urin se baci, a nakon toga se sakuplja u čiste boce tijekom sljedeća 24 sata.

3.2.4. Urinokultura

Urinokultura je ispitivanje urina s namjerom otkrivanja bakterijskog uzročnika infekcije urinarnog trakta. Simptomi urinarne infekcije su: učestalo mokrenje, bol i pečenje pri

mokrenju. Uzročnici infekcija su bakterije koje žive u debelom crijevu koje pri određenim uvjetima naseljavaju kanalni sustav urinarnog trakta te se pojavljuju upala mokraćne cijevi, bubrega i mjehura. Veliki broj bakterija u ml urina je povezan s akutnim infekcijama mokraćnog sustava, dok manji broj bakterija predstavlja kontaminaciju periuretralnom mikrobiotom. Pretraga obuhvaća kultivaciju urina i izolaciju potencijalnog bakterijskog patogena, izrada testa osjetljivosti na antimikrobne lijekove te određivanje broja bakterija u u mililitru uzorka. Uzorak urina koji se ispituje mora biti koncentriran te se razlikuje ovisno na koji način se uzeo uzorak, a to su: urin-srednji mlaz, urin-kateter i urin-vrećica, a bez obzira o kojem uzorku je riječ pohranjuje se u hladnjak i dostavlja u laboratorij što prije.[21]

3.2.5. Kontrola pH urina

Analizom kiselosti ili bazičnosti urina dobiva se uvid u mogućnost stvaranja bubrežnih kamenaca, nakupine minerala u bubrezima koje uzrokuju bol i sprječavaju prolazak urina kroz bubrege i urinarni trakt. Stvaranju bubrežnih kamenaca pogoduje izrazito kiselo ili izrazito bazično okruženje te je potrebno promijeniti prehranu kako bi se spriječilo njihovo stvaranje. Osim toga, niži pH ukazuje i na acidozu i dehidraciju dok viši pH ukazuje na otkazivanje bubrega i respiratornu alkalozu.

3.2.6. Analiza mokraćne kiseline u urinu

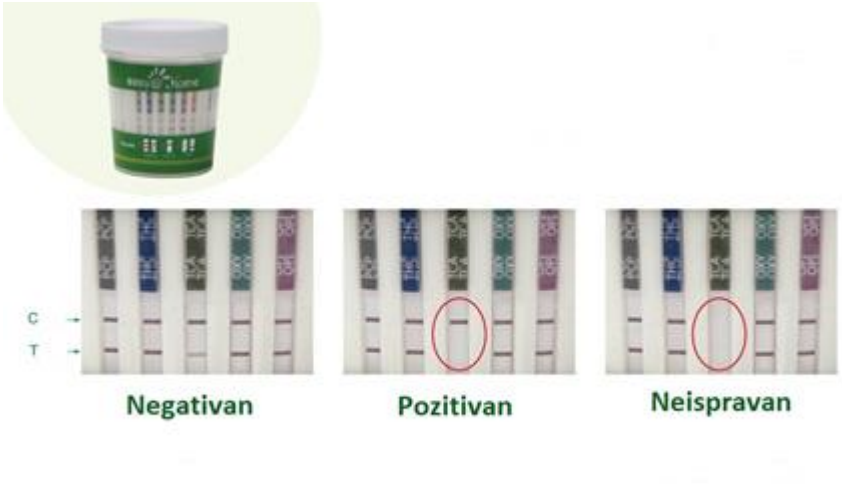
Mokraćna kiselina nastaje raspadanjem purina u organizmu koji ulaze u krvotok prirodnom razgradnjom stanica u tijelu. Nastala mokraćna kiselina disocira u krvi i uklanja se iz tijela uriniranjem te se testom određuje uzrok abnormalnih vrijednosti mokraćne kiseline u urinu pri čemu se uzorci urina skupljaju u periodu od 24 sata. Povećana količina mokraćne kiseline u urinu ukazuje na giht ili stvaranje bubrežnih kamenaca. Normalna količina mokraćne kiseline iznosi 250 - 750 mg/24h, a veće količine upućuju na bubrežne kamence, bolesti jetre i bubrega te u težim slučajevima leukemiju.[14]

3.2.7. Klirens kreatinina

Među otpadnim produktima koji se uklanjaju iz organizma uriniranjem spada i kreatinin, otpadni produkt koji nastaje metabolizmom mišića. Normalna razina kreatinina u urinu iznosi od 955 do 2936 mg/24h za muškarce, a za žene od 601 do 1689 mg/24h. Ukoliko je razina kreatinina izvan tih vrijednosti, moguća je prisutnost bubrežnih kamenaca, bolesti ili infekcije bubrega.[14] Uzorak urina se skuplja tijekom 24 sata te se za izračun klirensa kreatinina mjeri volumen skupljenog urina i izračunava površina tijela prema visini i težini pacijenta.[22]

3.2.8. Test na drogu

Ovim testom se analizira prisutnost droge u urinu kao što su: amfetamini, metamfetamini, kokain, marihuana, benzodiazepini i metadon. Isto tako provjerava se i na koji način imunološki sustav reagira na drogu te sposobnost organizma za stvaranje antitijela te se rezultati izražavaju u ng/ml. Imunološkim testom se otkriva kako imunološki sustav reagira na droge te isto tako i kolika je sposobnost stvaranja antitijela.[14] Uzorak urina se sakuplja u čašu, a ukoliko je imunološki test pozitivan, rezultati se potvrđuju metodom vezanog sustava, a to je: plinska kromatografija-masena spektroskopija.[23] Ukoliko se pojave dvije linije u C i T području test je negativan, odnosno koncentracije u uzorku urina su ispod granične vrijednosti. Ako je test pozitivan pojavi se jedna linija u C području, a u slučaju kada se ne pojavi linija ni u jednom području riječ je o neispravnom testu koji se mora ponoviti, što se najbolje vidi na **Slici 6**.[24]



