Taloženje kalcijeva oksalata u umjetnom urinu

Šafranko, Silvija

Master's thesis / Diplomski 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:182:999345

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

Diplomski sveučilišni studij kemije

Silvija Šafranko

TALOŽENJE KALCIJEVA OKSALATA U UMJETNOM URINU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

Diplomski sveučilišni studij kemije

Silvija Šafranko

TALOŽENJE KALCIJEVA OKSALATA U UMJETNOM URINU

DIPLOMSKI RAD

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

Neposredna voditeljica: dr.sc. Anamarija Stanković

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju, Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

TALOŽENJE KALCIJEVA OKSALATA U UMJETNOM URINU

Silvija Šafranko

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

Neposredna voditeljica: dr.sc. Anamarija Stanković

Sažetak: U ovom diplomskom radu provedena su sustavna istraživanja spontanog taloženja kalcijeva oksalata u kompleksnom sustavu umjetnog urina u uvjetima hiperoksalurije. Taložni sustavi su optimizirani kako bi se ujedno imitirali fiziološki i patološki uvjeti (θ = 37 ºC, pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0) u širem koncentracijskom području kalcija (2,0 mmol dm^{-3} ≤ $c_i(Ca^{2+})$ ≤ 10,0 mmol dm^{-3}) te koncentracijskom području oksalata (0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3}) kako bi se zadovoljio uvjet hiperoksalurije. Glavni cilj istraživanja je ispitivanje utjecaja kompleksnosti i pH_i sustava te početne koncentracije reaktanata na taloženje i morfologiju kalcijeva oksalata u patološkim uvjetima. U svim taložnim sustavima umjetnog urina dominantno taloži kalcijev oksalat monohidrat (COM), dok su značajne razlike uočene u sustavu umjetnog urina pri pH_i = 9,0 u koncentracijskom području $c_i(C_2O_4^{2-}) \geq$ 6,0 mmol dm^{-3} i $c_i(Ca^{2+}) \geq$ 7,5 mmol dm^{-3} gdje taloži smjesa COM i kalcijeva oksalata dihidrata (COD). Također su uočene i morfološke razlike između taložnih sustava: u umjetnom urinu talože kristali nepravilnih oblika s tendencijom agregacije, što je posebno izraženo u sustavima više prezasićenosti.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kalcijev oksalat / umjetni urin / hiperoksalurija / spontano taloženje

Diplomski rad obuhvaća: 86 stranica / 38 slika / 12 tablica / 69 literaturnih navoda

Stručno povjerenstvo:

1. Izv.prof.dr.sc. Berislav Marković
2. Doc.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Doc.dr.sc. Tomislav Balić

Rad prihvaćen: 26.09.2018.

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry, Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

PRECIPITATION OF CALCIUM OXALATE IN ARTIFICIAL URINE

Silvija Šafranko

Supervisor: Berislav Marković, Ph.D. Associate Professor

Assistant supervisor: Anamarija Stanković, Ph.D.

Abstract: In this Thesis, systematic research of spontaneous precipitation of calcium oxalate in the artificial urine system with increased complexity mimicking the conditions of hyperoxaluria was conducted. The precipitation systems have been optimized in order to emulate physiological and pathological conditions (θ = 37 ºC, pH_i = 5.0 and pH_i = 9.0) over a wide range of initial reactant concentrations of calcium (2.0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10.0 mmol dm^{-3}) and oxalate (0.6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8.0 mmol dm^{-3}) with the aim of establishing hyperoxaluria conditions. The main aim of this research is to investigate the effects of system complexity, initial pH_i and reactant concentration on precipitation and morphology of calcium oxalate under pathological conditions. In all precipitation systems, dominant precipitation of calcium oxalate monohydrate (COM) was observed, except in the artificial urine system at pH_i = 9.0, in the concentration range $c_i(C_2O_4^{2-}) \geq$ 6.0 mmol dm^{-3} and $c_i(Ca^{2+}) \geq$ 7.5 mmol dm^{-3} where a mixture of COM and calcium oxalate dihydrate (COD) precipitated. The significant difference in crystal morphology was observed: irregular crystals with pronounced aggregation tendency have precipitated in the artificial urine, particularly in the systems with increased supersaturation.

Original in: Croatian

Keywords: calcium oxalate / artificial urine / hyperoxaluria / spontaneous precipitation

Thesis includes: 86 pages / 38 figures / 12 tables / 69 references

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Berislav Marković
2. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović
3. Assist. Prof. Tomislav Balić

Thesis accepted: 26.09.2018.

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Berislavu Markoviću na savjetima i podršci tijekom ovih nekoliko godina mentorstva. Hvala Vam što ste me uvijek usmjerili na pravi put i podržali moju želju k ostvarenju viših ciljeva.

Najiskrenije i NAJVEĆE HVALA dr.sc. Anamariji Stanković. Hvala Vam na bezuvjetnoj pomoći, podršci, strpljenju, usmjeravanju i prenesenom znanju tijekom ovih nekoliko godina zajedničkog rada. Oslonac i podrška koju ste pružili u najvažnijim trenucima, kao i motivacija i poticanje da se pomicanje vlastitih granica isplati i vrijedi se ne zaboravlja. Hvala Vam što ste od samog početka vjerovali u mene i pružili mi priliku da pokažem da mogu više. Vjerujem da su rezultati našeg mukotrpnog rada itekako vidljivi. Hvala što ste uvijek bili tu, u uspjehu i u padu.

Posebno hvala doc.dr.sc. Martini Medvidović-Kosanović i doc.dr.sc. Tomislavu Baliću na stručnim savjetima i pomoći, kako tijekom pisanja ovog diplomskog rada, tako i tijekom cjelokupnog mog studiranja.

Veliko hvala i suradnicima Laboratorija za procese taloženja Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu koji su nesebično ustupili sve potrebne materijale i uvijek bili spremni pružiti savjete i pomoć.

Naravno, veliko hvala upućujem i svojim dragim prijateljicama Antoniji Bekić, Žani Kajinić i Jeleni Bijelić koje su bile ogromne podrške tijekom mog studiranja; u veselim, onim uspješnim i manje uspješnim trenucima. Ali posebnu zahvalu upućujem svom dragom kolegi, nadasve velikom prijatelju Pavi Živkoviću koji me trpio svih ovih godina i motivirao na rad i upornost.

U konačnici, ogromno i najveće hvala dugujem svojim roditeljima, sestri Vesni i bakama bez kojih ovo ništa ne bi bilo moguće. Hvala vam na požrtvovnosti, strpljenju i bezuvjetnoj podršci.

Također se zahvaljujem svima koji ovdje nisu spomenuti, a ostavili su traga pri izradi ovog diplomskog rada ili u mojim studentskim danima.

Silvija Šafranko

Ovaj diplomski rad je izrađen u sklopu projekta "Taloženje kalcijeva oksalata u umjetnom urinu" financiran iz Poslovnog fonda Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera kroz interni natječaj „IZIP 2016“ na Odjelu za kemiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku uz suradnju Laboratorija za procese taloženja (IRB)

Sadržaj

1. UVOD 9
2. LITERATURNI PREGLED 11
2.1 Taložni procesi 11
2.1.1 Nukleacija 13
2.1.1.1 Homogena nukleacija 14
2.1.1.2 Heterogena nukleacija 16
2.1.2 Kristalni rast 18
2.1.3 Sekundarni procesi 19
2.2 Biomineralizacija 21
2.2.1 Mehanizmi nastajanja biominerala 22
2.2.2 Patološka biomineralizacija 23
2.3 Urolitijaza 24
2.3.1 Bubrežni kamenci 25
2.4 Kalcijevi oksalati 29
2.4.1 Kalcijev oksalat monohidrat (COM) 30
2.4.2 Kalcijev oksalat dihidrat (COD) 32
2.4.3 Kalcijev oksalat trihidrat (COT) 34
2.5 Urin 35
2.5.1 Taloženje u kompleksnom sustavu umjetnog urina 38
2.5.2 Čimbenici koji utječu na taloženje bubrežnih kamenaca u urinu 39
2.5.3 Hiperoksalurija 41
2.5.3.1 Primarna hiperoksalurija 42
2.5.3.2 Sekundarna hiperoksalurija 43
2.6 Predviđanje stabilnosti otopine 44
2.6.1 Temeljni kemijski principi 44
2.7 Metode identifikacije uzoraka 47
2.7.1 Termogravimetrijska analiza (TGA) 47
2.7.2 Infracrvena spektroskopija (FTIR) 49
2.7.3 Optička mikroskopija (OM) 51
2.7.4 Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD) 51
2.7.5 Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) 53
3. EKSPERIMENTALNI DIO 54
3.1 Priprema otopine umjetnog urina 54

3.2 Priprema taložnih sustava 55
3.3 Računska obrada podataka 56
3.4 Karakterizacija kristalnog sjemena 60
4. REZULTATI I DISKUSIJA 62
4.1 Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije pri pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0 u sustavu umjetnog urina 63
4.1.1 Kvantitativna i kvalitativna analiza kalcijeva oksalata istaloženih pri pH_i = 5,0 65
4.1.2 Morfološka karakterizacija uzoraka pripravljenih pri pH_i = 5,0 68
4.1.3 Kvantitativna i kvalitativna analiza kalcijeva oksalata istaloženih pri pH_i = 9,0 69
4.1.4 Morfološka karakterizacija uzoraka pripravljenih pri pH_i = 9,0 73
5. ZAKLJUČAK 76
6. LITERATURA 78
7. DODACI 81
8. ŽIVOTOPIS 83

1. UVOD

Prema zadnjim epidemiološkim istraživanjima, učestalost pojave bubrežnih kamenaca je znatno veća zadnjih nekoliko desetaka godina, posebice u razvijenim i industrijaliziranim zemljama. Upravo se ova pojava pripisuje užurbanom i modernom načinu života te neadekvatnim prehrambenim navikama. Statistički podaci upućuju da 12 % muškaraca i 5 % žena iskuse bolest bubrežnih kamenaca do 70-te godine života, ali su sve učestalije pojave i kod mlađih osoba neovisno o spolu, uzrokovano lošim prehranom ili genetskim faktorima [1].

