Usporedba metoda za određivanje osmolalnosti u serumu

Lipovec, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:847605

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Renata Lipovec

Usporedba metoda za određivanje osmolalnosti u serumu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na stručnom voditeljstvu, ukazanom povjerenju i koordinaciji razmjene koja je, uz ovaj diplomski rad, pridonijela stjecanju mnoštva stručnih i životnih iskustava, lijepih prijateljstava i ugodnih trenutaka.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice na nesebičnoj pomoći i srdačnom gostoprimstvu.

Velika hvala svim prijateljima na kolegijalnosti i susretljivosti te na svim lijepim trenutcima po kojima ću doživotno pamtiti godine studiranja.

Na kraju, najveća hvala mami i sestri za nesebičnu podršku i povjerenje koje sam mogla primiti, za najkorisnije savjete i za bezuvjetnu ljubav tijekom cjelokupnog školovanja.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Raspodjela vode i elektrolita u organizmu 1
1.1.1 Raspodjela vode 1
1.1.2 Raspodjela elektrolita 3
1.2 Osmotski tlak 4
1.2.1 Definicija osmolarnosti i osmolalnosti 6
1.2.2 Osmolalnost u plazmi ili serumu 6
1.2.3 Mjerenje osmolalnosti 7
1.2.4 Izračunavanje osmolalnosti 8
1.2.5 Definicija osmometrije 9
1.2.6 Osmotska praznina 10
1.2.7 Klinička primjena 10
1.2.8 Referentne vrijednosti 11
1.2.9 Hiperosmolalnost 11
1.2.10 Hipoosmolalnost 11
2 OBRAZLOŽENJE TEME 12
3 MATERIJALI I METODE 13
3.1 Uzorci 13
3.2 Mjerenje osmotske koncentracije 14
3.2.1 Osmometar 14
3.2.2 Kalibracija instrumenta 14
3.2.3 Mjerenje osmolalnosti 15
3.2.4 Najčešće pogreške prilikom mjerenja 15
3.3 Izračunavanje osmolalnosti 16
3.4 Statističke metode 21
4 REZULTATI 23
4.1 Frekvencija ispitanika po spolu 23

4.2 Deskriptivna statistika ispitivanih uzoraka 23
4.3 Usporedba metoda 26
4.4 Korelacija varijabli izračunate osmolalnosti s izmjerenom osmolalnosti.....27
4.5 Prijedlog novog matematičkog modela za procjenu osmolalnosti 29
5 RASPRAVA.....31
6 ZAKLJUČCI 34
7 LITERATURA 35
8 SAŽETAK.....36
9 SUMMARY 37

POPIS KRATICA

ADH – antidiuretički hormon (engl. *antidiuretic hormone*)

ECF – izvanstanični odjeljak (engl. *extracellular fluid compartment*)

G-6-PDH – glukoza-6 fosfat-dehidrogenaza (engl. *glucose-6-phosphate-dehydrogenase*)

HK – heksokinaza

ICF – unutarstanični odjeljak (engl. *intracellular fluid compartment*)

ISE – ion selektivne elektrode (engl. *ion-selective electrodes*)

KZZK – klinički zavod za kemiju

1 UVOD

1.1 Raspodjela vode i elektrolita u organizmu

Volumen tjelesnih tekućina i koncentracije elektrolita normalno se održavaju u vrlo uskim granicama usprkos velikim kolebanjima unosa hranom, metaboličke aktivnosti i okolišnih stresova. Homeostazu tjelesnih tekućina čuvaju u prvom redu bubrezi.

1.1.1 Raspodjela vode

Na vodu otpada oko 60% tjelesne težine (od 50% u pretilih do 70% u mršavih osoba). Gotovo $^{2}/_{3}$ tjelesne vode nalazi se unutar stanica (intracelularna tekućina), a $^{1}/_{3}$ je vanstanično (ekstracelularna tekućina). Normalno je oko 25% vanstanične tekućine u žilama, a 75% u intersticiju.

Prosječni dnevni unos vode iznosi oko 2,5 L. Za nadoknadu gubitaka mokraćom i drugim putovima zdravim odraslim osobama treba dnevno 1–1,5 L. Međutim, prosječna mlada osoba s urednom funkcijom bubrega može na kraći rok dnevno unositi svega 200 mL vode da bi izlučila dušični i drugi metabolički otpad. Veće su količine potrebne osobama s oštećenom koncentracijskom sposobnošću bubrežnih tubula (npr. stariji, dijabetičari, uz neke nefropatije, hiperkalcijemiju, izrazitu restrikciju soli, kroničnu hiperhidraciju ili hiperkalijemiju te nakon unošenja etanola, fenitoina, litija, demeklociklina ili amfotericina B) i pri osmotskoj diurezi (npr. visokoproteinska dijeta, hiperglikemija).

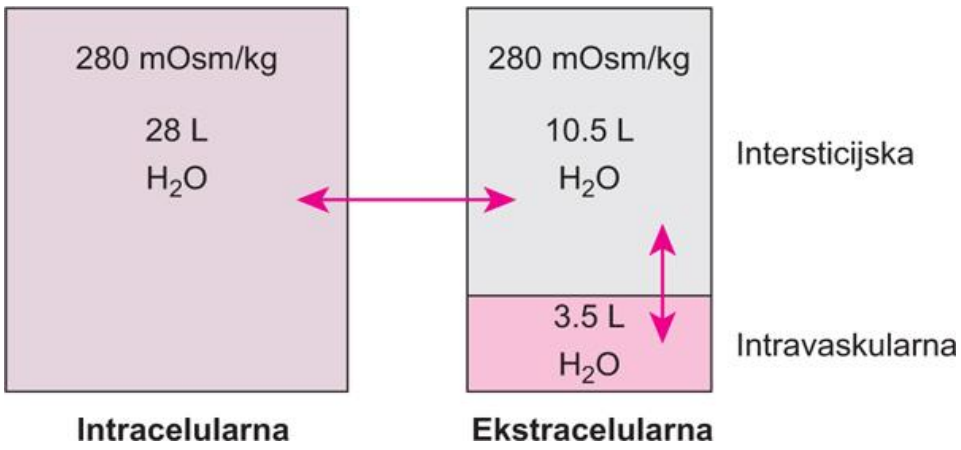
Drugi, obvezni gubici vode odnose se na nezamjetljivo izlučivanje preko pluća i kože (perspiratio insensibilis), koje iznosi oko 0,4–0,5 mL/kg/h ili oko 650–850 mL/dan u odrasle osobe teške 70 kg. Uz vrućicu se gubi dodatnih 50–70 mL/dan za svaki °C iznad normale. Crijevni gubici su obično zanemarivi, osim pri izrazitom povraćanju i/ili proljevu. U vrućoj sredini javljaju se i veliki gubici putem znoja (Porter, 2011).

Opseg unosa vode podešava žeđ, koju potiču receptori u anterolaternom hipotalamusu, osjetljivi na porast osmolalnosti plazme (za svega 2%) i na smanjenje tekućinskog volumena. Disfunkcija hipotalamusa smanjuje tu sposobnost.

Izlučivanje vode nadzire u prvom redu arginin vazopresin, poznat i kao neurohipofizni antidiuretski hormon (ADH), koji povećava reapsorpciju vode u distalnim dijelovima nefrona. Lučenje ADH potiču veća osmolalnost i smanjeni volumen plazme, sniženje arterijskog tlaka i stres, a smanjuje se pod utjecajem određenih tvari (npr. etanol, fenitoin) te kod dijabetesa insipidusa.

Dnevni unos vode može ići sve do 25 L. Veće količine nadmašuju dilucijsku sposobnost bubrega i brzo snižavaju osmolalnost plazme.

Voda slobodno prolazi stanične membrane iz mjesta niže prema mjestima više koncentracije otopljenih tvari. Osmolalnost se dakle nastoji izjednačiti između raznih tjelesnih odjeljaka, u prvom redu pomakom vode, a ne otopljenih tvari. Otopljene tvari, poput ureje, koje slobodno prolaze kroz stanične membrane skoro su bez utjecaja na pomake vode (zanemariva osmotska aktivnost), dok najveći utjecaj imaju otopljene tvari koje su manje–više ograničene na stanovite odjeljke, poput Na^+ i K^+. Tonicitet ili efektivna osmolalnost, odraz je osmotske aktivnosti i odrednica je sile koja pokreće vodu između tekućinskih odjeljaka (osmotska sila). Osmotskoj se mogu suprotstaviti druge sile. Primjerice, plazmatske bjelančevine imaju blag osmotski učinak koji navlači vodu u plazmu, a normalno mu se suprotstavljaju hidrostatske sile koje potiskuju vodu iz žila (Porter, 2011).



Slika 1. Tekućinski odjeljci u osobe od 70 kg (Ukupna voda u tijelu = 70 kg × 0,6 = 42 L)

(preuzeto s http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/endokrinologija/metabolizam-tekucine-i-elektrolita/ravnoteza-natrija-i-vode)

1.1.2 Raspodjela elektrolita

Voda je medij u kojem se obavljaju kemijske reakcije metaboličkih procesa, a pri tome je važna i raspodjela elektrolita, koji pak utječu na njezin volumen i raspodjelu u pojedinim odjeljcima. Postoje razlike u sastavu stanične i izvanstanične tekućine, a manje razlike i u sastavu izvanstanične tekućine koja se nalazi u međustaničnim prostorima i one u vaskularnom prostoru, tj. krvne plazme. Te su razlike uvjetovane različitom propustljivošću staničnih membrana koje razdvajaju staničnu, međustaničnu i vaskularnu tekućinu (Štraus, 2009).

Glavni kationi u organizmu jesu Na^+, K^+, Ca^{2+} i Mg^{2+}, a od aniona Cl^-, HCO^{3-}, HPO_4^{2-} i SO_4^{2-}. Osim ovih, nalazi se još niz kationa i aniona, npr. Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cr^{3+}, Cd^{2+}, Br^-, I^- i dr., ali u vrlo malim koncentracijama. Kod aktualnog pH u organizmu i proteini se ponašaju kao anioni.

Elektroliti imaju važnu funkciju:

1. u održavanju ravnoteže i raspodjele vode
2. u održavanju normalnog osmotičkog tlaka
3. u održavanju acido-bazne ravnoreže i
4. održavanju neuromuskularne podražljivosti (Štraus, 2009).

1.1.2.1 Izvanstanična tekućina

Sve su stanice okružene izvanstaničnom tekućinom. Nalazi se u tijelu kao krvna plazma i kao međustanična tekućina u obliku limfe, peritonealne, perikardijalne, pleuralne, sinovijalne i cerebrospinalne tekućine. Sve te tekućine imaju uglavnom isti kvalitativni sastav, ali postoje kvantitativne razlike. To su razlike prije svega u koncentraciji proteina koje iznose od oko 70 g/L u krvnoj plazmi do 0,37 g/L u likvoru. Od elektrolita sadržavaju najviše Na^+, Cl^- i HCO_3^-, uz nešto K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, H^+, HPO_4^{2-}, SO_4^{2-} i organskih kiselina.

Osim proteina, postoje razlike između krvne plazme i međustanične tekućine u sadržaju Ca^{2+} i Mg^{2+} te u koncentracijama nekih elektrolita kao ureje, glukoze i lipida. pH izvanstanične tekućine iznosi od 7,36 do 7,44 i za normalno obavljanje metaboličkih procesa vrlo je važno da se održava u uskim granicama. Koncentracija ukupnih kationa i ukupnih aniona uvijek je jednaka i tekućina je električki neutralna. Ako se koncentracija kojeg aniona

poveća, smanjit će se koncentracija drugog aniona, ili povećati koncentracija kationa da bi se održala električna neutralnost (Štraus, 2009).