Slika 6. Prikaz rezultata testa na drogu.[27]

4. URIN U LABORATORIJU

S obzirom na to da je urin vrlo promjenjiv fluid te se razlikuje od pojedinca do pojedinca, za proučavanje nastajanja urinarnih patogena proizvodi se umjetni urin u laboratoriju. S obzirom da je vrlo teško provoditi eksperimente na pravom urinu, istraživači sve više sami sintetiziraju urin u laboratoriju koji će biti što sličniji pravom urinu. Iako je ljudski urin izvrstan medij za bakterijske kulture, od čega najviše koliformne bakterije, stvara se 1 ml/min te su za eksperimente potrebne velike količine urina, što nije praktično.[10] Proučavanje se provodi za bolje shvaćanje fiziologije bubrega, patogenih mehanizama bubrega te isto tako bolesti urinarnog trakta. Iako je teško u potpunosti replicirati uzorak fluida ljudskog organizma izvodljivo je napraviti uzorak koji će poslužiti za ispitivanje određenih parametara. Upravo zato umjetni urin ima široku upotrebu za *in vitro* istraživanja jer simulira normalno fiziološko okruženje urinarnog trakta i bubrega. Pomoću nekoliko protokola su se pripravljali umjetni urini, ali nije bila otkrivena metoda za pripravu umjetnog urina koji će imati višenamjensku upotrebu.[2]

Individualne formule su dizajnirane za specifičnu upotrebu, a razlikuju se u sastavu i koncentraciji te mnoge imaju kemijske komponente izvan fizioloških raspona ljudskog urina pa je zbog toga postavljena nova AU (eng. *artifical urine*) formula nazvana "AU-Siriraj" koja se usporedila s prethodno postavljenim AU formulama, odnosno protokolima umjetnih urina, ultrafiltriranim urinom (UF) i slijepom probom.[2]

Usporedba se provodila na temelju mjerenja pH, osmolalnosti, gustoće i drugih kemijskih komponenata u odnosu na ljudski urin. U **Tablici 2**. su prikazana svojstva i sastav različitih AU formula, odnosno protokola umjetnih urina različitih autora. Za razliku od drugih, AU-Siriraj ima višenamjensku upotrebu te uključuje mnoge komponente čije su koncentracije unutar fizioloških raspona normalnog ljudskog urina.[2]

Tablica 2. Usporedba svojstava i sastava različitih formula umjetnih urina.[2]

Svojstva i sastav	AU-1 Brown	AU-2 Opalko	AU-3 Brooks i Keevil	AU-4 Grases i Llobera	AU-5 Mayrovitz i Sims	AU-6 Christmas	AU-7 Siriraj	Isaacson [28]	Doremus [29]	Miller [30]	Barker [31]	Rose [32]	Burns i Finlayson [33]
pH	6,5	5,9	6,5	6,9	7,8	6,0	6,2	5,4	5,7	-	6,5	5,4	6,5
Urea ($mmol/dm^3$)	-	-	170	-	416	-	200	291,4	500,0	-	500,0	291,4	-
Urična kiselina ($mmol/dm^3$)	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	3,0	-	-
Kreatinin ($mmol/dm^3$)	-	-	7	-	17,70	-	4,0	-	13,0	-	13,0	-	-
NaCl ($mmol/dm^3$)	150,50	105,50	90,0	224,50	154,0	105,50	54,0	213,9	170,0	158,3	170,0	213,9	105,50
KCl ($mmol/dm^3$)	63,70	63,70	-	162,50	-	63,70	30,0	92,6	25,0	111,5	52,0	92,6	63,70
NH_4Cl ($mmol/dm^3$)	27,60	-	25,00	8,69	48,0	36,30	15,0	65,1	20,0	59,5	-	65,1	27,60
$MgSO_4$ ($mmol/dm^3$)	38,50	3,85	2,00	5,90	-	3,85	2,0	6,7	2,0	8,1	2,0	6,7	3,85
Na_2SO_4 ($mmol/dm^3$)	-	16,95	10,00	34,20	21,10	16,95	9,00	14,9	16,5	23,4	16,5	14,9	16,95
NaH_2PO_4 ($mmol/dm^3$)	32,30	3,23	7,0	3,40	17,60	32,30	3,60	39,6	16,5	29,9	3,5	39,6	-
Na_2HPO_4 ($mmol/dm^3$)	-	-	7,00	10,50	-	-	0,40	1,8	-	4,1	13,0	1,8	32,30

4.1. Priprava umjetnog urina

S namjerom dobivanja umjetnog urina što sličnijem pravom urinu, istraživači su isprobavali različite fomule među kojima su bili: Burns i Finlayson, Isaacson, Barker, Doremus, Miller i Rose. Upravo su 1980. godine Burns i Finlayson objavili rad u kojem su predstavili program koji simulira ravnotežne reakcije i daje stvarne koncentracije pojedinih komponenti čime se dobio odgovarajući recept za umjetni urin.[26] Iz **Tablice 2.** vidljivo je da većina sadrži ureu, magnezijev sulfat, natrijev i/ili kalijev klorid, natrijev sulfat, natrijev oksalat i kalcijev klorid. Najveći pH imaju formule od Barkera te Burns i Finlaysona u iznosu pH = 6,5, a jedino Barkerova formula sadrži uričnu kiselinu.[31] Za razliku od svih formula navedenih u **Tablici 2.** jedino formula AU-Siriraj sadrži sve navedene komponente.