Urolitijaza, specifičan oblik patološke biomineralizacije, je pojava čvrste kristalne tvari u mokraćnom sustavu koja se najčešće manifestira ili u mokraćnom mjehuru ili bubregu. To je zapravo rezultat fizikalno-kemijskih mehanizama koji uključuju procese nukleacije, kristalnog rasta te agregacije kao odlučujuće čimbenike cjelokupnog mehanizma u stvaranju i oblikovanju kristala. Proces formiranja kamenaca ovisi o nizu čimbenika poput smanjenog volumena izlučenog urina uzrokovano rjeđim mokrenjem pri čemu dolazi do povećane koncentracije tvari koji mogu potaknuti nukleaciju. Također, istraživanja na tom području se sve više zasnivaju na ispitivanju kemijskih čimbenika koji mogu utjecati na stvaranje bubrežnih kamenaca, a važni su parametri urina kao: pH urina, ionska jakost urina, prisutnost pojedinih tvari koji mogu inhibirati i/ili promovirati stvaranje taloga. Svi navedeni čimbenici mogu imati direktan utjecaj na prezasićenost urina litogenim tvari i potaknuti taložne procese.

Mnogi poremećaji, uzrokovani ljudskim faktorom ili genetskom predispozicijom, također mogu utjecati na stvaranje bubrežnih kamenaca, promoviranjem ili inhibicijom. Najčešće opisivani metabolički poremećaji povezani s povećanim izlučivanjem tvari u urinu su hiperkalciurija, hiperoksalurija, hipercitraturija, ali i smanjenim izlučivanjem poput hipokalciurije i hipocitraturije. Literaturni pregledi najvećeg broja radova usmjeren je na istraživanja u uvjetima hiperkalciurije, dok novija istraživanja naglasak stavljaju na hiperoksaluriju kao prekursor procesa taloženja, posebice u slučaju taloženja kalcijevih oksalata. Hiperoksalurija je metabolički poremećaj prekomjernog izlučivanja oksalata u urinu. Pojava hiperoksalurije se može očitovati kao poremećaj ekspresije gena ili povećanom apsorpcijom oksalata u crijevima i konzumiranjem prehrane bogate oksalatima. Stoga, prema načinu manifestiranja, hiperoksaluriju dijelimo na primarnu i sekundarnu [2]. Dijagnoza se utvrđuje ukoliko izlučivanje oksalata prelazi normalne gornje granice od 20 do 40 mg (0,22 – 0,44 mmol) u 24-satnom urinu.

Postoje podaci da je oko 80 % kamenaca kalcij oksalatnog sastava. U sastavu bubrežnih kamenaca moguća je pojava kalcijeva oksalata u čistom obliku, dok se u većem broju slučajeva pojavljuje u smjesi sa solima fosfata. Pojava čistog oblika fosfata je vrlo rijetka i pojavljuje se u svega 5 % slučajeva. Stoga, ni ne čudi poseban interes znanstvenika za proučavanje kalcijeva oksalata u laboratorijskim uvjetima čija saznanja mogu uvelike pripomoći pri razumijevanju fizikalno-kemijske osnove i mehanizama nastajanja bubrežnih kamenaca.

Kalcijev oksalat kristalizira u tri hidratna oblika kao: termodinamički stabilan kalcijev oksalat monohidrat (vevelit, COM) [3,4], metastabilan dihidrat (vedelit, COD) [5,6] te metastabilan trihidrat (kaoksit, COT) [7,8] koji se rijetko pronalazi u kemijskom sastavu bubrežnih kamenaca. Poznato je da se COM najčešće pojavljuje u sastavu bubrežnih kamenaca, često i u smjesi s COD, dok se COT vrlo rijetko pojavljuje u njihovom sastavu. Ono što je za COM specifično jest njegova patogenost upravo zbog činjenice da se pojavljuje kod osoba koje imaju veću sklonost stvaranju bubrežnih kamenaca i iz toga je razloga zanimljiviji i atraktivniji za istraživanje.

Kako bi se približili uvjetima u biološkim sustavima, pripremljeni su modificirani taložni sustavi s otopinom umjetnog urina. Naime, za razliku od jednostavnog sustava koji se sastoji od konstitucijskih iona kalcija i oksalata, umjetni urin sadrži anorganske i organske komponente koje pridonose kemijskim svojstvima otopine, a u konačnici utječu i na taložne procese. Značajnije količine iona anorganske i organske prirode pridaju prosječnoj ionskoj jakosti od 0,33 mol dm^{-3} koja se ujedno i vodi pod referentnom, odnosno fiziološkom vrijednosti. Također, referentne vrijednosti pH urina se mogu kretati u rasponu od 4,5 – 8,0, iako se može postići i vrijednosti iznad pH = 8,0 pod određenim uvjetima [9,10].

Cilj istraživanja i samog rada jest ispitati utjecaj pripremljenih taložnih sustava koji su prethodno računski obrađeni što je prikazano u Eksperimentalnom dijelu (**Poglavlje 3**). Na taj način je napravljena simulacija taloženja, predviđanje mineraloškog sastava te morfologije kristala. Eksperimentima u laboratorijskim uvjetima potrebno je razlučiti utjecaj koncentracije oksalata i kalcija te početne pH vrijednosti u ovakvom kompleksnijem sustavu kao što je umjetni urin.

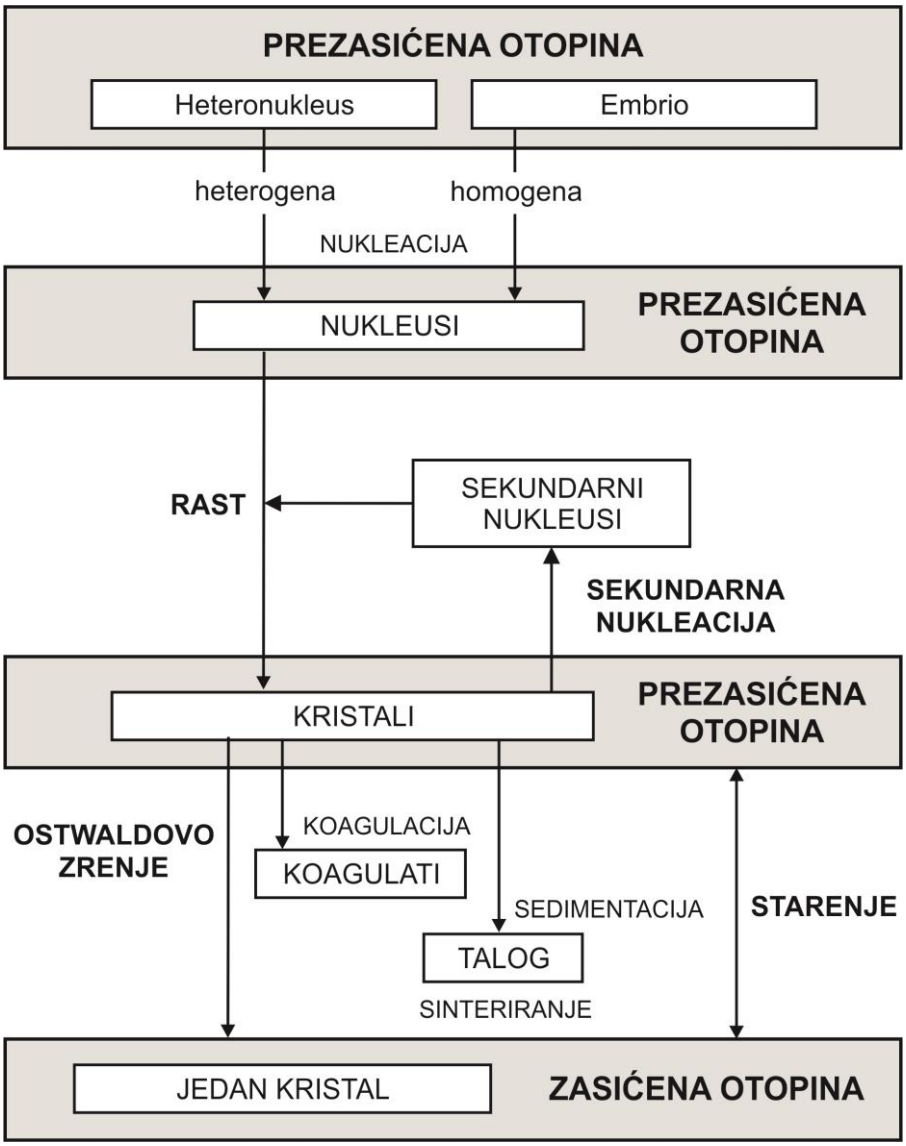
2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Taložni procesi