1.1.2.2 Stanična tekućina

Nasuprot kvalitativno jednakom kemijskom sastavu izvanstanične tekućine, razlike u strukturi i funkciji stanica raznih tkiva odražavaju se i u kemijskom sastavu tekućine u pojedinim stanicama. Eritrociti sadržavaju npr. specifičan protein, hemoglobin, a mišićne stanice drugi hemoprotein, mioglobin. Stanice raznih tkiva sadržavaju razne enzime itd.

Dok je u izvanstaničnoj tekućini glavni kation Na^+, u staničnoj je tekućini prevladavajući kation K^+, kojega ima oko 105 mmol/L. Natrija ima samo 0-40 mmol/L, a također vrlo malo Ca^{2+}, dok je Mg^{2+} 20 puta više nego u izvanstaničnoj tekućini. Nasuprot izvanstaničnoj tekućini u kojoj je glavni anion Cl^-, u staničnoj tekućini ima najviše fosfora, i to organskih i slabo disociranih. Također, ima više sulfata i proteina, a Cl^- praktično nema, osim nešto u eritrocitima, stanicama bubrežnih kanalića, želudca i crijeva (u te stanice kloridi dospijevaju uglavnom apsorpcijom ili ih stanice izlučuju).

Razlike u kemijskom sastavu izvanstanične i stanične tekućine mogu se djelomično objasniti Gibbs-Donnanovim zakonom (Štraus, 2009.).

1.2 Osmotski tlak

Razlike hidrostatskih tlakova s jedne i druge strane staničnih membrana su zanemarljive, pa hidratacija stanica ovisi o osmotskoj razlici između unutarstanične i izvanstanične tekućine. Stanične membrane slobodno propuštaju vodu. No za razliku od teoretske polupropusnosti membrane, one propuštaju neke otopljene tvari, koje prolaze kroz njih difuzijom ili aktivnim transportom različitom brzinom, ali uvijek sporije nego voda. U normalnom stanju unutarstanična osmolalnost u stanicama, koja uglavnom potječe od kalija i njemu pridruženih aniona, ista je kao u izvanstaničnoj tekućini, u kojoj najviše potječe od natrija i s njime udruženih aniona, pa ukupno nema prolaza vode ni u stanice ni iz njih. U nekim patološkim stanjima mogu nagle promjene koncentracije otopljenih tvari izazvati

promjene hidracije stanica; učinak je slabiji kada se koncentracije mijenjaju polagano pa ima vremena da se izjednače.

Budući da u normalnom organizmu oko 90% ukupne osmolalnosti plazme potječe od natrija i aniona koji ga prate, mijenja se hidratacija stanica pri brzim promjenama koncentracije natrija. Porast izaziva dehidrataciju stanica, a pad prekomjernu hidrataciju, ako u koncentracijama drugih otopljenih tvari nema značajnih promjena.

Ureja i glukoza pri normalnim koncentracijama vrlo malo utječe na osmolalnost palzme. Ali u teškoj uremiji ili hiperglikemiji mogu se koncentracije ovih spojeva i petnaesterostruko povećati i tada mogu značajno utjecati. Ureja ulazi u stanice difuzijom mnogo sporije nego voda pa se u akutnoj uremiji mijenja hidratacija stanica. U kroničnoj uremiji je osmotski učinak ureje ograničen jer se njene koncentracije na vanjskoj i unutarnjoj strani membrane postepeno izjednačuju. Glukoza ulazi u stanice aktivnim transportom, ali se u njima i brzo razgrađuje. Stoga su koncentracije glukoze u stanicama uvijek niske pa teška hiperglikemija, bilo akutna, bilo kronična, primjetno utječe na hidraciju stanica. Uremija i hiperglikemija mogu izazvati dehidrataciju stanica, ali normalne koncentracije ureje i glukoze pridonose tako malo ukupnoj osmolalnosti plazme da, za razliku od natrija u sniženim koncentracijama ne izazivaju prekomjernu hidraciju stanica.

Više nego trostruki porast koncentracije drugih otopljenih tvari, kao što su kalcij, kalij i magnezij, nespojiv je sa životom iz „neosmotskih“ razloga, pa stoga one izazivaju značajne promjene osmolaliteta. Infuzije tvari koje ne ulaze u stanice, npr. manitola, mogu služiti za redukciju edema mozga i kao osmotski diuretici poput hipertoničnih otopina glukoze ili ureje. Kada se mjeri ukupni osmolalitet plazme, uključene su i sve takve tvari, među njima alkohol.

Da bismo mogli sagledati posljedice koje se mogu pojaviti s promjenama osmolalnosti plazme, moramo znati koliki je osmotski učinak razlike koncentracija između unutar- i izvanstanične tekućine. Čak kad bismo mogli s preciznošću od 100% odrediti osmolalnost plazme, onu u stanicama možemo samo grubo ocijeniti, i to kada nam je poznata anamneza i vjerojatna propustljivost staničnih membrana za tvar koja je najviše pridonijela promjeni. Za kliničara je osmolalnost plazme, izračunana iz koncentracije natrija, kalija, ureje i glukoze, uz uvažavanje navedenih faktora, barem tako korisna kao samo mjerenje osmolalnosti plazme. Osim toga, račun ima prednost da se često može ustanoviti koja je tvar izazvala osmotsku promjenu (Štraus, 2009.).

1.2.1 Definicija osmolarnosti i osmolalnosti

Osmotska koncentracija može se izraziti na dva načina:

- kao osmolarnost, tj. u obliku broja mmola na litru otopine
- ili kao osmolalnost, tj. kao broj mmola na kilogram otapala

Kada su tvari otopljene u čistoj vodi u koncentracijama koje nalazimo u biološkim tekućinama, jedva ima brojčanih razlika između osmolarnosti i osmolalnosti (Zilva i sur., 1992).

1.2.2 Osmolalnost u plazmi ili serumu

Osmolalnost plazme i koncentracija natrija, kao i njihovo važno određivanje, održavani su u konstantnim koncentracijama unutar uskih granica. Unatoč naglašenim floktulacijama u unosu vode i soli ili drugih otopina, srednja osmolalnost plazme iznosi 287 mOsmol/kg H_2O i fiziološki se mijenja za samo ±2%. Održavanje tako konstantne koncentracije potječe od zajedničkog djelovanja dvaju „feedback" kontrolnih mehanizama koji povećavaju ili smanjuju količinu ukupne vode tako sprječavajući bilo kakve promjene ne samo u koncentraciji natrija i njegovih aniona nego i u osmolalnosti. Cilj je održavanje normalne distribucije vode između unutarstanične i izvanstanične tekućine (toniciteta) (Thomas, 1998.).

Unos i eliminacija vode regulirani su pomoću dva regulatorna sistema:

- *Sekrecije ADH*. Kod osmolalnosti plazme < 280 mOsmol/kg H_2O ADH se ne izlučuje. Dolazi do diureze (izlučivanja) vode popraćene povećanjem osmolalnosti plazme i tako do linearnog porasta plazmatske koncentracije ADH koja smanjuje renalno izlučivanje vode. Najvažnija funkcija izlučivanja ADH je sprečavanje intoksikacije vodom.
- *Osjećaj žeđi (mehanizam žeđi)*. Porast osmolalnosti plazme do > 290 mOsmol/kg H_2O aktivira mehanizam žeđi. Pod takvim uvjetima unos vode rezultira normalizacijom osmolalnosti plazme, potpunom inhibicijom žeđi i smanjenjem sekrecije ADH. Najvažnija funkcija mehanizma žeđi je sprječavanje dehidracije organizma. Mehanizam žeđi je sam po sebi sposoban održavati osmolalnost plazme ako je dostupna odgovarajuća količina vode za oralnu primjenu.

Promjene u osmolalnosti plazme zbog gubitka ili povećane količine vode uzrokuju redistribuciju vode između ICF i ECF. To upućuje na ili nastajanje edema ili dehidracije stanica. Promjene volumena koje utječu na živčane stanice mogu uzrokovati teške neurofiziološke simptome (Thomas, 1998).

Klinički simptomi pronađeni zajedno s abnormalnom osmolalnosti plazme ovise o etiologiji, brzini kojom se promjene događaju i prirodi otopine. Npr. malo smanjenje osmolalnosti plazme za 60-80 mOsmol/kg H_2O može se dogoditi bez izazivanja smrti.

Porast osmolalnosti plazme zbog gubitka vode ili porasta elektrolita koji ne prolaze kroz staničnu membranu, npr. natrij i glukoza, može kao posljedicu imati komu i smrt ako je taj porast 40-60 mOsmol/kg H_2O. Tvari koje slobodno prolaze kroz membranu kao što su ureja i etanol s druge strane su bezopasne budući da one ne stvaraju velike razlike osmolalnosti između ICF i ECF (Thomas, 1998.).

Znači:

- Osmolalnost plazme je najvažniji parametar za procjenu unutarnje ravnoteže vode za razliku od promatranja tjelesne težine koja predstavlja klinički najkorisniji parametar za procjenu ravnoteže vanjske tekućine
- Kod euglikemičnih osoba s normalnom renalnom funkcijom promjene u osmolalnosti plazme obično paralelno prate bilo kakve promjene u koncentraciji natrija. Poznavanje koncentracije natrija je zbog toga vrlo važan kriterij za kliničku procjenu mjerene osmolalnosti. Ureja i glukoza su klinički važne samo ako su prisutne u abnormalno visokim koncentracijama (Thomas, 1998.).

1.2.3 Mjerenje osmolalnosti

Izmjena vode kroz membranu koja propušta samo vodu ovisi o razlici koncentracija različitih čestica (iona i molekula) na jednoj i drugoj strani membrane. Uz jednake masene koncentracije vrijedi: što su otopljene čestice veće (molekulska masa veća) to ih je manje u jedinici volumena i to manji je njihov osmotski učinak. Međutim, ako membrana osim vode propušta i male čestice izjednačit će se koncentracije na obje stane i tada važan faktor u prometu vode postaju velike molekule. Pri tumačenju raspodjele vode u tijelu bitno je shvatiti važnost sljedećih faktora:

- broja čestica u jedinici volumena
- koncentracijskog gradijenta kroz membranu
- odnosa između veličine čestica i propustljivosti membrane (Zilva i sur., 1992).

Osmometrima se mjeri sniženje ledišta ili tlak vodene pare koji su obraz ukupne osmolalnosti otopine, tj. osmotskog učinka svih otopljenih molekula i iona na membranu koja bi, za razliku od bioloških, propuštala samo vodu (Burtis, 1994).

Jedina znatna razlika između sastava plazme i međustanične tekućine je u sadržaju proteina. Prema tome je ukupna osmolalnost plazme gotovo ista kao osmolalnost intersticijske tekućine koja oplahuje stanice (Zilva i sur., 1992).

1.2.4 Izračunavanje osmolalnosti

Na stanične membrane ne djeluje osmolarna, nego osmolalna koncentracija koju reguliraju homeostatski mehanizmi. Podaci o osmolalnosti plazme dobiveni računom često su toliko informativni kao i izmjerena osmolalnost.

Vrijednost osmolalnosti plazme dobivena mjerenjem trebala bi biti veća od osmolalnosti izračunate zbrajanjem molarnih koncentracija svih iona (zbog sadržaja proteina), međutim ta se dva rezultata vrlo malo razlikuju. Razlog je u tome što je zbog nepotpune ionizacije (npr. NaCl na Na^+ i Cl^-) osmotski učinak gotovo isto toliko smanjen koliko je povećan zbog toga što proteini zauzimaju jedan dio volumena plazme. Računom dobiven podatak osmolalnosti plazme je stoga vrlo blizak pravoj osmolalnosti. To vrijedi samo kada nema jake hiperlipidemije ili hiperproteinemije. Kada proteini ili lipidi pridonose mnogo više od 6% izmjerenom volumenu plazme, izračunata osmolalost može biti značajno niža od stvarne koncentracije u vodi plazme (Zilva i sur., 1992).