AU-Siriraj se pripravio na način da se u 200 ml deionizirane vode otopilo 2,427 g uree, 0,034 g mokraćne kiseline, 0,090 g kreatinina, 0,297 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0,634 g NaCl, 0,450 g KCl, 0,161 g NH_4Cl, 0,089 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,100 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,034 g $NaHCO_3$, 0,003 g NaC_2O_4, 0,258 g Na_2SO_4, 0,100 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ i 0,011 g NaH_2PO_4 (**Tablica 2.**). Kako bi se procijenila kompatibilnost AU formula za *in vitro* staničnu kulturu, provela su se morfološka ispitivanja sa svakom od AU formula i ultrafiltriranim urinom u vremenu od 1 do 16h. Kao slijepa proba koristio se fetalni goveđi serum (FBS), a pritom su MDCK stanice u kulturi s AU-Siriraj ili AU-3 (umjetni urin za bakterijsku kulturu) imale kompatibilan stupanj gustoće u usporedbi s onima koji su u kulturi s UF ili slijepom probom. S druge strane, MDCK stanice u kulturi s ostalih pet AU formula su imale smanjenu gustoću stanica.[2]

Pomoću hemacitometra se provela serijska analiza ukupnog broja stanica rezultat koje je da su UF, AU-3 i AU-Siriraj imali jednak broj stanica u odnosu na kontrolirane stanice od čega je AU-Siriraj pružao nešto veći broj stanica od AU-3. Što se tiče mrtvih stanica, MDCK stanice u kulturi s UF, AU-2, AU-3 i AU-Siriraj su imale kompatibilan broj s kontroliranim, dok su AU-1, AU-4 i AU-5 uzrokovale povećan boj umrlih stanica, a najviše nakon 16 sati gdje je taj broj umrlih stanica za AU-4 bio najveći.[2]

Analiziranjem citotoksičnih efekata svake od AU formule u 16-om satu protočnom citometrijom MDCK stanice u kulturi s AU-Siriraj su imale sličan stupanj rane apoptoze,

kasne apoptoze i/ili nekroze kao i UF ili slijepa proba. Za razliku od njih AU-3 i AU-2 su imali nešto povećan broj mrtvih stanica, a kod AU-1, AU-4, AU-5 i AU-6 se povećala rana apoptoza, kasna apopotoza i/ili nekroza.[2]

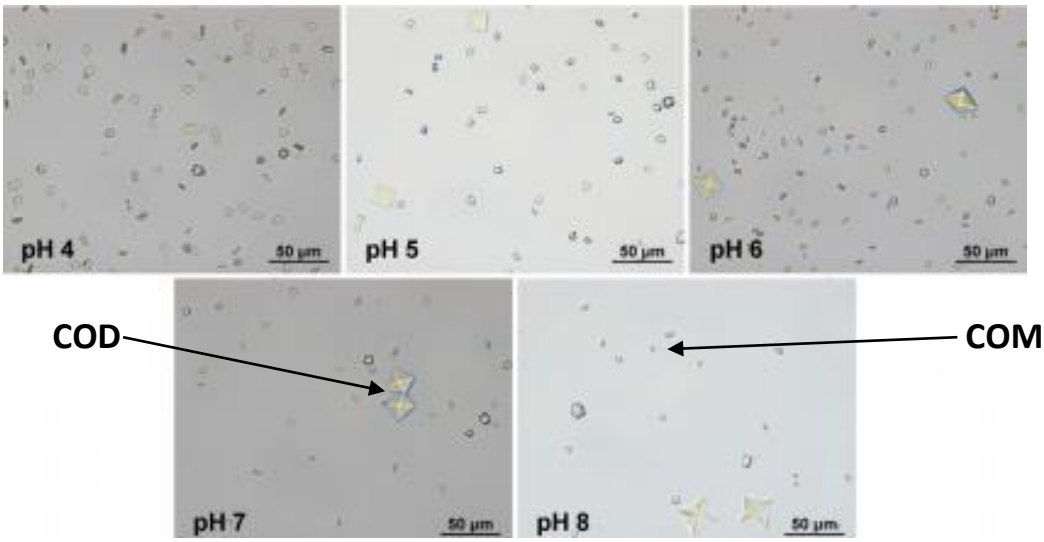
Komparativnom analizom svih parametara utvrdilo se da je AU-Siriraj sve parametre imao unutar fiziološkog raspona ljudskog urina dok kod ostalih formula je najmanje 6 parametara nedostajalo ili ih je bilo u suvišku. Krajnjim rezultatom vidljivo je da je najbolja AU formula, poslije AU-Siriraj, AU-3, a najcitotoksičnija je AU-4 formula koja se koristi za kristalizaciju $Ca_3(PO_4)_2$. Prisutne toksične tvari u AU formulama su: visoka koncentracija magnezija u AU-1, izrazito visoka koncentracija klora u AU-4, vrlo visoka koncentracija uree u AU-5 te vrlo visoka koncentracija anorganskog fosfata u AU-6. S obzirom da su komponente AU-Siriraj slične kao u ljudskom urinu, imao je sličan utjecaj na MDCK stanice kao UF i slijepa proba. Upravo zbog toga je AU-Siriraj trenutno najbolja AU formula za fiziološka proučavanja, a kao alternativna zamjena se koristi AU-3.[2]