Taloženje je proces definiran kao izdvajanje nove, čvrste faze, bilo kristalne ili amorfne, iz homogenog sustava. Pod homogenim sustavom se uobičajeno podrazumijeva otopina ili talina, dok se taloženja u biološkim sustavima odvijaju u sustavima elektrolitnih, vodenih otopina. Kristalizacija je nešto uži pojam koji obuhvaća stvaranje čvrste faze kristalne strukture iz otopina ili talina. Pokretačka sila ili preduvjet za kristalizaciju je prezasićena otopina, a veličina kojom se to može opisati se naziva indeks zasićenja i/ili prezasićenost. Prezasićena otopina, osim slobodnih iona i ionskih parova uz novonastale kompleksne ione, sadrži polimerne i polinuklearne vrste koje se mogu podvrgnuti daljnjim procesima agregacije. Taloženje se inače može inicirati kemijskim reakcijama, kontrolom pH vrijednosti, temperature sustava ili načinom miješanja otopine (mehaničko, magnetsko, ultrazvučno miješanje,…).

Sam mehanizam taloženja iz prezasićene otopine se može opisati kroz niz procesa ili međufaza poput nukleacije, rasta kristala te nizom sekundarnih procesa. Navedeni taložni procesi su shematski opisani i kao takvi široko priznati po prijedlogu A.E. Nielsena (**Slika 1.**) [11].

Prema Nielsen-ovoj shemi, taloženje započinje iz prezasićene, nestabilne otopine izdvajanjem nove, čvrste faze u prvom stupnju koji se naziva nukleacija. Nukleacija se može odvijati spontano ili se može potaknuti na različite načine kao što je miješanjem, trenjem te primjenom visokih tlakova. Ukoliko se nukleacija odvija na česticama nečistoća govorimo o heterogenoj nukleaciji, dok stvaranje ionskih ili molekulskih asocijata, embrija ili nukleusa podrazumijeva homogenu nukleaciju. Sljedeći stupanj je rast stvorenih asocijata i nukleusa koji se može odvijati ili u samoj otopini ili na površini kristala te ovaj proces pridonosi formiranju veličine čestica. Daljnjim, sekundarnim procesima, dolazi do smanjenja broja manjih i nastajanje većih čestica ukoliko se ne postigne stabilnost suspenzije. Iz tog razloga, često se taloženjem ne dobiva unimodalna raspodjela veličina čestica, već otopina sadrži čestice različitih veličina.



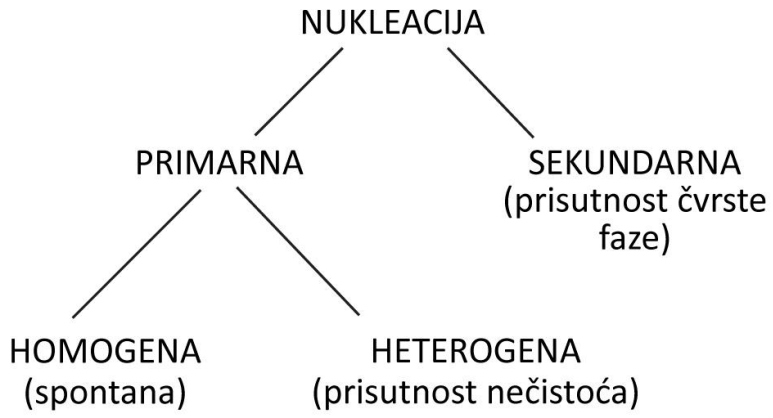
Slika 1. Shematski prikaz taložnih procesa po Nielsen-u [1].

Važnost procesa taloženja ili kristalizacije se posebno ističe u tehnologiji, različitim znanstvenim i industrijskim granama, posebice u farmaceutskoj industriji. Jedan od glavnih ciljeva farmaceuta jest sinteza ili dobivanje aktivnih komponenti lijekova u čvrstom stanju željenih kristalnih oblika koji će na temelju toga pokazati određenu biološku aktivnost. Uz sve navedene prednosti koje nam taložni procesi mogu donijeti u svim aspektima života, postoje i mnogi neželjeni ishodi taloženja. Neki od primjera su karijes i kamenac na zubima, ateroskleroza, odnosno stvaranje plakova koji uzrokuju sužavanje krvnih žila te bubrežni kamenci u ljudskim i životinjskim organizmima koji su zapravo posljedica patološke biomineralizacije.

2.1.1 Nukleacija

Nukleacija se zapravo smatra prvim korakom u procesu kristalizacije, a definirana je kao proces nastajanje centara na kojima može doći do spontanog rasta [12]. Nukleaciju kao pojavu nije tako jednostavno proučavati. Razlog tomu je da prvenstveno nastaju čestice malih dimenzija, nemoguće je predvidjeti mjesto njihovog pojavljivanja u sustavu, ali i da odlikuju velikom nestabilnošću što se posebice očituje u brzini rasta kristala. Naime, odmah po nastanku, takve nestabilne čestice se odmah podvrgavaju procesima rasta, a cijeli proces se odvija u vrlo kratkom vremenskom periodu (vremenski period reda veličine nanosekunde).

Teorije o taložnim procesima, odnosno o formiranju čvrste faze koja ima sposobnost kristalnog rasta prvi su nam predočili Mullin i Nielsen. Kao što je spomenuto, razlikujemo primarnu i sekundarnu nukleaciju po Mullinu (**Slika 2.**) [13]. O primarnoj nukleaciji govorimo ukoliko u sustavu ne postoji čvrsta faza, a može se odnositi i na homogenu i na heterogenu nukleaciju, dok o sekundarnoj govorimo ukoliko je čvrsta faza prisutna u uvjetima prezasićenosti, najčešće pri nižim vrijednostima prezasićenosti nego u slučaju primarne nukleacije [14]. Do sekundarne nukleacije može doći uslijed sudaranja između kristala, sudaranja kristala sa stijenkama reakcijske posude ili zbog interakcija stvorenih kristala s prezasićenom otopinom [15].



Slika 2. Shema mogućih mehanizama nukleacije po Mullinu [13].

Mullin je svoj doprinos dao u objašnjavanju nukleacije s termodinamičkog stajališta povezujući Gibbsovu slobodnu energiju nukleacije i polumjera nukleusa. Na taj način moguće je opisati tijek procesa s obzirom na veličinu nukleusa u prezasićenoj otopini. Nielsen-ova studija se više temelji na empirijskom pristupu uzimajući u obzir indukcijsko vrijeme i koncentracije u prezasićenoj otopini.

2.1.1.1 Homogena nukleacija

Klasične teorije nukleacije se temelje na termodinamičkom principu koje su u prvom redu postavili Gibbs i Volmer, a danas poznajemo niz proširenja i modifikacija istih [13]. Polazi se od pretpostavke da se u prezasićenoj otopini stvaraju klasteri, ionski i molekulski asocijati, što se u konačnici i eksperimentalno potvrdilo.

Međutim, prije samog stvaranja stabilnog nukleusa dolazi do kontinuiranog nastajanja i otapanja ionskih i molekulskih klastera koji su u ravnoteži s ostalim prisutnim klasterima u otopini. Mehanizam koji opisuje interakciju iona i molekula uz nastajanje klastera može se prikazati na sljedeći način [13]:

$M + M \rightleftarrows M_2$ (1)

$M_2 + M \rightleftarrows M_3$ (2)

$M_{n-1} + M \rightleftarrows M_n$ (kritični klaster) (3)

Iz navedenih se jednadžbi uočava da se dodavanjem monomernih jedinica ili konstituirajućih jedinica klastera M, povećava i veličina klastera. Ako veličina klastera dosegne svoju kritičnu veličinu, nastaje nukleus kritične veličine. Vrlo je izgledno da će nukleus kritične veličine nastaviti rasti i da neće doći do otapanja ukoliko se zadovolje određeni uvjeti. Stabilni nukleus nastaje pri određenom stupnju prezasićenosti ukoliko se svlada energetska barijera, odnosno kritična prezasićenost S^* koja ovisi o razlici kemijskog potencijala $\Delta\mu$ i termodinamičkoj temperaturi T prema [16]:

$$\ln S = \frac{\Delta\mu}{RT} \quad (4)$$

$$\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2 \quad (5)$$

Promjene Gibbsove slobodne energije povezane s homogenom nukleacijom definirane su prema relaciji (6) kojom se objašnjava nastajanje sferičnog nukleusa kritične veličine:

$$\Delta G = \Delta G_{površina} + \Delta G_{volumen} \quad (6)$$

gdje ΔG označava promjenu Gibbsove slobodne energije uslijed nastajanja čvrste faze volumena V i stvaranje površine A sferičnog oblika. Radi jednostavnosti, u samu kalkulaciju se uzima polumjer r sferičnog oblika. Ako vrijedi da je:

$$\Delta G = A_{SL}\gamma + V_S\Delta\mu_V \quad (7)$$

pri čemu je A_{SL} oznaka za površinu čvrste čestice na granici kruto-tekuće, γ oznaka za površinsku napetost (slobodna energija površine), V_S volumen sfere, dok $\Delta\mu_v$ označava promjenu Gibbsove energije nove faze po molarnom volumenu.