Za izračunavanje osmolalnosti plazme predložene su mnoge, manje ili više složene formule:

$$mOsmol/kg\ H_2O = 2 \times ([Na^+] + [K^+]) + [glukoza] + [ureja] \quad \text{(Zilva i sur., 1992.)}$$

$$mOsmol/kg\ H_2O = 1.86 \times [Na^+] + [glukoza] + [ureja] + 9 \quad \text{(Thomas, 1998.)}$$

No budući da nijedna ne može predvidjeti osmotski učinak najbolje je poslužiti se najjednostavnijom, po kojoj su rezultati vrlo bliski stvarnoj osmolalnosti plazme (seruma) (Zilva i sur., 1992).

Koncentracija kalija i natrija množe se sa 2 jer su s njima udruženi anioni; pretpostavlja se da su soli potpuno ionizirane.

Ovako se ne može računati kada se:

- U cirkulaciji nalazi nepoznata koncentracija osmotski aktivne tvari, npr. manitola ili alkohola. Kada nema hiperproteinemije ili hiperlipidemije, značajna razlika između izračunanog i izmjerenog osmotskog tlaka upućuje na trovanje alkoholom ili drugom supstancom. Npr. 100 mg alkohola u decilitru plazme povećava osmolalnost za približno 20 mmol/kg.
- Postoji visoka hiperproteinemija ili hiperlipemija

U takvim slučajevima može na osnovi koncentracije natrija doći do pogrešnih zaključaka pa treba izmjeriti osmolalnost (Zilva i sur., 1992).

Osmolalnost mokraće ne može se izračunati jer se mnogo mijenjaju koncentracije različitih, neizmjerenih otopljenih tvari; osmotski se tlak može odrediti samo mjerenjem osmolalnosti.

1.2.5 Definicija osmometrije

Osmometrija je metoda koja mjeri koncentraciju otopljene tvari. Razlikuje se od mjerenja molarnosti. Molarnost je mjera broja molova otopljene tvari u otopini, dok je osmometrija mjera broja čestica otopljene tvari u otopini. Osmometrija uzima u obzir ukupnu koncentraciju otopljenih čestica u otopini, bez obzira na njihovu veličinu, gustoću, molekularnu masu i električni naboj (Gilbard, 1978). Osmometrija se klinički primjenjuje za procjenu ravnoteže vode i elektrolita, ispitivanje hiponatrijemije, intoksikaciju (npr. metanol, etilen-glikol), diferencijalnu dijagnostiku kronične dijareje te procjenu povećane ili smanjene količine urina.

1.2.6 Osmotska praznina

Osmolalnost plazme je gotovo potpuno određena sa sljedećih pet topljivih tvari: natrij, kloridi, bikarbonati, glukoza i ureja. Budući da je svaki ion natrija udružen s anionom, samo je potrebno izmjeriti koncentracije natrija, ureje i glukoze za izračunavanje osmolalnosti plazme.

Osmotska praznina između mjerene i izračunate vrijednosti je zapažena ako se pojavljuje hiperosmolarno stanje u prisutnosti drugih topljivih tvari uz ranije navedenih pet.

Osmotska praznina se izračunava prema sljedećoj jednadžbi:

Osmotska praznina (mOsmol/kg H_2O) = mjerena osmolalnost – izračunata osmolalnost (Burtis, 1994)

Do pojave osmotske praznine dolazi u stanjima kada je izmjerena osmolalnost veća od izračunate za > 10 mOsmol/kg H_2O i prisutna je povišena osmolalnost plazme. Izračunavanje osmotske praznine važno je za otkrivanje i praćenje intoksikacije koje uključuje ne-elektrolitne tvari koje povisuju osmolalnost plazme kao što su: etanol, metanol, etilen glikol, izopropanol i diklormetan (Thomas, 1998).

1.2.7 Klinička primjena

Osmolalnost seruma se mjeri za:

- Procjenu ravnoteže vode i elektrolite otopljenih u krvi
- Ispitivanje hiponatrijemije
- Dokazivanje intoksikacije (npr. etanolom, metanolom, etilen glikolom)
- Diferencijalnu dijagnostiku kronične dijareje
- Provjeravanje proizvodi li hipotalamus dovoljno antidiuretskog hormona (povećana ili smanjena količina urina)
- Spoznaju da li je prisutna teška dehidracija ili hiperhidracija
- Pronalaženje uzroka napadaja ili kome. U težim slučajevima, neravnoteža između vode i elektrolita u tijelu može uzrokovati napadaje ili komu (Čepelak i sur., 2004).

1.2.8 Referentne vrijednosti

Serum/plazma	Djeca	274 – 305 mOsmol/kg
	Odrasli	280 – 300 mOsmol/kg

Urin 50 – 1200 mOsmol/kg *

* Referentni interval nedovoljan za interpretaciju nalaz urina popratiti s volumenom urina (http://www.hkmb.hr).

1.2.9 Hiperosmolalnost

Hiperosmolalnost seruma je povezana s nekim stanjima, kao što su:

- Dehidratacija, smanjeno uzimanje vode ili povećan gubitak
- Dijabetes melitus i dijabetes insipidus
- Bolesti bubrega, što uzrokuje povećanje koncentracije ureje u krvi
- Oštećenja mozga i smanjeno izlučivanje ADH
- Hipernatrijemija
- Cerebralne lezije
- Intoksikacija alkoholom (etanolom), metanolom, antifrizom (etilen glikolom) (Čepelak i sur., 2004).

1.2.10 Hipoosmolalnost

Hipoosmolalnost seruma povezana je sa stanjima, kao što su:

- Hiperhidracija, previše vode u organizmu
- Smanjeno uzimanje soli prehranom
- Gubitak natrija kod primjene diuretika
- Addisonova bolest
- Adrenogenitalni sindrom
- Sindrom neodgovarajućeg izlučivanja antidiuretskog hormona (SIADH) kod traume, karcinoma pluća (Čepelak i sur., 2004).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Osmolalnost se mjeri pomoću osmometra. Međutim, ne posjeduje svaki laboratorij uređaj za mjerenje te se u njima osmolalnost izračunava pomoću formula. U praksi postoji više metoda za izračunavanje osmolalnosti, a najčešće korištene su:

Metoda A $\mathbf{mOsmol/kg\ H_2O = 2 \times ([Na^+] + [K^+]) + [glukoza] + [ureja]}$

Metoda B $\mathbf{mOsmol/kg\ H_2O = 1.86 \times [Na^+] + [glukoza] + [ureja] + 9}$

Osmolalnost tjelesnih tekućina normalno iznosi 275–290 mOsmol/kg, a Na je glavna odrednica osmolalnosti seruma. Prividne promjene osmolalnosti mogu nastati zbog pogrešnog očitavanja Na ako se ne rabe ionski selektivne elektrode (ISE). Ako izmjerena osmolalnost premašuje procijenjenu za $\geq$10 mOsmol/kg H_2O, u plazmi se vjerojatno nalaze dodatne osmotski aktivne tvari (osmolarna praznina). To su najčešće alkoholi (etanol, metanol, izopropanol, etilen glikol), manitol i glicin. U prisutnosti alkohola povećava se izmjerena osmolalnost te ako je razlika između izračunate i izmjerene osmolalnosti > 15 (normalno 10-15) to je indirektno znak trovanja alkoholom (uz kliničku sumnju). Manitol, ingestija toksina (manitol, etilen glikol, izopropilni alkohol i polienglikol) mogu se detektirati, evaluirati te pratiti osmotskom prazninom. Rezultati osmolalnosti nisu dijagnostički, oni ukazuju da osoba ima neravnotežu, ali ne određuje uzrok.

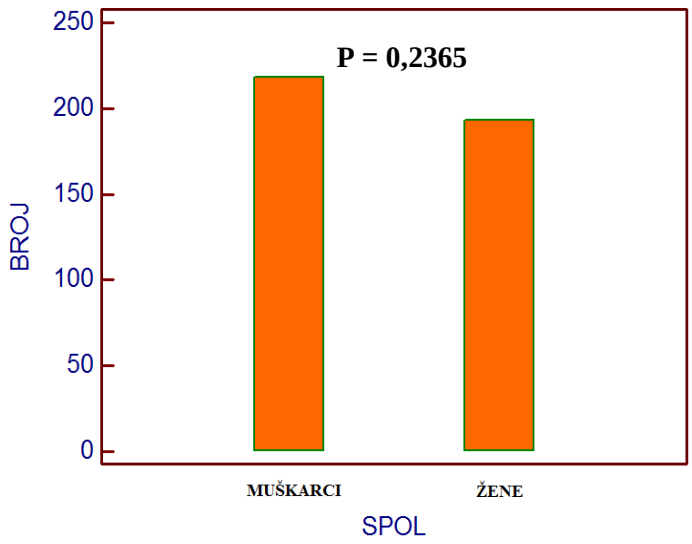
Cilj ovog istraživanja je izmjeriti osmolalnost pomoću osmometra sniženjem točke ledišta u uzorcima, zatim u istim uzorcima odrediti koncentraciju natrija, kalija, glukoze i ureje te izračunati osmolalnost pomoću metode A i metode B kako bismo međusobno usporedili dobivene vrijednosti tih triju metoda. Želimo provjeriti da li postoji dobra povezanost izmjerene osmolalnosti i izračunate pomoću metode A ili metode B. Zanima nas da li se mjerenje osmolalnosti može u potpunosti zamijeniti jednom od ovih metoda budući da svaki laboratorij ne posjeduje osmometar.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorci

U ovom istraživanju sudjelovalo je 411 ispitanika različite dobi. Uzorci su prikupljeni s različitih odjela KBC Sestre milosrdnice (gastroenterološka ambulanta, klinika za kožne bolesti, dojel za kirurgiju, za endokrinologiju, plućne bolesti, urologiju, onkologiju, nefrologiju, pedijatriju, kardiologiju, hematologiju, reanimatologija i intenzivno liječenje) ili su uzeti u ambulanti Kliničkog zavoda za kemiju (KZZK) za polikliničke pacijente u ranim jutarnjim satima. Pacijentima je uzeta epruveta krvi bez antikoagulansa u epruvetu s podtlakom (Greiner bio-one, Austrija). Nakon toga uzorci su centrifugirani u srednjoj laboratorijskoj centrifugi brzinom od 3500 okretaja/min, nakon čega je odvojen serum u kojem je izmjerena osmolalnost pomoću osmometra te koncentracije natrija, kalija, ureje i glukoze potrebne za izračun osmolalnosti prema metodi A i metodi B.

Slika 2. prikazuje podjelu ispitanika prema spolu. Za analizu podataka korišten je Chi-squerd test kojim se ispituje da li je ispitivana skupina ujednačena po spolu ili ne ($P<0,05$). Analizom podataka dobiveno je da je ispitivana skupina izjednačena po spolu ($P=0,2365$), sastojala se od 218 muškaraca i 193 žene različite dobi. Kriterij za uključivanje ispitanika je bio odsutnost intoksikacije tvarima koje mogu povećati osmolalnost tvari (etilen glikol, alkohol).



Slika 2. Podjela ispitanika prema spolu

3.2 Mjerenje osmotske koncentracije

3.2.1 Osmometar

Gonotec OSMOMAT model 030 Krioskopski osmometar je neinvazivni in-vitro dijagnostički sustav za mjerenje ukupne osmolalnosti vodene otopine, kao što su humana krv, urin, sperma i ostalih otopina uzoraka. Osmometar indirektno iskazuje broj otopljenih čestica u tekućini.

Ukupna osmolalnost se obično koristi u bolnicama ili ordinacijama za pomoć u dijaganosticiranju bolesti i/ili da se zatraži daljnje testiranje. Sustav se često koristi u farmaceutskoj industriji za testiranje različitih vodenih otopina (slane kupelji...) i za proces validacije rutinskih procesa (Uputstvo za upotrebu: Cryoscopic Osmometer, 2007).