4.2. Svrha i primjena umjetnog urina

4.2.1 Utjecaj pH urina na kristalizaciju i adheziju kalcijeva oksalata (CaOx)

Pomoću umjetnog urina može se pratiti utjecaj pH urina na kristalizaciju CaOx s obzirom na to da je pH jedan od glavnih čimbenika stvaranja bubrežnih kamenaca, odnosno stvaranja kristala CaOx koji se formiraju u distalnim bubrežnim kanalićima. Pri različitim pH vrijednostima postoje i različiti tipovi kristala CaOx, a eksperimentalno se može procijeniti utjecaj pH na kristalizaciju u umjetnom urinu.[11]

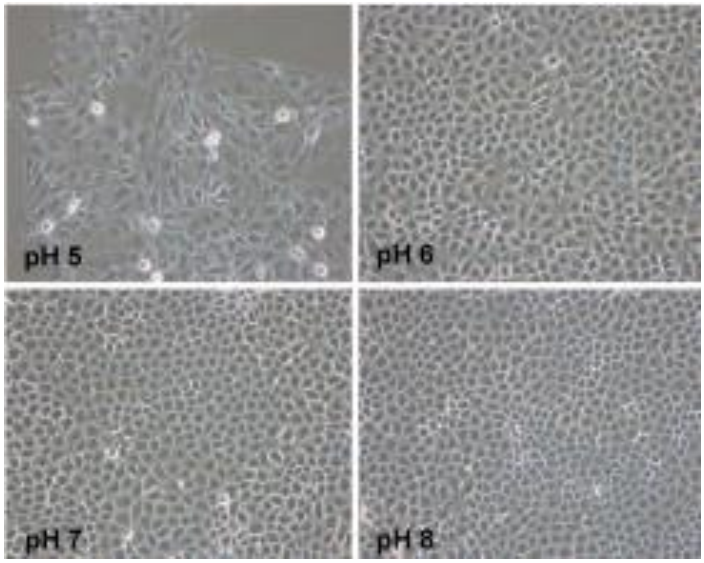
Morfološkim ispitivanjem utvrdilo se da pri najnižem, odnosno najkiselijem pH = 4,0, kristalizira kalcijev oksalat monohidrat (COM). Suprotno tome, kalcijev oksalat dihidrat (COD) najviše kristalizira pri najvišem pH = 8,0, a najmanje pri najnižem pH = 4,0.[11]



Slika 7. Utjecaj različitih pH vrijednosti (4,0 - 8,0) na kristalizaciju CaOx.[11]

Time je pokazano da su kvantitativni podaci veličine, mase i broja kristala dosljedni morfološkom izgledu te se sukladno tome utjecaj pH urina analizirao i kvantificirao FT-IR spektroskopijom. Rezultati semi kvantitativne analize pokazuju kombinaciju COM-a i COD-a pri svim uvjetima s najvećim postotkom COM-a pri pH = 4,0, a najvećim postotkom COD-a pri pH = 8,0. Pri valnoj duljini 3600-2800 cm^{-1} primjećuju se najveća odstupanja te se zbog toga najviše proučava upravo to područje valnih duljina.[11]

Za procjenu utjecaja pH na stanice bubrežnih kanalića su se koristile MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) stanice koje potječu od segmenta distalnog bubrežnog kanalića. Ispitivanjem morfologije MDCK stanica pri različitim pH vrijednostima (5,0 - 8,0) tijekom 8 sati utvrđeno je da stanice normalno izgledaju pri pH = 6,0 - 8,0, a pri pH = 5,0 nezdravo, što se može vidjeti iz **Slike 8**. Tijekom ispitivanja se zanemario pH = 4,0 jer su pri tom stanice bile suviše toksične te nisu mogle podnijeti tako niski pH. Proučavanjem proliferacije tijekom 8 sati dobiveni su rezultati koji pokazuju da se broj stanica znatno povećao nakon 6 i 8 sati pri pH = 6,0, 7,0 i 8,0 dok se pri pH = 5,0 nije uopće povećao, što ukazuje na defektivnu proliferaciju pri najnižem pH. Rezultati su pokazali i da se stanična smrt povećala pri pH = 5,0 počevši nakon četverosatne inkubacije pa sve do kraja ispitivanja.[11]



Slika 8. Morfologija stanica promatrana pod mikroskopom s faznim kontrastom nakon 8 sati s povećanjem od 200 puta.[11]

Glavnim uzročnikom stvaranja bubrežnih kamenaca smatrala se adhezija kristala na epitelne stanice bubrežnog kanalića te je ispitivanjem pokazano da je pH znatno mijenjao adhezivnu sposobnost između MDCK stanica i kristala COM-a pri čemu se najveća sposobnost zabilježila pri pH = 5,0, a najmanja pri pH = 8,0.[11]

S obzirom da nakon adhezije kristala COM-a dolazi do endocitoze kristala u stanice, nakon čega se staničnim endosomalnim mehanizmom degradiraju, pretpostavilo se da pH utječe na endocitozu, što se ispitalo protočnom citometrijom koristeći FITC (fluorescein izotiocijanat) za označavanje. Iz rezultata se vidjelo da se postotak stanica s endocitoziranim stanicama povećao samo pri pH = 7,0, a o ostalim pH vrijednostima nije ovisilo.[11]