Ako za površinu A_{SL} i volumen sfere V_S vrijede sljedeće relacije:

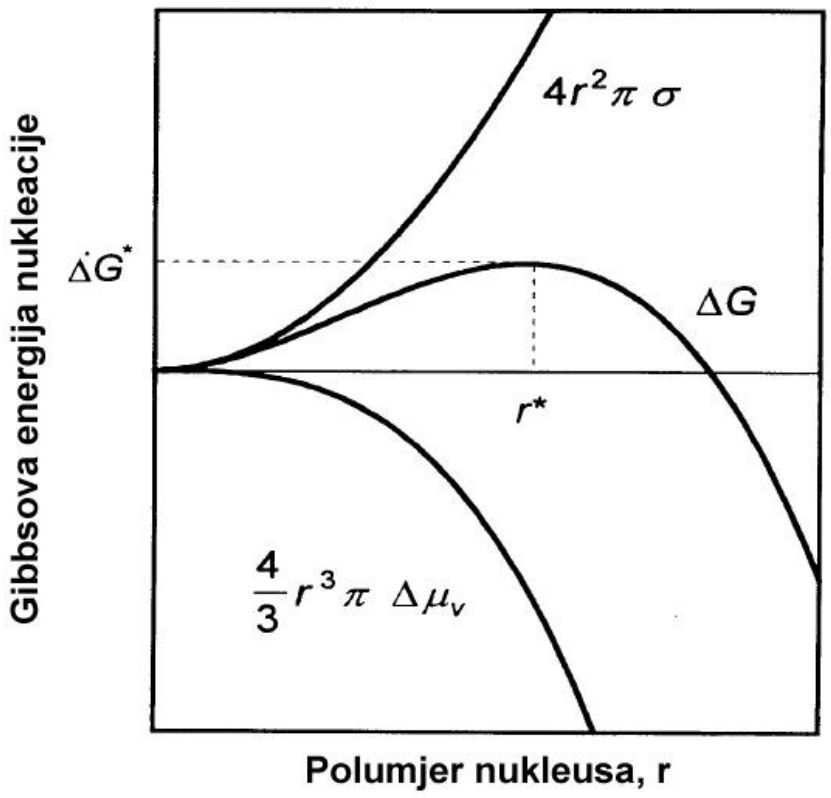
$$A_{SL} = 4\pi r^2 \tag{8}$$

$$V_S = \frac{4}{3}\pi r^3 \tag{9}$$

Tada se može definirati Gibbsova slobodna energija za sferični nukleus polumjera r:

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_V \tag{10}$$

Bitno je još napomenuti da je $\Delta G_{\text{površina}}$ pozitivna vrijednost i da je proporcionalna r^2, dok je $\Delta G_{\text{volumen}}$ u prezasićenoj otopini negativna i proporcionalna r^3 s obzirom da vrijedi da je $\Delta\mu < 0$, odnosno da je $\mu_2 > \mu_1$ što se može vidjeti iz jednadžbe (5).



Slika 3. Grafički prikaz odnosa Gibbsove slobodne energije i polumjera nukleusa r [16].

Iz **Slike 3.** se može uočiti da se doseže maksimum u točki ΔG^* (kritična Gibbsova energija), odnosno gdje je $r = r^*$. Upravo u toj točki ΔG^* odgovara energiji nastajanja nove faze. Ukoliko je polumjer embrija r manji od polumjera kritičnog nukleusa r^* ($r < r^*$) dolazi do smanjenja Gibbsove energije nukleacije ΔG, odnosno stabilizacije zbog otapanja. Ukoliko se postigne uvjet da je polumjer embrija r veći od polumjera kritičnog nukleusa r^* ($r > r^*$), tada može doći do smanjenja Gibbsove slobodne energije nukleacije ΔG ili stabilizacije zbog rasta. Nestabilne čestice s uvjetom da je $r < r^*$ se nazivaju klasteri ili embriji, dok se s uvjetom $r > r^*$ nazivaju nukleusi.

2.1.1.2 Heterogena nukleacija

Na proces nukleacije uvelike mogu utjecati i nečistoće koje se mogu javiti u tragovima u taložnom sustavu. Na neki način prisutne nečistoće ili heteronukleusi mogu djelovati kao katalizator jer imaju ulogu smanjivanja energetske barijere nukleacije. Ta pojava može uzrokovati da se nukleacija počinje odvijati pri nižim prezasićenostima od one prethodno spomenute, kritične prezasićenosti S^* u odnosu na homogenu nukleaciju. Teško je odrediti kemijski sastav heteronukleusa jer bilo koja čvrsta faza može katalizirati nastajanje kristala.

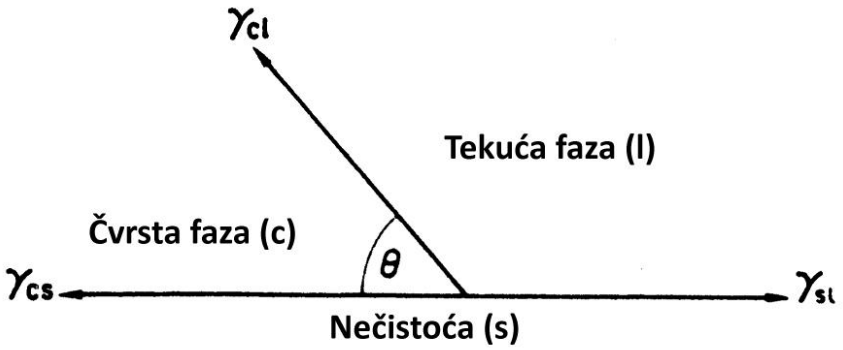
Stvaranje nove, čvrste faze u prezasićenoj otopini potpomognuto prisutnošću nečistoća se definira heteregenom nukleacijom. Heterogena nukleacija se može promatrati kroz adsorpciju iona ili molekula na površinu nečistoća gdje bitnu ulogu ima i površinska napetost između faza, odnosno kontaktni kut θ između faza. Pretpostavka je da su tri faze u kontaktu: dvije čvrste faze i jedna tekuća, stoga treba uračunati i tri različite površinske napetosti na granicama faza kao što slijedi:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{CS} + \gamma_{CL} \cos\theta \tag{11}$$

odnosno preuređivanjem jednadžbe dobijemo da je:

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SL} - \gamma_{CS}}{\gamma_{CL}} \tag{12}$$

pri čemu γ_{SL} označava površinsku napetost između nečistoća i tekuće faze, γ_{CS} je površinska napetost između čvrste faze i nečistoće, γ_{CL} između čvrste faze i tekuće, a θ je kontaktni kut između adsorbirane čvrste faze i nečistoće. Ova pojava se može opisati po principu kuta kvašenja u čvrsto-tekuće sustavu (**Slika 4.**).



Slika 4. Shematski prikaz granica triju faza; nečistoće, nastale čvrste faze i tekuće faze [13].

Heterogena nukleacija čvrste faze iz otopine se može opisati relacijom:

$$\Delta G^*_{heterogena} = \Delta G^* \frac{(1-\cos\theta)^2(2+\cos\theta)}{4} \tag{13}$$

Iz jednadžbe (13) se može uočiti da ukoliko je kontaktni kut $\theta = 180°$, $cos\theta = -1$ te vrijedi da je $\Delta G^*_{\text{heterogena}} = \Delta G^*$. U tom slučaju nema kontakta ili afiniteta između čvrste faze i nečistoća (analogno je tomu da dolazi do savršenog nekvašenja u sustavu čvrsto-tekuće) te ukupna energija za nukleaciju odgovara energiji za odvijanje homogene ili spontane nukleacije, odnosno nije favorizirana heterogena nukleacija. Ukoliko vrijedi uvjet da je $0 < \theta < 180°$, tada postoji djelomični afinitet čvrste faze za nečistoću te je ukupna Gibbsova slobodna energija heterogene nukleacije manja od one za homogenu nukleaciju ($\Delta G^*_{\text{heterogena}} < \Delta G^*$). Za slučaj kada je $\theta = 0$ postoji odlična kompatibilnost između dvije čvrste faze te je $\Delta G^*_{\text{heterogena}} = 0$ – nema energetske barijere za nastajanje nove faze.