Slika 3. Prikaz krioskopskog osmometra (preuzeto i modificirano s www.pintertrade.com)

3.2.2 Kalibracija instrumenta

Kalibraciju je u principu potrebno obaviti: jednom u tjedan do dva korištenja instrumenta. Učestalija kalibracija potrebna je ako će se mjeriti uzorci koji imaju osmolarnost puno drugačiju od one kojom je kalibriran aparat (instrument se kalibrira s osmolarnosti sličnom

mjerenim uzorcima). Ako se okolina promijenila (instrument premješten na drugu lokaciju, počela sezona grijanja....). Nakon bilo kakvih servisa. Jednom otvoren, standard bi se trebalo upotrijebiti u sljedećih dvadesetak minuta. Zbog isparavanja, kroz vrijeme mu se povećava koncentracija, a time i osmolarnost (Uputstvo za upotrebu: Cryoscopic Osmometer, 2007).

3.2.3 Mjerenje osmolalnosti

Osmotski tlak u serumu određivali smo krioskopskim osmometrom (Gonotec OSMOMAT Model 030 Cryoscopic Osmometer). To je neinvazivni *in-vitro* dijagnostički sustav za mjerenje ukupne osmolalnosti u humanim uzorcima. Osmometar indirektno iskazuje broj otopljenih čestica u tekućini.

Uzorak otopine hladi se pomoću Peltier-ovog sustava hlađenja, dok se temperatura elektronički prati. Kada uzorak otopine dosegne specifičnu temperaturu od -7°C ispod točke ledišta, injektira se iglom od nehrđajućeg čelika što dovodi do automatske kristalizacije. Igla predstavlja sekundarni sustav hlađenja koji se sastoji od malih kristala leda koji potječu od uobičajene vlage u zraku u prostoriji. Kada kristalizacija započne, spontano se formira led. Zatim temperatura sustava spontano raste što dovodi do porasta temperature uzorka do točke ledišta. Nakon kompletne kristalizacije temperatura se ponovno snižava (Uputstvo za upotrebu: Cryoscopic Osmometer, 2007; Meties, 1965).

3.2.4 Najčešće pogreške prilikom mjerenja

Spontana kristalizacija

Javlja se nakon spuštanja mjerne glave, a prije inokulacije uzorka ledom; u fazi hlađenja kad je temperatura manja od 0°C, ali nije još dostigla -7°C. Spontanu kristalizaciju u 90% slučajeva uzrokuje mjehurić zraka u uzorku, ili zalutala nečistoća - zrnce prašine, prljava sonda. Može još biti uzrokovana vibracijama (je li instrument na mirnoj podlozi), oštećenjem mjerne sonde (provjerite povećalom), ili je uzrok u samom uzorku.

Nema kristalizacije

Javlja se ako se uzorak nije smrznuo niti nakon inokulacije ledom. Najčešći uzrok je u gornjem sistemu hlađenja (hlađenje igle za inokulaciju uzorka kristalićem leda), podignite pokrov i pogledajte ima li leda na igli. Na njoj bi normalno trebalo biti malo leda:

- ako ga nema uopće, vjerojatno je zrak vrlo suh – ostavite pokrov malo otvoren i/ili huknite na iglu
- ako se nakupilo previše leda (instrument radi satima, ili je velika vlažnost zraka u okolišu), ugasite instrument na dvije-tri minute da se led otopi, pa dobro osušite otvor za iglu (kanal kroz koji igla prolazi do uzorka) propuhivanjem zrakom iz prazne šprice, komadićem suhe staničevine i pincetom i slično
- provjerite radi li igla kako treba – podignite pokrov, promatrajte iglu i pritisnite gumb „NEEDLE“ sa stražnje strane instrumenta

Uzrok još može biti vrlo visoka temperatura okoline, pa instrument ne uspijeva ohladiti uzorak na -7°C; prašina u instrumentu onemogućava normalno hlađenje; instrument je postavljen tako da su mu pokriveni ventilacijski otvori. Sam uzorak ima preveliku osmolarnost (>3000 mOsmol/L), odnosno prenisku temperaturu ledišta. U tom slučaju jedina je mogućnost razrjeđenje uzorka.

Nepreciznost rezultata

Najčešći uzrok je u nepravilnom spuštanju mjerne glave s kiveticom – previše nježno je spuštena. Ona mora do kraja sjesti u ležište. Koriste se rabljene čašice (čak ako se koriste i one u kojima je bila samo voda). Nedovoljno dobro čišćenje sonde između mjerenja, ili vlažna sonda. Nepreciznost rezultata se javlja i kada sonda nije centrirana ili je oštećena te kada uzorak nije homogen (Uputstvo za upotrebu: Cryoscopic Osmometer, 2007).

3.3 Izračunavanje osmolalnosti

U Kliničkom zavodu KBC Sestre milosrdnice uzorci su centrifugirani i u serumu određeni natrij, kalij, glukoza i ureja. Koncentracije navedenih analita u svim serumima određivane su na biokemijskom analizatoru AU680 (Beckman Coulter, SAD) i s pripadajućim originalnim reagensima istog proizvođača. U nastavku teksta navedene su metode određivanja analita na biokemijskom analizatoru AU680, korištene u ovom istraživanju:

1) Određivanje natrija i kalija u serumu

Koncentracije natrija i kalija u humanom serumu određuju se indirektnom potenciometrijom na ISE-ma na Beckman Coulter analizatoru.

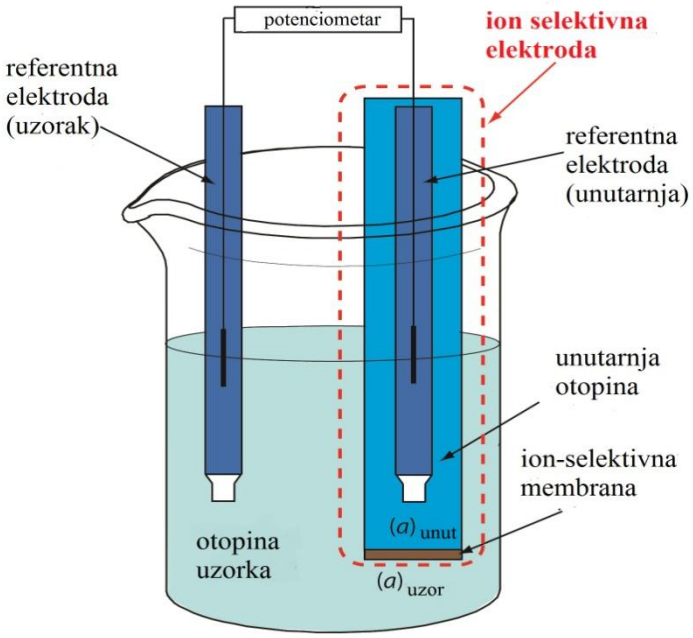
Načelo reakcije:
Beckman Coulter ISE modul za natrij i kalij koristi zasebne elektrode sa selektivnim membranama specifičnim za navedene ione.

Potenciometrija je jedna od preporučenih metoda za određivanje koncentracije natrija i kalija. Određuje se razlika elektrokemijskog potencijala između staklene membranske elektrode i referentne elektrode, koja je razmjerna koncentraciji natrijevih/kalijevih iona u serumu (plazmi, mokraći, likvoru). Na ovom principu rade mnogobrojni analizatori za određivanje Na^+ i K^+. ISE za natrij izrađena je od specifičnog stakla koje sadržava 11% Na_2O, 18% Al_2O_3 i 71% SiO_2, a kao referentna elektroda služi Ag-AgCl elektroda. ISE za kalij izrađena je od stakla koje sadržava 68% SiO_2, 27% Na_2O i 5% Al_2O_3, a kao referentna elektroda služi Ag-AgCl elektroda. Elektroda ima 5000 puta veću selektivnost za K^+ nego za Na^+, a također je selektivna za K^+ i prema H^+ i dvovalentnim kationima. Danas se upotrebljavaju elektrode koje na površini imaju antibiotik valinomicin, koji propušta samo kalijeve ione. Određivanje ometaju proteini seruma, pa proizvođači takvih elektroda i već postojećih analizatora nastoje na razne načine smanjiti tu interferenciju. Određuje se potencijal kalibratora, a omjer između razlike potencijala i logaritamske koncentracije ($\Delta E/\Delta \log$ koncentracije) pohranjuje se u memoriju mikroprocesora kao čimbenik za izračunavanje nepoznate koncentracije natrija i kalija nakon što se izmjeri njihov potencijal. Dvije su vrste potenciometrijskih metoda: direktna i indirektna. U direktnoj potenciometriji, uzorak nije potrebno razrjeđivati, a u indirektnoj uzorak se u mjernoj kiveti miješa s diluentom velike ionske jakosti. Kod indirektne potenciometrije potrebno je razrjeđivanje uzorka iz dvaju razloga: kako bi se dobilo dovoljno ukupnog uzorka (uz malu količinu seruma) koji može oplahivati relativno veliku površinu elektrode te kako bi se smanjila koncentracija proteina na površini elektrode (Štraus, 2009; Thomas, 1998; Burtis, 2008).

ISE su elementi višefaznog sustava koji omogućuju potenciometrijsko određivanje nekog iona „i“ u otopini, u prisutnosti drugih iona. ISE se mogu dizajnirati za svaku ionsku speciju te su vrlo pogodne za selektivno i kontinuirano praćenje aktiviteta iona (a ne

koncentracija) u otopini bez utjecaja na tu otopinu. To je korisno kod bioloških ispitivanja jer biološki procesi ovise ustvari o aktivitetima.

ISE članak je elektrokemijski članak izgrađen od ion-selektivne elektrode (elektroda čiji se potencijal mijenja) i vanjske referentne elektrode (elektroda čiji je potencijal stalan), obje elektrode povezane su voltmetrom (mjeri razliku potencijala između ion-selektivne elektrode i referentne elektrode) i u kontaktu su s otopinom uzorka.



Slika 4. Prikaz ISE (Preuzeto s http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/11_Electrochemical_Methods/11B%3A_Potentiometric_Methods)

Selektivnim prijenosom određivanog iona "i" iz otopine uzorka u membranu ISE stvara se razlika potencijala između unutarnje otopine i otopine uzorka (dvije elektrolitne faze). Aktivni ioni (selektivni ioni) u većem broju prelaze iz faze s većim aktivitetom u fazu s manjim aktivitetom. Brzina prijelaza aktivnih iona ovisi o razlici potencijala koji na taj način nastaje (razlika potencijala utječe na brzinu iona, ioni koji difundiraju iz faze s većim aktivitetom putuju brže od iona koji difundiraju iz faze s manjim aktivitetom). Kada je razlika potencijala tolika da uzrokuje iste brzine prijelaza aktivnih iona, uspostavlja se dinamička ravnoteža. Tu ravnotežnu razliku potencijala nazivamo Donnanov potencijal. Difuzijski

potencijal je razlika u brzini difuzije iona između dvije elektrolitne faze (unutarnje otopine i otopine uzorka) kroz graničnu površinu (http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/11_Electrochemical_Methods/11B%3A_Potentiometric_Methods).

Razlika potencijala na membrani (E_m), pri kojoj je uspostavljena dinamička ravnoteža na graničnoj površini, iskazuje se relacijom:

$$E_m = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{a_j}{a_{j,r}}$$

Gdje je:

a_j – aktivitet aktivnih iona na jednoj strani membrane,

$a_{j,r}$ – aktivitet istih iona na drugoj strani membrane,

z_j – naboj aktivnih iona,

F – Faradeyeva konstanta (96487 $Cmol^{-1}$),

R – opća plinska konstanta (8.314 $JK^{-1}mol^{-1}$),

T – temperatura (K).

Pretpostavimo li da je $a_{j,r}$ konstantan, onda E_m ovisi samo *o* a_j i iskazan je relacijom

$$E_m = E° + \frac{RT}{z_j F} \ln a_j$$

(E° - standardni potencijal ISE)

Potencijal membrane iskazan je relacijom istog oblika kao što je Nernstova jednadžba za redoks sustav, ali se potencijal uspostavlja na drugačiji način od onog za metalnu elektrodu, zbog toga kažemo da ima Nernstov odziv.