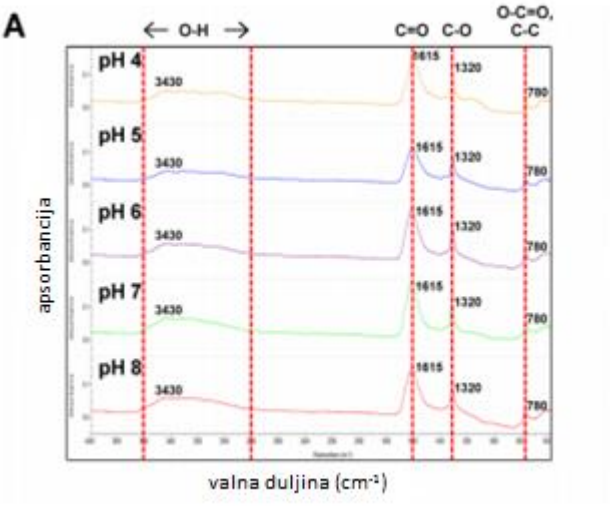
4.2.1.1. Utjecaj pH na sposobnost vezanja COM-a i proteina apikalne membrane

U ispitivanju su se apikalne membrane izolirale, solubilizirale i inkubirale s kristalima COM-a pri vrijednostima pH = 5,0 - 8,0. Proteini iz vezanih i nevezanih frakcija su se razdvojili s 12 % SDS-PAGE te su se obojali, vizualizirali, označili bojom Comassie Brilliant Blue G-250. Određenim formulama se procijenila sposobnost vezanja COM-a

svih proteina, HMW (visokomolekularni, engl. *high molecular weight*) I LMW (niskomolekularni, engl. *low molecular weight*) proteina u vezanim frakcijama pri čemu se iz kvantitativnih podataka nisu otkrile značajne razlike u vezanju COM-a pri različitim pH vrijednostima. Time je potvrđena hipoteza da kiseliji pH uzrokuje toksičnost koja dovodi do asimetrije membranskih lipida i povećanja adhezije kristala na stanicu.[11]

Utjecaj različitih pH vrijednosti (4,0 - 8,0) na kristalizaciju CaOx u umjetnom urinu se procjenjivao koristeći 3D način "ImageMaster 2D Platinum" softvera s namjerom prikupljanja podataka o volumenu kristala, a masa kristala se izračunala množenjem srednje vrijednosti veličine kristala i broja kristala. Rezultati su prikazali da je COM najefikasnije kristalizirao pri najnižem pH (4,0), a COD pri najvišem pH (8,0).[11]

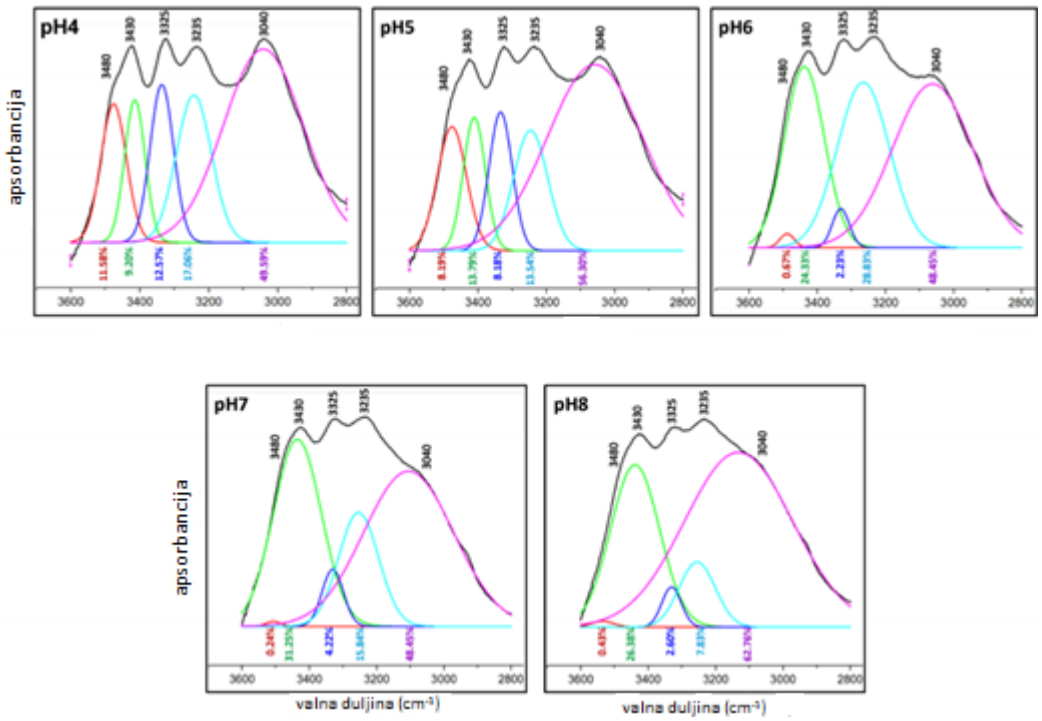
Jedan od jačih alata za ispitivanje kemijskog sastava kompleksne smjese je FT-IR spektroskopija gdje svaki spektar predstavlja vibracije istezanja svake funkcionalne grupe. Kao što se vidi na **Slici 9.**, iz smjese CaOx proizašla su 4 uobičajena područja gdje su se zamijetile vibracije istezanja O-H grupa pri 3600-2800 cm^{-1}, C=O pri 1615 cm^{-1}, C-O pri 1315 cm^{-1} i O-C=O/C-C pri 780 cm^{-1}. *"Curve fitting"* analizom proizašlo je 5 pikova nastalih asimetričnim i simetričnim istezanjima O-H grupa unutar područja 3600-2800 cm^{-1} gdje se jedino pik pri 3040 cm^{-1} pojavio i kod COM i kod COD, a preostala 4 pika su bila različita za COM i COD.[11]