2.1.2 Kristalni rast

Proces rasta kristala se može nazvati postnukleacijskim procesom opisanom kao neprekidna nadogradnja slojeva molekula na površini kristala. Tek manja količina taloga nastaje procesom nukleacije pri čemu se značajno ne mijenja prezasićenost otopine. Kod rasta kristala dolazi do izdvajanja čvrste faze u većoj mjeri pri čemu se prezasićenost mijenja, odnosno mijenja se sastav otopine. Po nastanku stabilnog nukleusa, odnosno kada u prezasićenoj otopini nastaju čestice veće od kritične veličine nukleusa, može doći do nastajanja kristala vidljivih dimenzija [13]. Postoje različite teorije koje objašnjavaju mehanizme rasta kristala, a neke od njih se temelje na objašnjavanju preko procesa na površini (slobodne energije površine) ili kontroliranim prijenosom tvari. Glavni parametri koji određuju brzinu i mehanizam kristalnog rasta su prezasićenost, veličina kristala i vrsta površine.

U neke od procesa na površini možemo ubrojiti i adsorpciju iona ili molekula na površinu kristala, ugradnju jedinica na aktivna rastuća mjesta i druge. Najsporiji korak, kao jedan od principa kinetike, određuje brzinu kristalnog rasta.

Postoje dva mehanizma koji objašnjavaju rast kristala kontroliran prijenosom tvari kroz otopinu opisanim difuzijom i konvekcijom. U procesima kontroliranim difuzijom, pretpostavka je da će manji kristali brže rasti i na taj će način čestice nastalog taloga biti podjednake veličine sustava koji je na početku procesa bio polidisperzan. Tu teoriju potvrđuje i jednadžba za ukupnu brzinu rasta kontroliranog difuzijom koja je izvedena iz prvog Fickovog zakona difuzije (14). Sam zakon opisuje tok *J* kao količinu tvari u jedinici vremena (d*n*/d*t*) koja prijeđe kroz jediničnu površinu *A* okomitu na smjer gibanja, odnosno da je tok difundirajuće tvari *J* proporcionalan koncentracijskom gradijentu (d*c*/d*x*). Difuzijski koeficijent *D* označava tendenciju tvari da difundira.

$$\frac{dn}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx} \tag{14}$$

S aproksimacijom da je geometrija kristala sferična i da znamo da je apsolutna prezasićenost izražena kao razlika $c - c_S$ dobijemo sljedeći izraz za brzinu rasta kontroliranog difuzijom koja je proporcionalna prezasićenosti, a obrnuto proporcionalna veličini čestica:

$$\frac{dr}{dt} = D \cdot V_m \cdot A \cdot \frac{c - c_S}{r} \tag{15}$$

gdje je V_m oznaka za molarni volumen, dok je *r* polumjer čestice.

Izraz vrijedi za jednomolekularne sustave, dok za kompleksnije sustave vrijede drugi zakoni.

2.1.3 Sekundarni procesi

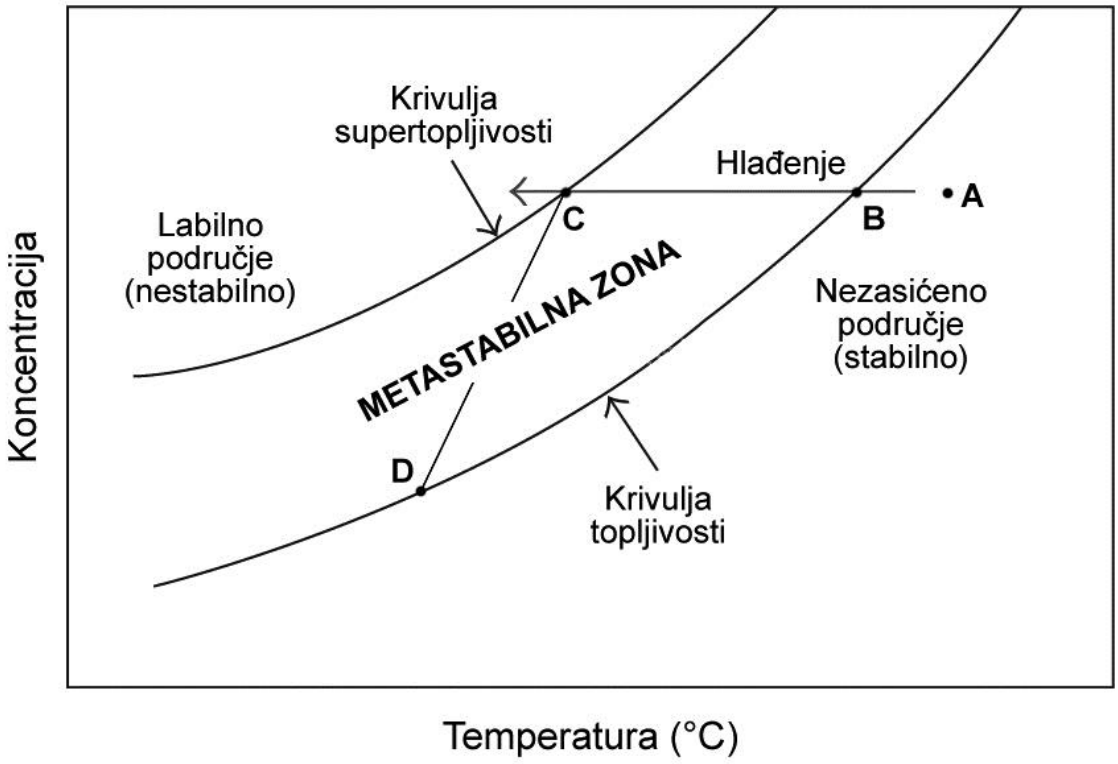
Čvrsta faza koja nastaje uslijed prethodno spomenutih procesa podložna je nizu fizikalno-kemijskih procesa kao što su:

- flokulacija (agregacija, koagulacija, aglomeracija)
- rast većih kristala na štetu onih manjih (Ostwaldovo zrenje)
- nastajanje i transformacija metastabilne čvrste faze

Svi navedeni procesi posljedica su težnje sustava za ravnotežom i smanjenju ukupne Gibbsove energije.

Proces agregacije podrazumijeva smanjenje broja manjih i nastajanje čestica većih dimenzija. U otopini s većim brojem manjih čestica, dolazit će do češćih sudara. U tom slučaju, zbog djelovanja privlačnih sila između čestica, čestice se „lijepe“ jedna za drugu, odnosno spajaju se u veće agregate. Ostwaldovo zrenje okarakterizirano je kao nastajanje većih čestica na račun onih manjih u polidisperznom sustavu. Do ove pojave dolazi uslijed razlika u topljivosti manjih i većih čestica i težnje sustava (termodinamički nestabilan) za postizanje minimuma slobodne površinske energije. Smanjenje energije se postiže otapanjem manjih i stvaranjem većih čestica sve dok ne nastanu samo kristali većih dimenzija, odnosno približuje se svojstvima monodisperznog sustava [13]. Kod nastajanja i transformacije metastabilnih faza najbitnije je spomenuti da u taložnim sustavima može nastati nekoliko faza, ali prva će se istaložiti ona najnestabilnija, faza najveće topljivosti. S vremenom će se najnestabilnija faza transformirati u onu najmanje topljivu, odnosno stabilnu fazu. Tu je pojavu prvi opisao Ostwald 1899. godine [17].

Općenito, širina metastabilne zone (*eng. MSZW*) vrlo je važan parametar za kontrolirani proces kristalizacije te za rast kristala. Može se definirati kao područje između krivulje topljivosti, područja u kojem dolazi do otapanja spoja pri određenoj temperaturi te krivulje supertopljivosti, područja u kojem započinje kristalizacija. Širina metastabilne zone može biti različita za različite spojeve, ali se može mijenjati na umjetan način, primjerice dodavanjem klice koja može smanjiti širinu metastabilne zone.



Slika 5. Pojednostavljeni prikaz dijagrama s metastabilnom zonom te krivuljama topljivosti i supertopljivosti

Na pojednostavljenom grafičkom prikazu kristalizacije (**Slika 5.**) mogu se uočiti spomenute krivulje i metastabilna zona. Iz krivulje je vidljivo da bi se kristali određenog spoja mogli dobiti otapanjem spoja u pogodnom otapalu pri povišenoj temperaturi ili postepenim hlađenjem. Hlađenjem nezasićene (stabilne) otopine od neke točke A do točke B na krivulji topljivosti ne dolazi do kristalizacije. Daljnjim hlađenjem do proizvoljne točke C na krivulji supertopljivosti dolazi do kristalizacije. Djelovanjem na koncentraciju, odnosno smanjenjem koncentracije, sustav se pomiče u neku točku D.

U mnogim literaturama se prezasićenost, odnosno kristalizacija objašnjava preko širine metastabilne zone, posebice u smislu promovirajućeg odnosno inhibirajućeg utjecaja. Naime, pretpostavka je da u prisutnosti veće koncentracije inhibitora koji primjerice djeluje kompleksirajuće na pojedinu vrstu i na taj način smanjuje prezasićenost sustava, dolazi i do proširenja metastabilne zone te je potrebna veća prezasićenost sustava da bi do došlo do procesa kristalizacije. Kristalizacija spoja, osim o koncentraciji i temperaturi, ovisi o brojnim čimbenicima poput topljivosti, pH, vremena itd.