Pomoću voltmetra koji mjeri razliku potencijala između vanjske referentne elektrode i potencijala na membrani od strane „selektiranog“ iona određuje se neto naboj čija je veličina izravno proporcionalna koncentraciji selektiranog iona.

Membranski potencijal predstavlja sumu potencijala na granici faza: potencijal na granici faza otopina analita/membrana + potencijal na granici faza unutarnja referentna

otopina/membrana (konstantan) + difuzijski potencijal unutar membrane (može se smatrati zanemarujuće malim i konstantnim pod određenim uvjetima, kada u membrani nema koncentracijskog gradijenta). Ukoliko je koncentracija primarnih iona u unutarnjoj otopina konstantna tada potencijal unutarnje referentne elektrode (uronjena je u unutarnju referentnu otopinu koja sadrži stalnu koncentraciju određenog iona) možemo smatrati konstantnim i membranski potencijal ovisi samo o potencijalu na granici faza otopina analita/membrana (možemo primijeniti Nernstov izraz).

Ionsko-selektivna membrana ključna je komponenta svih potenciometrijskih senzora. Ona omogućava prepoznavanje točno određenog analita u uzorku. Ukoliko ioni mogu prijeći preko granice faza, tada dolazi do uspostave elektrokemijske ravnoteže, ali s različitim potencijalima u fazama.

Međutim, u praksi nema idealno selektivnih elektroda, nego na njihov potencijal u određenoj mjeri utječe i prisutnost drugih iona u otopini (Bhttp://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/11_Electrochemical_Methods/11B%3A_Potentiometric_Methods; Burtis, 2008).

2) Određivanje glukoze

Metoda za određivanje glukoze u plazmi je UV – fotometrijska metoda s heksokinazom (HK) i glukoza-6-fosfat dehidrogenazom (G-6-PDH) (Štraus, 2009).

Princip:

Glukoza u prisutnosti ATP-a djelovanjem HK i Mg^{2+} fosforilira u glukoza-6-fosfat, a ovaj se djelovanjem G-6-PDH i $NADP^+$ oksidira u 6-fosfoglukonat. Mjeri se povećanje koncentracije NADPH na 340 nm što je proporcionalno koncentraciji glukoze:

$$\text{glukoza} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glukoza-6-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{glukoza-6-fosfat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-fosfoglukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

3) Određivanje ureje

Metoda za određivanje ureje u serumu jest UV-spektrofotometrijska metoda s enzimom glutamat-dehidrogenazom (GLDH) (Štraus, 2009).

Princip:

Ureja se hidrolizira ureazom, a nastali amonijak reagira s 2-α-ketoglutarnom kiselinom uz katalitičko djelovanje GLDH-a i koenzima NADH. Pri tome nastaju glutaminska kiselina i NAD. Pad apsorpcije zbog oksidacije reduciranog NADH razmjeran je prisutnosti NH_3 oslobođenom iz ureje:

$$2 \text{ ureja} + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{ureaza}} (NH_4)_2CO_3$$

$$2\text{-α-ketoglutarna kiselina} + 2\ NH_4^+ + NADH + H^+ \xrightarrow{GLDH} 2 \text{ glutaminska kiselina} + 2\ NAD^+ + 2H_2O$$

Izmjerenje vrijednost natrija, kalija, glukoze i ureje primjenjuju se za izračunavanje osmolalnosti prema dolje navedenim metodama:

Metoda A $mOsmol/kg\ H_2O = 2\ x\ ([Na^+] + [K^+]) + [glukoza] + [ureja]$

Metoda B $mOsmol/kg\ H_2O = 1.86\ x\ [Na^+] + [glukoza] + [ureja] + 9$

3.4 Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 15.6 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Korištenjem deskriptivne analize prikazani su dobiveni podaci, a skupovi podataka ispitani su Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom na normalnost raspodjele.

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije *rho* prema Coltonu

KOEFICIJENT KORELACIJE (*rho*)	**POVEZANOST**
0 do ±0,25	nema povezanosti
± 0,26 do ± 0,50	slaba povezanost
± 0,51 do ± 0,75	umjerena do dobra povezanost
± 0,76 do ± 1	dobra do izvrsna povezanost

Ako distribucija podataka ne bude slijedila Gaussovu raspodjelu koristit ćemo neparametrijske testove te podatke opisivati medijanom i rasponom izmjerenih vrijednosti. Za ispitivanje povezanosti varijabli koja govori o njihovoj povezanosti korišten je statistički postupak po Pearson/Spearmanu za parametrijske, odnosno neparametrijske testove s pripadajućim koeficijentom korelacije *rho* i njegovom statističkom značajnošću P. Koeficijente korelacije tumačili smo prema Coltonu (Tablica 1.). Modelom linearne regresije procjenjivali smo ovisnu varijablu prema predikcijskoj na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Koeficijentom determinacije (R^2) utvrđivali smo u kojoj je mjeri matematički model primjenjiv za predviđanje ovisne varijable. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom histograma kojim se može primijetiti da raspodjela podataka ne slijedi Gaussovu krivulju, zatim, pravcem linearne regresije s pripadajućom jednadžbom $y = a + bx$, gdje „a“ predstavlja odsječak na osi y na kojem pravac siječe ordinatu, a „b“ nagib pravca, tj. porast na osi y za jedinični porast na osi x, uz naznačene granice pouzdanosti od 95% i granice predviđenih vrijednosti od 95%.

Za usporedbu dvije varijable korišten je neparametrijski Mann-Whitney test, za utvrđivanje postojanja statistički značajne razlike između varijabli izmjerene osmolalnosti i izračunate prema metodi A i metodi B korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test.

Metodom multiple regresije postavljen je matematički model za procjenu osmolalnosti na temelju nezavisne 4 varijable.

Svi rezultati interpretirat će se na na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4 REZULTATI

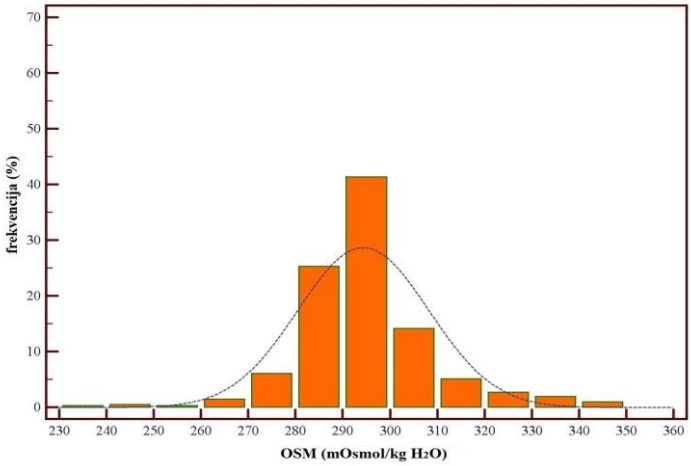
4.1 Frekvencija ispitanika po spolu

Skupina od 411 ispitanika različite dobi imala je ujednačen udio muškaraca (N=218) i žena (N=193) kako je prikazano na Slici 2.

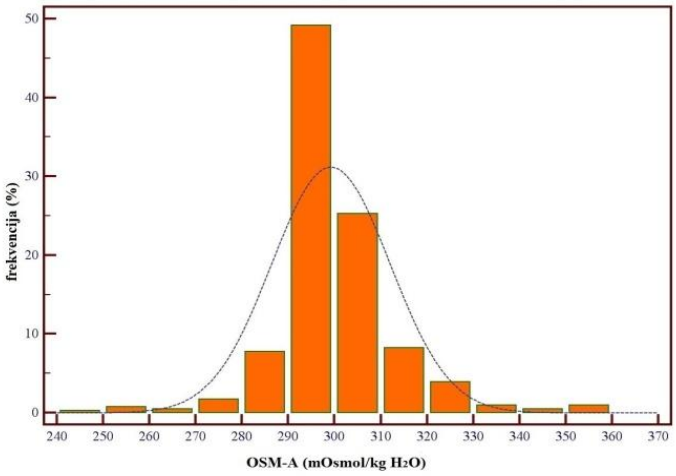
4.2 Deskriptivna statistika ispitivanih uzoraka

U Tablici 2. prikazani su statistički podaci za izmjerene koncentracije glukoze, natrija, kalija i ureje, izmjerena osmolalnost, izračunate osmolalnosti prema metodi A (OSM-A) i metodi B (OSM-B) sa pripadajućim srednjim vrijednostima ($\bar{x}$), standardnim devijacijama (SD), medijanom, intervalima pouzdanosti te najnižom i najvišom koncentracijom (minimumom i maksimumom). Također je naveden i ukupan broj i dob ispitanika. Sve rezultate interpretirali smo na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Dobivene P vrijednosti pokazuju nenormalnu distribuciju za sve varijable.

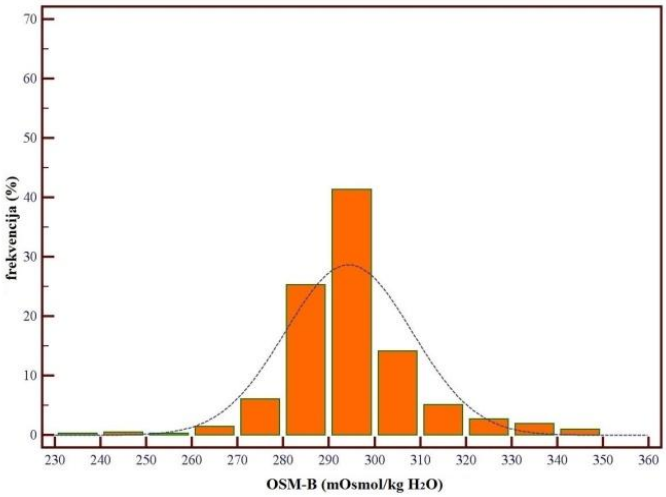
Distribucija osmolalnosti izmjerene pomoću osmometra i izračunate prema metodi A i metodi B prikazana je histogramima na Slikama 3., 4. i 5. Uz frekvenciju (%) prikazano je da distribucija osmolalnosti ne slijedi Gaussovu krivulju što dokazuje vrijednost $P<0,0001$ (Tablica 2.)