Slika 9. Konzistentan spektar kristalizacije CaOx u umjetnom urinu dobiven FT-IR spektroskopijom.[11]

Kod COM-a su pikovi pri 3480, 3430, 3325, 3235 cm^{-1} imali usporedne amplitude i konfiguraciju, ali najvažnije od svega je da su bili dobro definirani, zbog čega su se lako razlikovali od ostalih, što se dobro vidi na **Slici 10**. Za razliku od njega kod COD-a su pikovi bili širi te su imali veći raspon amplituda pri čemu su se neki međusobno preklapali čineći ih manje definiranima. Pritom se COM nalazio u kiselijem području (4,0 i 5,0), a COD u bazičnijem području, što čini COM patogenijim za stvaranje bubrežnih kamenaca jer ima veću adhezivnu sposobnost dok bazičniji uvjeti urina smanjuju stabilnost i povećavaju topljivost kristala COM-a.[11]

U ovom eksperimentu umjetni urin je sadržavao 200 $mmol/dm^3$ uree, 54 $mmol/dm^3$ NaCl, 30 $mmol/dm^3$ KCl, 15 $mmol/dm^3$ NH_4Cl, 9 $mmol/dm^3$ Na_2SO_4, 5 $mmol/dm^3$ $CaCl_2$, 5 $mmol/dm^3$ $Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$, 4 $mmol/dm^3$ kreatinina i 2 $mmol/dm^3$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pri čemu je njegov pH bio 6,2, a osmolalnost 446 mOsm/kg te se koristeći NaOH i HCl, pH promijenio na vrijednosti 4,0 - 8,0. U njemu je CaOx kristalizirao uz miješanje otopine miješala i inkubacije na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata, a nakon toga kristalna morfologija proučavala i u konačnici izračunala ukupna masa kristala. Sukladno tome se vrsta kristala dodatno proučavala FT-IR spektroskopijom.[11]



Slika 10. Istezanje O-H grupe pri valnim duljinama između 3600 i 2800 cm^{-1} prikazano *"Curve Fitting"* analizom.[11]

4.2.2. Precipitacija kalcijeva oksalata dihidrata (COD) u umjetnom urinu

Umjetni urin se primjenjuje i za proučavanje faktora koji utječu na precipitaciju, odnosno taloženje kalcijeva oksalata dihidrata (COD) koji se nalazi u bubrežnim kamencima. Poznato je da COD-u odgovaraju niska temperatura, visok omjer kalcija u odnosu na oksalat te prisutnost određenih soli. Brown i suradnici[12] su na osnovu prethodno navedenog i provodili istraživanje taloženja COD za čije potrebe se pripravio umjetni urin koji je sadržavao: 0,1055 mol/dm^3 NaCl, 0,0323 mol/dm^3 NaH_2PO_4, 0,00321 mol/dm^3 $Na_3C_6H_5O_7$, 0,00385 mol/dm^3 $MgSO_4$, 0,01695 mol/dm^3 Na_2SO_4 te 0,0637 mol/dm^3 KCl (**Tablica 2.)** Nakon priprave umjetnog urina, pH se namjestio na 6,5 koristeći NH_4OH ili HCl. Za svako proučavanje se odvojilo 25 ml ispitivane otopine i stavilo u čašu od 50 ml nakon čega su se u otopinu dodavale različite vrijednosti 0,055 mol/dm^3 $CaCl_2$ u mikrolitrima te se to sve miješalo na vorteksu 5 sekundi. Nakon toga su se dodale različite vrijednosti 0,05 mol/dm^3 $Na_2C_2O_4$ te ponovo miješalo na vorteksu 5 sekundi. Otopine koje su se proučavale na 37 °C su se stavljale u vodenu kupelj na 15 min prije dodavanja $CaCl_2$ i $Na_2C_2O_4$, a nakon toga su se ostavljale na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Povremeno su se uzorci otopine proučavali pod svjetlosnim mikroskopom. Kako bi se razlikovali kristali COD-a i COM-a koristili su se polarizirano i nepolarizirano svjetlo.[12]

Otopine su se pripremile tako da u njima dođe do nukleacije i rasta onog kristala koji se proučavao kako bi se odredilo vrijeme u kojem započne sama nukleacija COM-a i COD-a pri različitim relativnim supersaturacijama (RS) i temperaturama. Kristalizacija COM-a provedena je u 25 ml deionizirane vode pri određenoj temperaturi, koja je podešena pomoću vodene kupelji. Kristalizacija COD-a provedena je u 25ml otopine: 9,36 mmol/dm^3 $Na_3C_6H_5O_7$, 11,55 mmol/dm^3 MgSO4 i 63,7 mmol/dm^3 KCl, čiji je pH = 6,5 te se pomoću vodene kupelji također namjestila konstantna temperatura otopine. U tikvicu su dodavane izmjerene količine $CaCl_2$ istovremeno miješajući na vorteksu nakon čega je dodan $Na_2C_2O_4$ i miješalo još deset sekundi. Potom su tikvice inkubirane kako bi se održala konstanta temperatura za vrijeme gledanja uzoraka mikroskopom. Zabilježeno je vrijeme prvog proučavanja kristala pod mikroskopom, a krajnji rezultati su srednje vrijednosti od približno 10 proba pri svakoj od četiri početne RS vrijednosti i dvije temperature. Rezultati su pokazali da je topljivost produkta COD-a na temperaturi od 37 °C 1,958 puta veća od topljivosti produkta COM-a.[12]