2.2 Biomineralizacija

Depoziciju minerala u živim bićima, od najjednostavnijih do onih složenijih poput čovjeka, definiramo kao proces biomineralizacije. S kemijskog gledišta, to je skup složenih biokemijskih i fizioloških procesa kojima dolazi do nastajanja čvrstih anorgansko-organskih hibridnih materijala koji odgovaraju mineralima po kemijskom sastavu i kristalnoj strukturi. Prirodni fenomen biomineralizacije važan je za mnoga područja znanosti poput arheologije, paleontologije, oceanografije, ali i za područja znanosti koja se bave njihovim istraživanjima poput kemije, biologije, geokemije, biokemije i druge [18].

Danas poznajemo više od 60 različitih biogenih materijala [19] (neki od minerala prikazani u **Tablici 1**), a isto je tako poznato da gotovo jednu trećinu biominerala nalazimo u ljudskom organizmu. Ljudske i životinjske kosti izgrađene su od biominerala fosfatnog sastava (približnog masenog udjela 60 %) koji imaju zaštitnu i potpornu ulogu, također biominerali izgrađuju zube i oklope živih organizama. Međutim, osim fiziološkog i normalnog odvijanja procesa biomineralizacije koji je neophodan za normalno funkcioniranje živog svijeta, razlikujemo i proces patološke biomineralizacije, neželjenog stvaranja biominerala u živim organizmima. Upravo kosti i mokraćni kamenci privlače posebnu pažnju zbog patoloških promjena.

Tablica 1. Primjeri najrasprostranjenijih minerala u biološkim sustavima [19]

Mineral	Anorganski sastav	Organizam	Glavna funkcija
Kalcit, aragonit	$CaCO_3$	školjkaši	egzoskelet
		sisavci	statokonij - gravitacijski receptor
Hidroksiapatit (HAP)	$Ca_5(PO_4)_3{\cdot}(OH)$	kralježnjaci	endoskelet, zubi
Fluorapatit (FAP)	$Ca_5(PO_4)_3{\cdot}(F)$	morski psi	zubna caklina
Gips	$CaSO_4{\cdot}2H_2O$	meduze	gravitacijski receptor
Silika	$SiO_2{\cdot}nH_2O$	dijatomeje, radiolarije	egzoskelet
Magnetit	Fe_3O_4	bakterije	receptor za magnetsko polje
Ferihidrit	$Fe_2O_3{\cdot}nH_2O$	kralježnjaci	spremnici željeza
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6{\cdot}_5H_2O$	kralježnjaci	zubna caklina, kosti

Zanimljivo je zapravo da se biomineralizacija izučava kao zasebno područje bioanorganske kemije, s posebnim interesom i naglaskom na biomimetičkoj kemiji. Sve više su zastupljena istraživanja u biomimetičkoj kemiji gdje se u laboratorijskim uvjetima proučavaju modelni

uvjeti koji se svojom funkcionalnošću, sastavom i karakteristikama približuju realnim, biološkim uvjetima.

2.2.1 Mehanizmi nastajanja biominerala

Biomineralizacija se često definira kao proces kojim živi organizmi stvaraju čvrste strukture, odnosno, minerale. Mehanizmi nastajanja biominerala se mogu podijeliti u dvije kategorije, odnosno razlikujemo biološki induciranu mineralizaciju (BIM) te biološki kontroliranu mineralizaciju (BCM) [20]. Biološki kontrolirana mineralizacija ovisi o staničnim procesima specifičnih organizama koji izravno utječu na nukleaciju, rast i morfologiju nastalih biominerala. Za objašnjavanje ovog procesa najbolje se možemo poslužiti primjerom mineralizacije dentina, čvrstog materijala koji u najvećem udjelu izgrađuje zube. Dentin se zatim mineralizira odlaganjem kristala kalcijeva hidroksiapatita u organski matriks (kolagen vlakna). Kod biološki inducirane mineralizacije, organizmi promjenom svog mikrookruženja stvaraju pogodne fizikalno-kemijske uvjete za stvaranje minerala [21]. Smatra se da većina mikrobioloških procesa podliježe procesima biološki inducirane mineralizacije gdje se biominerali talože nasumično kao posljedica sekundarnih interakcija između različitih metaboličkih produkata i okoline. Veličina, morfologija, sastav i organizacija nastalih mineralnih čestica je loše definirana. Za primjer se može uzeti mikrobiološka sinteza magnetita (Fe_3O_4) u kojem nastaju nepravilne i neuniformne čestice, a pojava je demonstrirana na nekoliko kultura bakterija [20].

Proces biomineralizacije određen je lokacijom depozicije te razlikujemo [22]:

Epicelularni proces - na stijenkama stanice;
Intercelularni proces - u prostoru između gusto složenih stanica;
Intracelularni proces - u ograđenom prostoru, odjeljcima, unutar stanice;
Ekstracelularni proces - izvan stanice, na površini ili unutar netopljive makromolekulske matrice.

Za razliku od biološki inducirane mineralizacije, proces biološki kontrolirane mineralizacije, kao što i sam naziv upućuje, je kontroliran proces kojim nastaju organsko – anorganski kompozitni materijali specifičnih karakteristika i funkcija. Najčešće se ovim procesom opisuju fiziološke mineralizacije poput one u kostima i zubima. Najčešće do biološki kontrolirane mineralizacije dolazi na intracelularnim i ekstracelularnim mjestima [22].

Upravo su kosti i bubrežni kamenci dvije vrste tkiva koja najviše privlače pozornost i pažnju znanstvenika zbog medicinskih problema i bolesti koje se učestalo povezuju uz iste.

Organski dio, odnosno organski matriks sačinjavaju biopolimeri, odnosno makromolekule koje stvaraju pogodne interakcije između anorganske (primjerice Ca^{2+}, Mg^{2+} iona) i organske komponente. Biopolimeri stoga mogu utjecati na morfologiju, teksturu i polimorfizam nastalih kristala. S obzirom na prirodu organskog matriksa razlikujemo topljivi (proteini) i netopljivi (polisaharidi) organski matriks, odnosno hidrofilne i hidrofobne dijelove [19]. Ti dijelovi mogu stvarati različite interakcije (vodikove veze, elektrostatske vezne interakcije) i na taj način utjecati na orijentaciju ili rast kristala.

2.2.2 Patološka biomineralizacija

U prethodnim potpoglavljima opisano je nastajanje biominerala koji su neophodni i važni za normalno funkcioniranje živog svijeta. Međutim, kako procesom biomineralizacije mogu nastati takvi funkcionalni biomaterijali, tako mogu nastati i oni neželjeni procesom patološke biomineralizacije. Neki od primjera patološki mineraliziranih materijala koji nastaju kao posljedica navedenog procesa su karijes zubi, aterosklerotični plakovi koji nastaju slaganjem depozita na različitim mjestima u kardiovaskularnom sustavu te kamenci koji mogu nastati u različitim dijelovima mokraćnog sustava. Takav specifičan oblik patološke biomineralizacije se naziva urolitijaza.

Formiranje kristala procesom patološke biomineralizacije slijedi isti mehanizam kao i kod uobičajenog, fiziološkog procesa [23]. Nukleacija je uvjetovana određenim stupnjem prezasićenosti iniciranim različitim biokemijskim procesima, a koja može biti promovirana ili inhibirana različitim aditivima (pirofosfatni, magnezijevi ili citratini ioni) te može biti potpomognuta i prisutnošću organskog matriksa (kolesterol, glikozaminoglikani, glikoproteini) ili različitim kristalima koji mogu djelovati kao heterogeni nukleusi. Već je prije spomenuto da je nukleacija prvi korak u procesu nastajanja kristala.

Početni stupanj procesa urolitijaze jest stvaranje kristala u fiziološkom urinu koje ovisi o mnogim fizikalno-kemijskim čimbenicima i koji izravno utječu na potencijalne litogene procese.

2.3 Urolitijaza

Pojava stvaranja čvrste, kristalne tvari u mokraćnom sustavu naziva se urolitijaza, a očituje se kao specifičan oblik patološke biomineralizacije. Taj proces je iznimno složen i ovisan o nizu čimbenika poput: prezasićenosti urina, pH i ionskoj jakosti urina, prisutnosti promotora ili smanjenoj koncentraciji inhibitora, volumenu urina gdje rjeđe mokrenje omogućuje nakupljanje litogenih tvari u urinu, ali proces ovisi i o stupnju oštećenja bubrežnog tkiva. Oštećenje površnog sloja unutrašnjih bubrežnih zidova ili mokraćovoda postaje povoljno mjesto za nakupljanje manjih čestica koje bi u konačnici služilo i kao vezno mjesto za agregaciju do određene veličine i oblika. Pod terminom urolitijaze podrazumijevamo općenito nastajanje kamenaca u mokraćnom sustavu, dok se klasifikacija nastavlja s obzirom na pojavu na specifičnoj lokaciji pa razlikujemo: nefrolitijaza (bubrežni kamenci), ureterolitijaza (kamenci u mokraćovodu) ili cistolitijaza (kamenci u mokraćnom mjehuru). U konačnici se može reći da je pojava mokraćnih kamenaca rezultat fizikalno-kemijskih mehanizama koji uključuje nukleaciju, kristalni rast i agregaciju kao i kod svakog procesa kristalizacije.