Slika 3. Histogram distribucije izmjerene osmolalnosti (OSM)



Slika 4. Histogram distribucije izračunate osmolalnosti prema metodi A (OSM-A)



Slika 5. Histogram distribucije izračunate osmolalnosti prema metodi B (OSM-B)

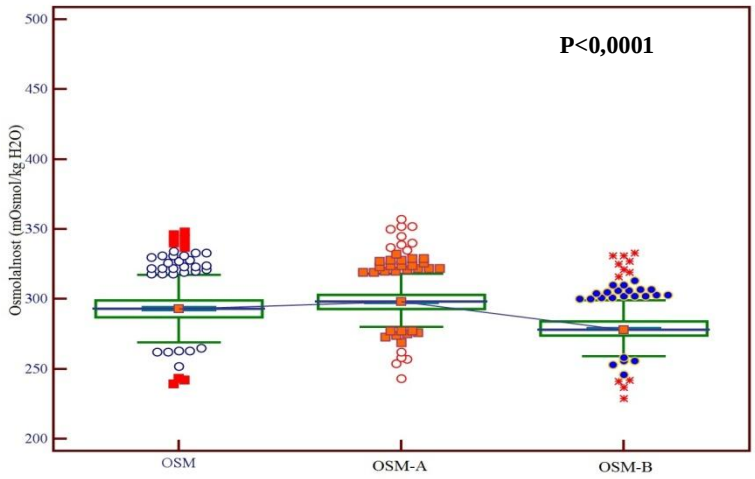
Tablica 2. Prikaz izmjerenjh koncentracija glukoze, kalija, natrija, ureje i osmolalnosti te izmjerene osmolalnosti prema metodi A i B

	N	$\bar{x}$	95% Cl	SD	Medijan	95% Cl	Min	Max	25 – 75 P	P
DOB (godine)	411	60,0	58,16 – 61,81	18,82	64,0	63,00 – 66,00	0,0	91,0	50,00 – 74,00	< 0,0001
GLUKOZA (mmol/L)	411	6,0	5,82 – 6,28	2,39	5,4	5,34 – 5,56	1,8	27,6	4,92 – 6,37	< 0,0001
KALIJ (mmol/L)	411	4,4	4,36 – 4,47	0,57	4,3	4,28 – 4,39	3,0	7,0	4,03 – 4,68	< 0,0001
NATRIJ (mmol/L)	411	137,8	137,33 – 138,20	4,49	138,0	138,00 – 138,00	111,0	155,0	136,00 – 140,00	< 0,0001
UREJA (mmol/L)	411	8,8	8,02 – 9,53	7,80	5,8	5,40 – 6,20	1,2	44,1	4,40 – 9,08	< 0,0001
OSM (mOsmol/kg H_2O)	411	294,3	292,93 – 295,62	13,90	293,0	292,00 – 294,00	239,0	348,0	287,00 – 299,00	< 0,0001
OSM-A (mOsmol/kg H_2O)	411	299,2	297,95 – 300,43	12,80	298,0	297,00 – 298,00	243,0	357,0	293,00 – 303,00	< 0,0001
OSM-B (mOsmol/kg H_2O)	411	280,1	278,90 – 281,23	11,99	278,0	278,00 – 279,00	229,0	333,0	274,00 – 284,00	< 0,0001

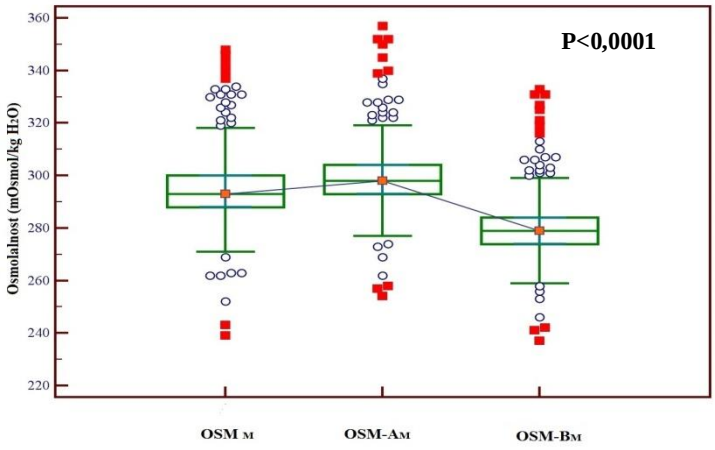
OSM – izmjerena osmolalnost; OSM-A – osmolalnost izračunata prema metodi A; OSM-B – osmolalnost izračunata prema metodi B; N – ukupan broj uzoraka; $\bar{x}$ – srednja vrijednost; 95% Cl – 95% ineterval pouzdanosti; SD – standardna devijacija; Min – najniža vrijednost; Max- najviša vrijednost; 25 – 75 P raspon veličina varijabli od 25 do 75 percentile; P – testiranje normalnost distribucije

4.3 Usporedba metoda

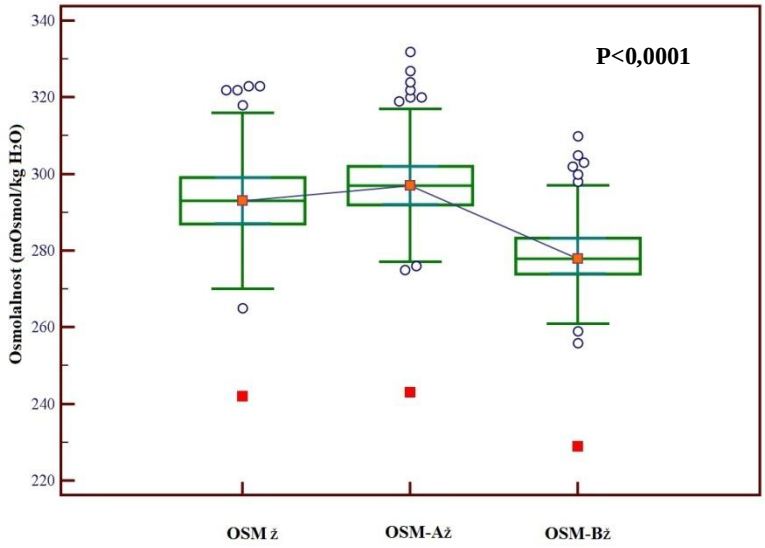
Usporedbom vrijednosti izmjerene osmolalnosti i osmolalnosti izračunate metodom A i metodom B pomoću Kruskal-Walis testa (neparametrijski test) dobiveno je da postoji značajna razlika između svih metoda (P<0,0001). Usporedili smo vrijednosti dobivene izračunom metodom A i metodom B sa izmjerenim vrijednostima za sve uzorke i posebno po spolu. Dobiveni rezultati pokazali su da se metode međusobno značajno razlikuju te da se one ne mogu međusobno uspoređivati. Na slikama 6., 7. i 8. vidljiva je razlika među metodama.



Slika 6. Usporedba triju različitih metoda za osmolalnost za sve ispitanike
(OSM – izmjerena osmolalnost; OSM-A – osmolalnost izračunata prema metodi A; OSM-B- osmolalnost izračunata prema metodi B)



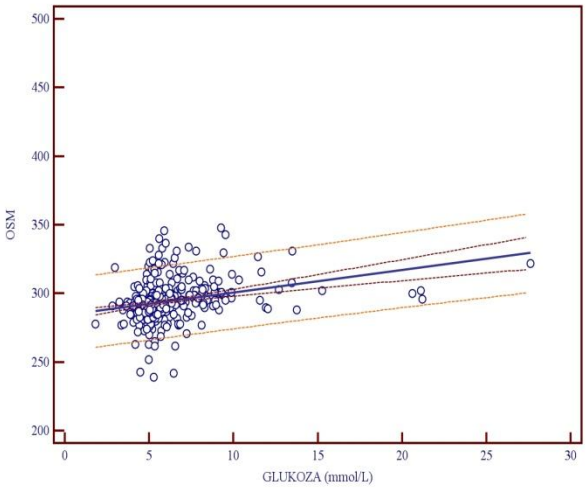
Slika 7. Usporedba triju različitih metoda za osmolalnost za muške ispitanike
(OSM_M – izmjerena osmolalnost za muškarce; OSM-A $_M$ – osmolalnost izračunata prema metodi A za muškarce; $OSM\text{-}B_M$- osmolalnost izračunata prema metodi B za muškarce)



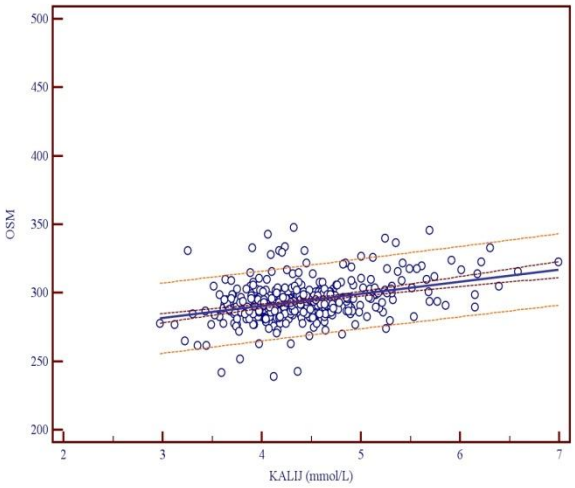
Slika 8. Usporedba triju različitih metoda za osmolalnost za ženske ispitanike
($OSM_{Ž}$ – izmjerena osmolalnost za žene; $OSM\text{-}A_{Ž}$ – osmolalnost izračunata prema metodi A za žene; $OSM\text{-}B_{Ž}$- osmolalnost izračunata prema metodi B za žene)

4.4 Korelacija varijabli izračunate osmolalnosti s izmjerenom osmolalnosti

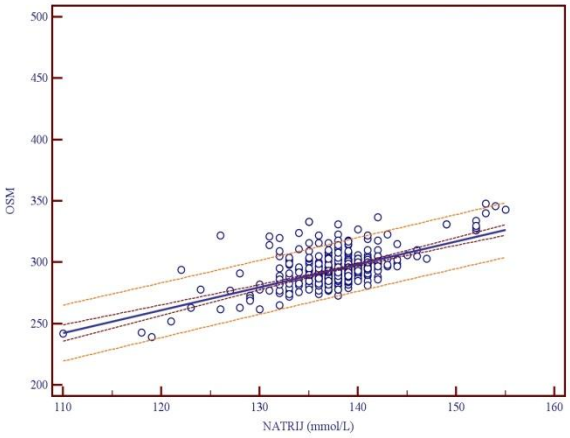
Niže navedene slike 9., 10., 11. i 12. prikazuju korelaciju pojedine varijable (koncentracije glukoze, koncentracije kalija, koncentracije natrija i koncentracije ureje) s izmjerenom osmolalnosti plazme matematičkim modelom linearne regresije. Na slikama narančastim crtama označen je interval prediktivnosti, ljubičastim crtama interval pouzdanosti, a središnja plava crta je pravac regresije. Koeficijent korelacije *rho* kao mjera povezanosti osmolalnosti plazme s koncentracijom glukoze (*rho*=0,373), koncentracijom kalija (*rho*=0,306) i koncentracijom natrija (*rho*=0,411) ocijenjeni su slabima (prema Coltonu). Premda su statistički značajni uz P<0,0001, snaga je povezanosti slaba. Međutim, dobivena je dobra korelacija s koncentracijom ureje (*rho*=0,649). Interpretacijom prema statističkoj značajnosti $P < 0,05$ dobili smo da su naši rezultati statistički značajni jer su naše vrijednosti $P < 0,0001$. Usprkos dobroj korelaciji koncentracije ureje s osmolalnosti plazme ni jednoj pojedinačnoj varijabli ne možemo pripisati snažan proporcionalni utjecaj na izmjereni osmotski tlak.



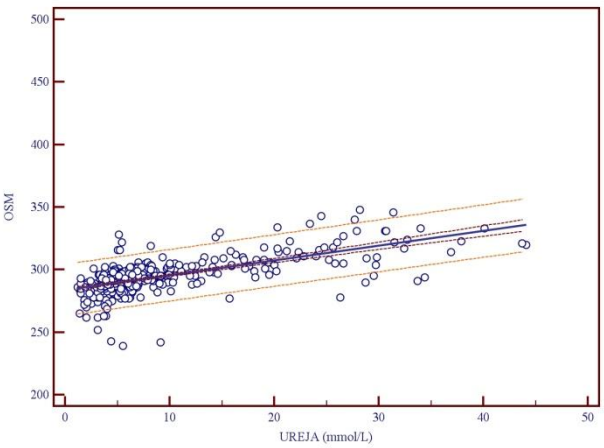
Slika 9. Povezanost koncentracije glukoze s osmolalnosti; *rho* = 0,373; P < 0,0001



Slika 10. Povezanost koncentracije kalija s osmolalnosti; *rho* = 0,306; P < 0,0001



Slika 11. Povezanost koncentracije natrija s osmolalnosti; *rho*=0,411; P<0,0001



Slika 12. Povezanost koncentracije ureje s osmolalnosti; *rho*=0,649; P<0,0001

4.5 Prijedlog novog matematičkog modela za procjenu osmolalnosti

Nakon statističke obrade podataka vidjeli smo da metodu A, a ni metodu B ne možemo uspoređivati s mjerenje osmolalnosti jer se one značajno razlikuju te smo statističkom metodom multiple regresije napravili matematički model koji će uključivati sve četiri varijable koje su prisutne i u metodi A i metodi B. U Tablici 3. prikazani su statistički podaci za izmjerenu osmolalnost (OSM-A) i osmolalnost izračunatu prema regresijskom modelu (OSM-C).