Tablica 3. Precipitati kalcijeva oksalata u umjetnom urinu.[12]

mmol/dm³ Ca	mmol/dm³ Ox	Ca:Ox	RS	ZP (V·10²)	% COM-a	tip COD-a		veličina (μm)
22 °C								
8.05	0.871	9.24	50.0	−3.0	< 5	BP, IP	puno	10–20
8.02	1.06	7.56	60.3	−3.0	< 5	BP, IP	srednje	10–20
7.99	1.25	6.39	70.4	−3.0	< 10	BP, IP	puno	10–20
7.08	0.778	9.1	40.4	−3.0	0	BP, IP	srednje	< 10
7.05	0.973	7.24	50.0	−3.1	0	BP, IP	srednje	< 10
7.03	1.15	6.11	58.9	−3.1	< 5	BP, IP	srednje	10–20 +
6.99	1.34	5.21	67.7	−3.1	< 10	BP, IP	puno	10–20
6.06	0.874	6.93	39.4	−3.1	0	BP, IP	srednje	10–20
6.04	1.06	5.70	47.6	−3.1	0	BP	srednje	10–20 +
6.01	1.25	4.80	55.3	−3.2	10	BP, IP	puno	10–20 +
5.06	0.781	6.48	29.8	−3.2	0	BP, IP	srednje	< 10
5.04	0.977	5.16	36.9	−3.3	0	BP, IP	srednje	10–20
5.02	1.16	4.33	43.3	−3.3	0	BP, IP	puno	10–20
5.00	1.35	3.70	49.8	−3.3	40	BP, IP	puno	10–20
4.05	0.87	4.66	26.7	−3.4	0	BP, IP	malo	< 10
4.04	1.06	3.81	32.2	−3.4	0	BP, IP	srednje	< 10
4.02	1.25	3.22	37.4	−3.4	0	BP, IP	malo	< 10
37 °C								
5.10	0.958	5.32	24.4	−4.0	0	BP, IP	malo	< 10
5.08	1.15	4.42	28.8	−4.0	40	BP, IP	srednje	10–20 +
4.87	0.863	5.64	21.1	−4.0	0	BP, IP	malo	< 10
4.85	1.05	4.62	25.5	−4.0	< 5	BP, IP	malo	10–20 +
4.83	1.24	3.90	29.7	−4.0	30	BP	malo	10–20 +
4.62	0.96	4.81	22.3	−4.0	0	BP	malo	< 10
4.60	1.15	4.00	26.4	−4.0	0	BP, IP	puno	10–20
4.37	0.864	5.06	19.1	−4.0	0	BP	malo	< 10
4.36	1.05	4.15	23.1	−4.0	0	BP, IP	malo	10–20
4.35	1.24	3.51	26.9	−4.1	50	BP, IP	malo	10–20
4.13	0.959	4.31	20.0	−4.1	0		0	
4.11	1.15	3.57	23.7	−4.1	0	BP, IP	srednje	10–20

Morfologija precipitata kalcijevog oksalata pri različitim koncentracijama $CaCl_2$ i $Na_2C_2O_4$ na temperaturama od 22 i 37 °C u umjetnom urinu je prikazana u **Tablici 3.** iz čega se vidi da visok omjer kalcija u odnosu na oksalat i niski RS favorizira formiranje COD-a, dok omjer manji od 1:1 doprinosi malom broju velikih kristala COD-a. U umjetnom urinu na 22 °C je u početku došlo do spontane nukleacije i rasta COD-a pri RS manjim od 49, a na 37 °C se COD pojavio pri RS vijednosti od 25, što znači da je ukupan broj CaOx kristala bio manji na 37 nego na 22 °C. Nukleacijska aktivacijska energija COD-a je bila niža od nukleacijske aktivacijske energije COM-a, a njihovo povećanje je proporcionalno sniženju RS vrijednosti. Dobiveni rezultati pokazali su da COD nastaje pri niskim temperaturama, niskoj relativnoj supersaturaciji i visokom omjeru kalcija i oksalata te da u odsutnosti citrata ne može nastati. Stvaranje COM-a inhibira prisutnost magnezija, dok magnezijev sulfat i kalijev klorid olakšavaju formiranje COD-a snižavanjem RS-a i povećanjem omjera kalcija u odnosu na oksalat.[12]

5. ZAKLJUČAK

Ljudski urin je izvrstan medij za različita istraživanja bolesti bubrega i urinarnog trakta, ali potrebne su velike količine urina za istraživanja te se uz to razlikuje od pojedinca do pojedinca. Umjesto ljudskog urina upotrebljava se umjetni urin pripravljen u laboratoriju, a na temelju prethodno postavljenih individualnih formula za pripravu umjetnog urina dobila se, do sada najbolja, formula koja se naziva "AU-Siriraj". Utvrđeno je da su njezine komponente i svojstva unutar fizioloških raspona ljudskog urina na temelju usporedbe gustoće, pH, osmolalnosti i drugih svojstava.