Stvaranje mokraćnih kamenaca se povezuje s pojavom prezasićenosti urina ili njegovim kemijskim sastavom. Često se u različitim literaturama navodi da je pokretačka sila stvaranja kamenaca, odnosno kristalizacije upravo prezasićenost urina [24]. Prezasićenost se može definirati kao omjer produkta aktiviteta konstitutivnih iona i termodinamičkoga produkta topljivosti odgovarajuće soli.

Vrlo je važan i omjer pojedinih iona u otopini, a svako narušavanje ionske ravnoteže može dovesti do nastajanja različitih metaboličkih poremećaja koji mogu promovirati ili inhibirati proces. Prisutni ioni (kalcij, oksalat, magnezij, citrat, fosfat, urati,…) koji se normalno nalaze u urinu nemaju tendenciju taloženja i ne mogu uzrokovati stvaranje kristala, već je taloženje omogućeno njihovom međusobnom interakcijom uslijed uspostavljanja povoljnih uvjeta za nukleaciju. Postoje indikacije da visoka koncentracija mokraćne kiseline koja je rezultat prekomjernog konzumiranja hrane bogatom purinima može uzrokovati nastajanje mokraćnih kamenaca. Ova pojava se može objasniti biokemijskim procesom razgradnje purina (AMP i GMP nukleotida) čiji je konačni produkt mokraćna kiselina, odnosno urati [25].

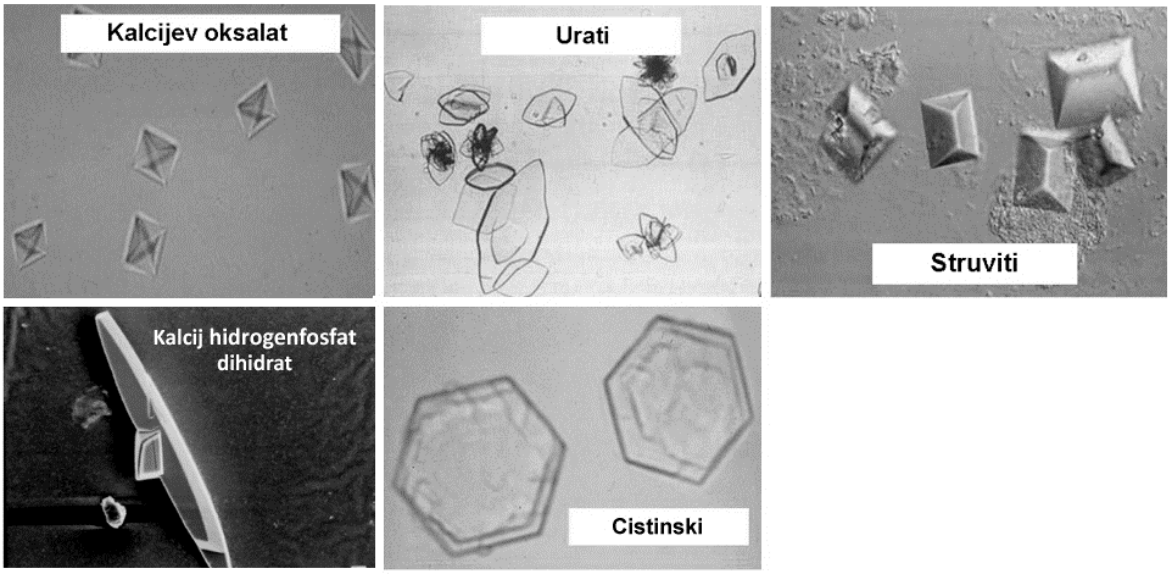
Inače, zadnjih nekoliko desetaka godina, istraživanja na tom području su iznimno popularna te se posebno ističe interdiscipliranost između fizikalne kemije, biokemije, fiziologije, farmacije i biotehnologije lijekova. Svaka od navedenih disciplina uvelike pridonosi u rješavanju mehanizma stvaranja kamenaca kojim se manifestira ovaj problem. Istraživanja se uglavnom

temelje na ispitivanju prekursora koji izravno utječu na karakteristike urina, metaboličkim i genetskim čimbenicima koji mogu promovirati ili inhibirati stvaranje bubrežnih kamenaca. Svako novo saznanje može biti novi korak prema razrješavanju mehanizama nastajanja mokraćnih kamenaca koji su i danas velika nepoznanica.

2.3.1 Bubrežni kamenci

Nešto noviji statistički podaci upućuju da čak 12 % muškaraca i 5 % žena mogu razviti bolest bubrežnih kamenaca do 70-te godine života [1]. Međutim, zabrinjavajuće je zapravo da bolest više ne bira ni spol ni dob osoba s obzirom da sve češće obolijevaju mladi i djeca već u ranoj tinejdžerskoj dobi. Znanstvenici to pripisuju neadekvatnoj prehrani i modernom načinu življenja s minimalnom fizičkom aktivnošću. Učestalost pojave bubrežnih kamenaca podjednaka je za oba bubrega, a kod 40 % bolesnika prisutni su kamenci u oba bubrega.

U novije vrijeme uslijed povećane pojave bubrežnih kamenaca obnovio se interes znanstvenika za razjašnjavanje patofiziologije stvaranja kamenaca s osobitim osvrtom na oksalatne kamence. Poznato je da sastav bubrežnih kamenaca ovisi o inicijalnim uvjetima u kojima je došlo do njihovog stvaranja, a najčešće uključuje soli kalcijevih fosfata, magnezijevih amonijevih fosfata, soli urata (mokraćne kiseline) s naglaskom na amonijeve hidrogen urate, zatim struvite, cistinske kamence, dok je kalcijev oksalat nedvojbeno najčešći konstituent bubrežnih kamenaca (**Slika 6**, **Tablica 2.**).



Slika 6. Sastav i morfologije pojedinih kemijskih komponenti koje mogu izgrađivati mokraćne kamence [27,28].

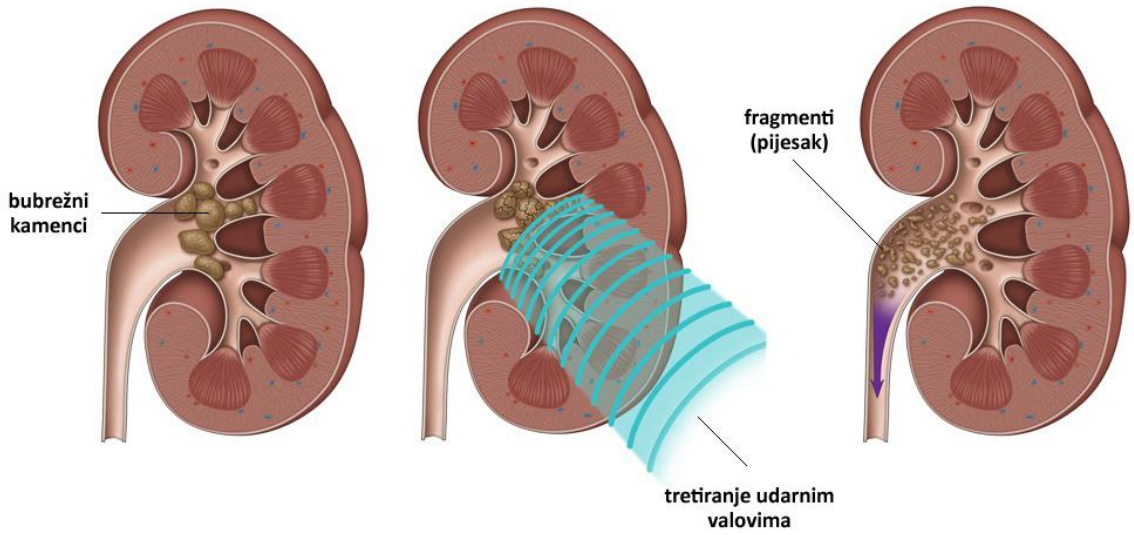
Tablica 2. Kemijske komponente koje mogu sačinjavati mokraćne kamence

Kemijski spoj	Mineral	Formula	Skraćenica
Oksalati			
Kalcijev oksalat monohidrat	Vevelit	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$	COM
Kalcijev oksalat dihidrat	Vedelit	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$	COD
Fosfati			
Kalcijev fosfat	Hidroksiapatit	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	HA
Kalcijev hidrogenfosfat	Brušit	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	BR
Magnezijev amonijev fosfat heksahidrat	Struvit	$(NH_4)Mg(PO_4) \cdot 6H_2O$	STR
Purini			
Mokraćna kiselina		$C_5H_4N_4O_3$	UA
Mononatrijev urat monohidrat		$NaC_5H_3N_4O_3 \cdot H_2O$	MSU
Ostali			
Cistin		$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	CY