Regresijska jednadžba za izračun osmolalnosti na temelju koncentracija glukoze, kalija, natrija i ureje:

$$\textbf{OSM-C (mOsmol/kg } H_2O\textbf{) = 14,81+1,35[glukoza]+2,31}[K^+]\textbf{+1,83}[Na^+]\textbf{+1,024[ureja]}$$

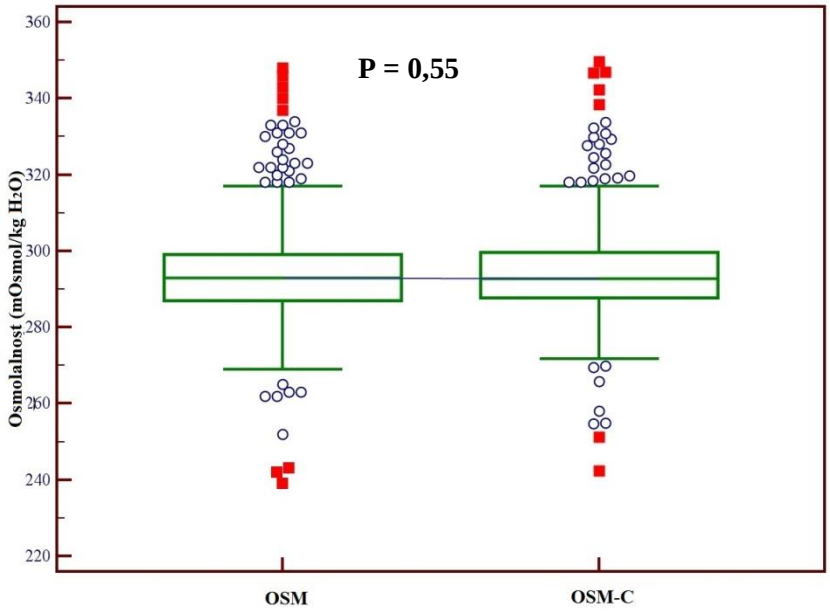
Koncencentracija glukoze, ureje, Na^+ i K^+ izražene su u mmol/L.

Tablica 3. Prikaz vrijednosti izmjerene osmolalnosti i osmolalnosti izračunate prema regresijskom modelu

	OSM (mOsmol/kg H_2O)	OSM-C (mOsmol/kg H_2O)
N	411	411
$\bar{x}$	294,3	294,9
95% Cl od $\bar{x}$	292,93 – 295,62	293,64 – 296,14
SD	13,90	12,92
Medijan	293,0	292,8
95% Cl od medijana	292,00 – 294,00	292,13 – 293,86
Min	239,0	242,3
Max	348,0	349,6
25-75 P	287,00 – 299,00	287,04 – 301,60
P	< 0,0001	< 0,0001

OSM – izmjerena osmolalnost; OSM-C – osmolalnost izračunata prema regresijskom modelu; N – ukupan broj uzoraka; $\bar{x}$ – srednja vrijednost; 95% Cl – 95% ineterval pouzdanosti; SD – standardna devijacija; Min – najniža vrijednost; Max- najviša vrijednost; 25 – 75 P raspon veličina varijabli od 25 do 75 percentile; P – testiranje normalnosti distribucije

Vrijednosti osmolalnosti dobivene novom metodom također pokazuju nenormalnu raspodjelu, tj. ne slijede Gaussovu krivulju. Mann-Whitney test za statističku usporedbu dviju različitih metoda pokazao je da nema značajne razlike između mjerene osmolalnosti i one dobivene izračunom na temelju multiple regresije (P = 0,55). Na Slici 14. jasno je prikazano da ne postoji značajna razlika između ove dvije metode.



Slika 14. Usporedba dviju metoda (izmjerene osmolalnosti (OSM) i osmolalnosti izračunate prema regresijskom modelu (OSM-C))

5 RASPRAVA

Osmolalnost plazme najvažniji je parametar za procjenu unutarnje ravnoteže vode u organizmu. Raspodjela vode između unutarstanične i izvanstanične tekućine ovisi o razlici koncentracija različitih čestica (iona i molekula) s jedne i s druge strane stanične membrane. Poznato je da su podaci osmolalnosti plazme dobiveni računom često toliko informativni kao i sama izmjerena osmolalnost iako se one međusobno razlikuju, tj. izračunata osmolalnost dobivena zbrajanjem koncentracija pojedinih tvari koje utječu na osmolalnost je manja od izmjerene osmolalnosti. Za izračunavanje je predloženo više različitih više ili manje složenih metoda, najčešće se primjenjuju dvije.

Metoda A $\text{mOsmol/kg } H_2O = 2 \times ([Na^+] + [K^+]) + [\text{glukoza}] + [\text{ureja}]$

Metoda B $\text{mOsmol/kg } H_2O = 1{,}86 \times [Na^+] + [\text{glukoza}] + [\text{ureja}] + 9$

Metoda A svoje temelje pronalazi u činjenici da hidratacija stanica ovisi o osmotskoj razlici između unutarstanične i izvanstanične tekućine, a razlike hidrostatskih tlakova su zanemarive. U normalnom stanju unutarstanična osmolalnost u stanicama, koja uglavnom potječe od kalija i njemu pridruženih aniona, ista je kao u izvanstaničnoj tekućini, u kojoj najviše potječe od natrija i s njime udruženih aniona, pa ukupno nema prolaza vode ni u stanice ni iz njih. Koncentracija kalija i natrija množe se sa 2 jer su s njima udruženi anioni, pretpostavlja se da su soli potpuno ionizirane.

Budući da u normalnom organizmu oko 90% ukupne osmolalnosti plazme potječe od natrija i aniona koji ga prate, mijenja se hidratacija stanica pri brzim promjenama koncentracije natrija. Porast izaziva dehidrataciju stanica, a pad prekomjernu hidrataciju, ako u koncentracijama drugih otopljenih tvari nema značajnih promjena.

Ureja i glukoza pri normalnim koncentracijama vrlo malo utječe na osmolalnost palzme. Ali u teškoj uremiji ili hiperglikemiji mogu se koncentracije ovih spojeva i petnaesterostruko povećati i tada mogu značajno utjecati. Za kliničara je osmolalnost plazme, izračunana iz koncentracije natrija, kalija, ureje i glukoze, uz uvažavanje navedenih faktora, barem tako korisna kao samo mjerenje osmolalnosti plazme. Osim toga, račun ima prednost da se često može ustanoviti koja je tvar izazvala osmotsku promjenu (Zilva i sur., 1992).

Metoda B je empirijska jednadžba dobivena metodom regresijske analize i kao rješenje dobiven je korekcijski faktor 1,86 za Na^+ (nagib za odnos koncentracije Na^+ u mmol/L i izračunate osmolalnosti) i +9 za cijelu jednadžbu. Jednadžba je validirana usporedbom izračunate osmolalnosti sa izmjerenom osmolalnosti. Srednja razlika (vrijednost) je približno

nula, a standardna devijacija od srednje vrijednosti je ~6 mmol/kg. Što se tiče primjene koncentracija natrija, kalija, glukoze i ureje u izračunavanju osmolalnosti razlozi su isti kao i u metodi A (Burtis, 1994).

Znamo da je računom dobiven podatak osmolalnosti vrlo blizak pravoj osmolalnosti, međutim nas je zanimalo kolika je ta razlika i koja od ovih dvije najčešće primjenjivanih metoda daje rezultate bliže pravima jer svaki laboratorij ne posjeduje osmometar za mjerenje.

U ovom istraživanju odlučili smo usporediti rezultate osmolalnosti dobivene pomoću ove dvije metode s pravom izmjerenom osmolalnosti i provjeriti da li se mjerenje može u potpunosti zamjeniti izračunom.

U istraživanju smo imali grupu od 411 ispitanika ujednačenu po spolu. Prilikom izračuna primijetili smo da postoje razlike među metodama, tj. one se razlikuju u varijablama koje koriste, u metodi A uz koncentraciju natrija, glukoze i ureje koristi se još i koncentracija kalija. Također smo uočili da su vrijednosti osmolalnosti dobivene metodom A kod koje se prilokom izračuna uzima u obzir i koncentraciju kalija veće od izmjerenih i dobivenih izračunom po metodi B, a vrijednosti dobivene metodom B su najniže. Analizom podataka dobiveno je da postoji značajna razlika između metoda te da se one međusobno ne mogu uspoređivati.

Zatim smo odlučili provjeriti da li postoji kakva povezanost između pojedinih nezavisnih varijabli i osmolalnosti serumu. Dobiveno je postoji dobra korelacija (*rho* = 0,649) između osmolalnosti plazme i koncentracije ureje u plazmi, međutim nijedna od varijabli sama ne utječe proporcionalno na osmotski tlak.

Kako smo analizom podataka dobili da se metode ne mogu međusobno uspoređivati, zapitali smo se kakve bismo vrijednosti osmolalnosti dobili da imamo neku drugu, posve novu metodu koja će uključivati sve nezavisne relevantne varijable tj. one koje statistička analiza multiplom regresijom nađe značajnijima. Analiza je pokazala da sve 4 varijable pridonose značajno modelu te da ih valja uvrstiti u polinom s pripadajućim koeficijentima koji se značajno razlikuju od 0 ($P<0,0001$). Rezultati dobiveni novom predviđenom metodom veoma su slični pravoj izmjerenoj osmoloalnosti (koeficijent determinacije $R^2=0,8368$). Analizom podataka dobiveno je da nema značajne razlike između nove predviđene metode i metode mjerenja osmolalnosti ($P = 0,55$) što se vidljivo i na Slici 14. Uzeći u obzir i one dvije prethodne metode za izračun, najbolje slaganje sa mjerenim vrijednostima ima naša nova metoda koja u obzir uzima varijable obiju metoda, a to su: koncentracija natrija, koncentracija kalija, koncentracija glukoze i koncentracija ureje u plazmi.

Još uvijek ne postoji idealna metoda koja bi se mogla usporediti s mjerenje osmolalnosti, ali izračunavanje osmolalnosti daje dovoljno dobre rezultate za procjenu unutarnje ravnoteže vode. Međutim, kod određenih stanja potrebno je uz izračunatu osmolalnost također i izmjeriti pravu osmolalnost kako bi se izračunala osmotska praznina (mjerena osmolalnost – izračunata osmolalnost) koja daje bolju uvid u stanje organizam. Metode za izračun ne uzimaju u obzir i ostale tvari koje mogu utjecati na povećanje osmolalnosti plazme kao što je to slučaj kod intoksikacije alkoholom. U takvim slučajevima od iznimne je važnosti izmjeriti pravu osmolalnost plazme, a ne izračunati jer se može raditi o životu ili smrti.

U literaturi nismo našli sličnih pokušaja da se iznađe nova empirijska jednadžba za osmolalnost te ne možemo naše rezultate uspoređivati s ostatkom znanstvene i stručne zajednice.

6 ZAKLJUČCI

1. Postojeći matematički modeli koji uvršatavaju izmjerene koncentracije molekula koje u najvećoj mjeri pridonose osmolalnosti koriste se u rutinskim laboratorijima.
2. Usporedbom izmjerene osmolalnosti krioskopskom metodom na 411 uzoraka seruma s matematičkom formulom A (2 x ($[Na^+]$+ $[K^+]$) + [glukoza] + [ureja]) i formulom B (1.86 x $[Na^+]$ + [glukoza] + [ureja] + 9) našli smo statistički značajne razlike.
3. Metode se međusobno ne mogu usporediti, što znači da ni jedan model ne može nadomjestiti izravno mjerenje osmolalnosti jer se se značajno razlikuju od prave mjerene osmolalnosti plazme.
4. Metodom A precijenjena je istinska koncentracija, a metodom B je podcijenjena.
5. Glukoza, te ioni K i Na kao izdvojene varijable nisu pokazale značajnu povezanost s izmjerenim osmotskim tlakom pa ni proporcionalno ni linearno ne utječu samostalno na izmjereni osmotski tlak. Najbolju povezanost pokazala je ureja (*rho*=0,649, P<0,0001) što znači da proporcionalno koncentraciji pravilno pozitivno pridonosi osmolalnosti seruma.
6. Multiplom regresijskom analizom izvedena je jednadžba kao polinom u kojem su značajnost pokazale sve četiri varijable – glukoza, ureja i ioni K i Na. Jednadžba se mora validirati na drugoj velikoj skupini ispitanika da bi se utvrdila njezina valjanost.
7. U slučajevima intoksikacije tvarima koje povisuju osmolalnost plazme (npr. aceton, etanol, metanol, izopropanol, etilen glikol) ne zadovoljava ni jedan model. Nenadomjestivo je mjerenje osmolalnosti jer izračunavanje na temelju fizioloških molekula ne detektira toksične molekule. Mjerenje osmolalnosti i izračunavanje osmolalne praznine potrebno je u otkrivanju takvih patoloških stanja.