Provjerom kompatibilnosti AU formula za *in vitro* staničnu kulturu u usporedbi s ultrafiltriranim urinom i slijepom probom utvrdilo se da je AU-Siriraj imao sve parametre unutar fiziološkog raspona ljudskog urina, a kod ostalih su nedostajali ili bili u suvišku. Upravo zbog toga je AU-Siriraj najbolja formula, nakon koje slijedi AU-3, a za razliku od njih najcitotoksičnija je AU-4 formula koja se koristi za kristalizaciju $Ca_3(PO4)_2$.

Na temelju svrhe pojedinih istraživanja, na različite načine su pripravljani umjetni urini te su prilagođavani na pH potreban za određeno istraživanje. Ispitivanjem utjecaja pH urina na kristalizaciju, adheziju i internalizaciju kalcijevog oksalata rezultati su prikazali da je COM najefikasnije kristalizirao pri najnižem pH (4,0), a COD pri najvišem pH (8,0) pri čemu je COM glavna komponenta bubrežnih kamenaca, što znači da formiranju bubrežnih kamenaca odgovara upravo niski pH.

6. LITERATURA

[1] J. A. Wesson, M. D. Ward, *Elements* Vol.3, PP. 415-421

[2] S. Chutipongtanate, V. Thongboonkerd, *Analytical Biochemistry* 402 (2010), 110-112

[3] https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/kidneys/ (preuzeto 17.07.2018.)

[4] https://owlcation.com/stem/The-Urinary-System-How-the-Nephron-Works-in-Urine-Formation (preuzeto 17.07.2018)

[5] http://www.onlinebiologynotes.com/physiology-urine-formation/ (preuzeto 17.07.2018.)

[6] https://www.thoughtco.com/the-chemical-composition-of-urine-603883 (preuzeto 03.08.2018.)

[7] http://www.biologydiscussion.com/biochemistry/excretion/urine-composition-constituents-and-deposits/44056 (preuzeto 03.08.2018.)

[8] https://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19710023044.pdf (preuzeto 03.08.2018.)

[9] http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-jetre-i-zuci/pretrage-za-bolesti-jetre-i-zucnih-vodova/testovi-za-kolestazu (preuzeto 22.08.2018.)

[10] T. Brooks, C. W. Keevil, *Letters in Applied Microbiology* 1997, 24, 203-206

[11] J. Manissorn, K. Fong-ngern, P. Peerapen, V. Thongboonkerd, *Scientific reports* 2017, 1-11

[12] P. Brown, D. Ackermann, B. Finlayson, *Journal of Crystal Growth* 98 (1989) 285-292

[13] https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/urinalysis/about/pac-20384907?p=1 (preuzeto 20.07.2018.)

[14] https://www.healthline.com/health/urinalysis#methods (preuzeto 20.07.2018.)

[15] http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/genitourinarne-bolesti/pristup-genitourinarnom-bolesniku/pristup-nefropatu (preuzeto 19.08.2018.)

[16] https://www.sweet-cures.com/urinalysis-lab-testing.htm (preuzeto 06.09.2018.)

[17] http://www.beaumont.ie/kidneycentre-forpatients-aguidetokidneydisease-the (preuzeto 06.09.2018.)

[18] http://keywordsuggest.org/gallery/791517.html (preuzeto 06.09.2018.)

[19] http://www.poliklinika-stela.hr/Oralni_glukoza_tolerans_test1.html

[20] Lj. Broz, M. Budisavljević, S. Franković, T. Not, *Zdravstvena njega 3 : zdravstvena njega internističkih bolesnika*, Školska knjiga, Zagreb, 2007.

[21] https://www.synlab.hr/urinokultura-urin-bakterioloski/ (preuzeto 06.09.2018.)

[22] http://www.poliklinika-sunce.hr/usluge/klirens-kreatinina/ (preuzeto 07.09.2018.)

[23] http://www.forenzika.hr/970.aspx (preuzeto 07.09.2018.)

[24] https://www.homehealthtesting.com/positive-drug-test-result.html (preuzeto 07.09.2018.)

[25] https://healthcare-manager.com/products/12-panel-urine-drug-test-cup-7124-easy-home?variant=786829947 (preuzeto 07.09.2018.)

[26] J. R. Burns i B. Finlayson, Invest. Urol. **18** (1980) 167-169.

[27] https://healthcare-manager.com/products/12-panel-urine-drug-test-cup-7124-easy-home?variant=786829947 (preuzeto 07.09.2018)

[28] L. C. Isaacson, Invest. Urol. **6** (1969) 356-363.

[29] R. H. Doremus, S. Teich i P. X. Silvis, Invest. Urol. **15** (1978) 469-472.

[30] J. D. Miller, A. D. Randolph i G. W. Drach, J. Urol. **117** (1977) 342-345.

[31] L. M. Barker, S. L. Pallante, H. Eisenberg, J. A. Joule, G. L. Becker i J. E. Howard, J. Urol. **12** (1974) 79-81.

[32] M.B. Rose, Invest.Urol. **12** (1975) 428-433.

[33] P. Brown, D. Ackermann i B. Finlayson, J. Cryst. Growth **98** (1989) 285-292.

[34] http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-bubrega-i-mokracnih-putova/metabolicke-i-prirodjene-bolesti-bubrega/bubrezna-glikozurija (preuzeto 03.08.2018.)

[35] https://microbiologyinfo.com/benedicts-test-principle-composition-preparation-procedure-and-result-interpretation/ (preuzeto 03.08.2018.)