7 LITERATURA

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, str. 1443-1444.
2. Burtis CA, Ashwood ER., Bruns DE. Electrochemistry and Chemical Sensors. U: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th Edition. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2008, str. 85-91.
3. Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 176.
4. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria j, 2nd Osmolarity of tear microvolumes in kreatoconjuctivitis sicca. Arch Ophtalmol 1978, 98:6477-81
5. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije. http://www.hkmb.hr, pristupljeno 18. lipnja 2015.
6. http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/11_Electrochemical_Methods/11B%3A_Potentiometric_Methods, pristupljeno 19. lipnja 2015.
7. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/endokrinologija/metabolizam-tekucine-i-elektrolita/ravnoteza-natrija-i-vode, pristupljeno 19. lipnja 2015.
8. http://www.pintertrade.com/download/Brochure/Gonotec/Osmometer%20Brochure.pdf , pristupljeno 18. lipnja 2015.
9. Meites S. Standard methods of clinical chemistry Volume 5. U: Osmolality of serum and urine. New York, Academic Press, 1965, str. 159-168.
10. Porter RS, Kaplan JL. Fluid and Electrolyte Metabolism. U: The Merck Manual Of Diagnosis and Therapy, 19th Edition. New York, USA, Merck Sharp & Dohme Corp., A Subsidiary of Merck & Co, Inc. Whitehouse Station, 2011, str. 949-986.
11. Štraus B, Dodig S. Voda i elektroliti. U: Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 55-82.
12. Thomas L. Osmolality. U: Clinical laboratory diagnostics. Frankfurt/Main, Germany, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998, str. 299-302.
13. Uputstvo za upotrebu, Cryoscopic Osmometer OSMOMAT® 030 model, 2007, Version 1.
14. Zilva JF, Pannall PR, Mayne PD. Metabolizam natrija i vode. U: Klinička kemija u dijagnostici i terapiji. Zagreb, Školska knjiga, 1992, str. 25-35.

8 SAŽETAK

Volumen tjelesnih tekućina i koncentracije elektrolita normalno se održavaju u vrlo uskim granicama usprkos velikim kolebanjima unosa hranom, metaboličke aktivnosti i okolišnih stresova. Razlike hidrostatskih tlakova s jedne i druge strane staničnih membrana su zanemarljive, pa hidratacija stanica ovisi o osmotskoj razlici između unutarstanične i izvanstanične tekućine. Osmolalnost plazme najvažniji je parametar za procjenu unutarnje ravnoteže vode u organizmu. Za mjerenje osmolalnosti koristi se osmometar, ali ne posjeduju ga svi laboratoriji pa se koriste različite metode izračunavanja.

Postoje različite metode za određivanje osmolalnosti plazme: izravno mjerenje osmolalnosti ili izračunavanje prema metodama:

Metoda A mOsmol/kg H_2O = 2 x ([Na^+]+ [K^+]) + [glukoza] + [ureja]

Metoda B mOsmol/kg H_2O = 1,86 x [Na^+]+ [glukoza] + [ureja] + 9

Cilj ovog istaživanja je odrediti osmolalnost na tri različita načina, međusobno usporediti dobivene vrijednosti, ustvrditi koliko se rezultati međusobno slažu i mogu li se metode međusobno uspoređivati i zamjenjivati.

U istraživanju smo imali skupinu od 411 ispitanika koje je bila ujednačena po spolu. Uzorci su sakupljani na različitim odjelima KBC Sestre milosrdnice u jutarnjim satima. Osmolalnost seruma izmjerena je u uzorcima mjerenjem pomoću osmometra sniženjem ledišta otopine i izračunata je prema metodi A i metodi B iz izmjerenih varijabli u plazmi (koncentracije natrija, kalija, glukoze i ureje). Analizom podataka dobiveno je da se metode značajno razlikuju te da se međusobno ne mogu uspoređivati ($P<0,0001$). Pojedinačne varijable pokazale su slabiju, ali statistički značajnu povezanost s izmjerenom osmolalnošću osim ureje čija je koncentracija dobro povezana (*rho*=0,649; $P<0,0001$) i pravilnošću proporcionalno pridonosi osmotskom tlaku. Takav rezultat upućuje da su koncentracije sve 4 molekule kao 4 nezavisne varijable međusobno povezane pridonoseći osmolalnosti u nekom matematičkom zajedničkom odnosu. To je pokazao i model multiple regresije.

Ključne riječi: osmolalnost seruma, osmometrija, izračunavanje osmolalnosti

9 SUMMARY

The volume of body fluids and electrolyte concentration is normally maintained in a very narrow range despite large fluctuations in food intake, metabolic activities and environmental stresses. Differences in hydrostatic pressures on both sides of the cell membrane are negligible, and hydration of cells depends on the osmotic difference between the intracellular and extracellular fluid. The plasma osmolality is the most important parameter for evaluating the inner water balance. The osmometer is used for measurement of plasma osmolality, but not all laboratories have one so they use different calculation methods.

There are various methods for determining the plasma osmolality: direct measurement of osmolality or calculation by the following methods:

Method A mOsmol/kg H_2O = 2 x ([Na^+] + [K^+]) + [glucose] + [urea]

Method B mOsmol/kg H_2O = 1.86 x [Na^+] + [glucose] + [urea] + 9

The purpose of this research was to determine the osmolality in three different ways, compare the obtained values with one another, say how the results are consistent and whether the methods can be compared and replaced with each other.

The study incduded a group of 411 patients that was balanced by gender. Samples were collected at various departments of Hospital Center Sestre milosrdnice in the morning. The osmolality was measured by osmometer, in serum samples, lowering the freezing point of the solution and then calculated according to method A and method B with the variables measured in plasma (concentration of sodium, potassium, glucose and urea). Data analysis showed that the methods are significantly different and are not mutually comparable ($P < 0.0001$). The individual variables showed weaker, but statistically significant correlation with the measured osmolality except urea whose concentration is well correlated (*rho* = 0.649; $P < 0.0001$) and proportionally contributes to the osmotic pressure. This result indicates that the concentrations of all four molecules as four independent variables are interconnected contributing to the osmolality in a common mathematical relation. That is also demonstrated with the multiple regression model.

Keywords: serum osmolality, osmometry, calculating the osmolality

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE OSMOLALNOSTI U SERUMU

Renata Lipovec

SAŽETAK

Volumen tjelesnih tekućina i koncentracije elektrolita normalno se održavaju u vrlo uskim granicama usprkos velikim kolebanjima unosa hranom, metaboličke aktivnosti i okolišnih stresova. Razlike hidrostatskih tlakova s jedne i druge strane staničnih membrana su zanemarljive, pa hidratacija stanica ovisi o osmotskoj razlici između unutarstanične i izvanstanične tekućine. Osmolalnost plazme najvažniji je parametar za procjenu unutarnje ravnoteže vode u organizmu. Za mjerenje osmolalnosti koristi se osmometar, ali ne posjeduju ga svi laboratoriji pa se koriste različite metode izračunavanja.

Postoje različite metode za određivanje osmolalnosti plazme: izravno mjerenje osmolalnosti ili izračunavanje prema metodama:

Metoda A mOsmol/kg H_2O = 2 x ([Na^+]+ [K^+]) + [glukoza] + [ureja]

Metoda B mOsmol/kg H_2O = 1,86 x [Na^+]+ [glukoza] + [ureja] + 9.

Cilj ovog istaživanja je odrediti osmolalnost na tri različita načina, međusobno usporediti dobivene vrijednosti, ustvrditi koliko se rezultati međusobno slažu i mogu li se metode međusobno uspoređivati i zamjenjivati.

U istraživanju smo imali skupinu od 411 ispitanika koje je bila ujednačena po spolu. Uzorci su sakupljani na različitim odjelima KBC Sestre milosrdnice u jutarnjim satima. Osmolalnost seruma izmjerena je u uzorcima mjerenjem pomoću osmometra sniženjem ledišta otopine i izračunata je prema metodi A i metodi B iz izmjerenih varijabli u plazmi (koncentracije natrija, kalija, glukoze i ureje). Analizom podataka dobiveno je da se metode značajno razlikuju te da se međusobno ne mogu uspoređivati ($P<0,0001$). Pojedinačne varijable pokazale su slabiju, ali statistički značajnu povezanost s izmjerenom osmolalnošću osim ureje čija je koncentracija dobro povezana (*rho*=0,649; $P<0,0001$) i pravilnošću proporcionalno pridonosi osmotskom tlaku. Takav rezultat upućuje da su koncentracije sve 4 molekule kao 4 nezavisne varijable međusobno povezane pridonoseći osmolalnosti u nekom matematičkom zajedničkom odnosu. To je pokazao i model multiple regresije.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 14 grafička prikaza, 3 tablica i 14 literaturna navoda.
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Osmolalnost seruma, osmometrija, izračunavanje osmolalnosti

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Roberta Petlevski, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2015 .

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

COMPARISON OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF SERUM OSMOLALITY

Renata Lipovec

SUMMARY

The volume of body fluids and electrolyte concentration is normally maintained in a very narrow range despite large fluctuations in food intake, metabolic activities and environmental stresses. Differences in hydrostatic pressures on both sides of the cell membrane are negligible, and hydration of cells depends on the osmotic difference between the intracellular and extracellular fluid. The plasma osmolality is the most important parameter for evaluating the inner water balance. The osmometer is used for measurement of plasma osmolality, but not all laboratories have one so they use different calculation methods.

There are various methods for determining the plasma osmolality: direct measurement of osmolality or calculation by the following methods:

Method A mOsmol/kg H_2O = 2 x ([Na^+] + [K^+]) + [glucose] + [urea]

Method B mOsmol/kg H_2O = 1.86 x [Na^+] + [glucose] + [urea] + 9

The purpose of this research was to determine the osmolality in three different ways, compare the obtained values with one another, say how the results are consistent and whether the methods can be compared and replaced with each other.

The study incduded a group of 411 patients that was balanced by gender. Samples were collected at various departments of Hospital Center Sestre milosrdnice in the morning. The osmolality was measured by osmometer, in serum samples, lowering the freezing point of the solution and then calculated according to Method A and Method B with the variables measured in plasma (concentration of sodium, potassium, glucose and urea). Data analysis showed that the methods are significantly different and are not mutually comparable ($P < 0.0001$). The individual variables showed weaker, but statistically significant correlation with the measured osmolality except urea whose concentration is well correlated (*rho* = 0.649; $P < 0.0001$) and proportionally contributes to the osmotic pressure. This result indicates that the concentrations of all four molecules as four independent variables are interconnected contributing to the osmolality in a common mathematical relation. That is also demonstrated with the multiple regression model.

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

Thesis includes: 37 pages, 14 figures, 3 tables and 14 references.
Original is in Croatian language.

Keywords: Serum osmolality, osmometry, calculating the osmolality

Mentor: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Roberta Petlevski, Ph.D. *Associate Professor, University of Ljubljana Faculty of Pharmacy*
Sandra Šupraha Goreta, **Ph.D.** *Assistant Profesor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2015.