Čak je oko 80 % bubrežnih kamenaca kalcij oksalatnog sastava, od čega se jedna četvrtina, odnosno 25 % može pronaći u čistom obliku. Ostali slučajevi, oko 70 %, se nalaze u smjesi s kalcijevim fosfatima. Manji postotak, približno 5 % kamenaca su građeni od čistog oblika kalcijeva fosfata [26]. Najčešće se u sastavu bubrežnih kamenaca nalazi monohidratni oblik kalcijeva oksalata, a vrlo često i smjesa monohidrata i dihidrata kalcijeva oksalata. Iza kalcijeva oksalata prednjače kamenci s fosfatnim sastavom u kojima se najčešće pronalaze oblici apatita (hidroksiapatit - HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ili karbonatni apatit, (CAp) te brušit ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$). Također se vrlo često pronalaze i struviti ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) u sastavu fosfatnih kamenaca. Nešto se rjeđe pojavljuju urati (oko 10 %), ali i cistinski ili u mnogim literaturima nazivani kao cisteinski kamenci, prepoznaju se po svom karakterističnom, heksagonalnom obliku kristala žute boje. Cistinska urolitijaza jedina je klinička manifestacija cistinurije, autosomno recesivne bolesti obilježena defektom bubrežnog i crijevnog transporta dibazičnih aminokiselina cistina, metionina, ornitina i arginina [29]. Zanimljivo je zapravo da je cistin, oksidirani dimer esencijalne aminokiseline cisteina, jedina netopljiva od navedenih aminokiselina pri normalnom pH urina što ujedno postaje pogodna predispozicija za formiranje kamenaca pri određenim koncentracijama [30]. Mokraćni kamenci uratnog sastava najčešće nastaju zbog poremećaja metabolizma purina u kojem se kao jedan od konačnih produkata dobiva mokraćna

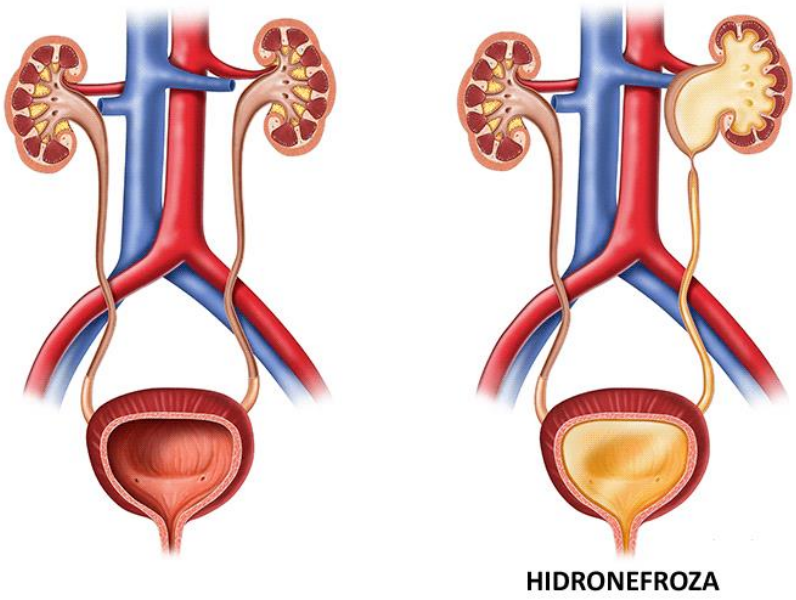
kiselina. I cistinskim i uratnim kamencima je zajedničko da kiseli medij, odnosno urin, pogoduje njihovom stvaranju.

Osim oštre boli tijekom putovanja kamenca duž mokraćnog sustava oštećujući dovoljno osjetljivo tkivo uz pojavu hematurije (pojava krvi u mokraći), odnosno pojave mase eritrocita u urinu, bubrežni kamenci mogu uzrokovati niz puno ozbiljnijih problema, naravno ovisno o lokaciji gdje zaostanu. U mnogim slučajevima, osoba može izmokriti manje kamence bez potrebe za liječničkom intervencijom (kamenci manji od 5 mm), dok se u većini slučajeva (najčešće za kamence iznad 7 mm) potrebno obratiti liječniku i podvrgnuti operacijskom zahvatu kao što je uretroskopija (endoskopska pretraga i uklanjanje kamenca), perkutana nefrostomija (metoda razbijanja kamenca) te litotripsija (razbijanje kamena udarnim valovima, **Slika 7.**).



Slika 7. Shematski prikaz postupka litotropsije i usitnjavanja kamenca [31].

Jedna od mogućih komplikacija je i hidronefroza (**Slika 8**.), odnosno pojava dilatacija (proširenje) kanalnog sustava bubrega do kojeg dolazi uslijed nakupljanja mokraće kao posljedica povratnog pritiska na bubreg. Mokraća iz bubrega protječe pod relativno niskim tlakom. Ukoliko je kanalni sustav začepljen, mokraća se počinje nakupljati u tubulima (kanalićima) bubrega i središnjem dijelu, proširujući bubreg i pritišćući njegovo osjetljivo tkivo. Pritisak koji se vrši na bubreg može oštetiti organ i smanjiti njegovu funkcionalnost.



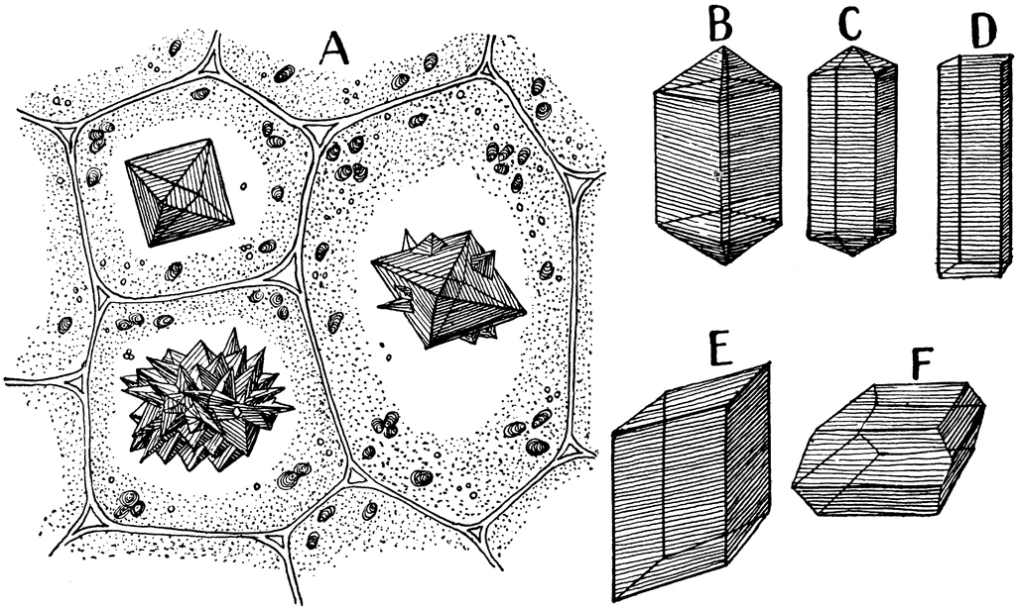
Slika 8. Pojava hidronefroze uslijed retencije kamenca [31].

Također, bubrežni kamenci mogu stvoriti idealan ambijent za razmnožavanje bakterija i pojave mokraćnih infekcija zbog nemogućnosti njihova uklanjanja putem urina uslijed nastanka blokade u mokraćovodu.

Usprkos dosadašnjim opsežnim istraživanjima, patogeneza bubrežnih kamenaca nije dovoljno objašnjena i prema tome još uvijek ne postoji metoda kojom bi se jasno razlučivale osobe koje su sklone stvaranju kamenaca od onih koji nemaju tu tendenciju [32]. Ipak, najveći naglasak se u istraživanjima na ovom području stavlja na kamence kalcij oksalatnog sastava koji su najčešći konstituenti bubrežnih kamenaca i koja se temelje na ispitivanju „okidača“ i uvjeta u kojima je došlo do formiranja kristala, nastale hidratne faze i morfologije kristala te utjecaja pojedinih komponenti, primjerice aditiva, na procese kristalizacije.

2.4 Kalcijevi oksalati

Oksalati su manje organske molekule koje pronalaze široku primjenu u prirodi te u biološkim sustavima postoje u obliku aniona relativno jake oksalne kiseline ili u obliku teško topljivih soli kalcijeva oksalata. Primjerice, oksalat u biljnim stanicama ima vrlo važnu ulogu. Biljke proizvode oksalat prvenstveno kako bi se održala regulacija kalcija u stanicama koji se preuzima putem korijena iz tla. Kalcij je vrlo bitan nutrijent za biljke, kako za rast, tako i za kvalitetu plodova. Međutim, ukoliko stanične koncentracije kalcija dosegnu vrijednosti veće od $10^{-6} – 10^{-8}$ mol dm^{-3}, tada kalcij za stanice postaje toksičan i uzrokuje veliki fiziološki problem za normalno odvijanje biokemijskih procesa. U takvim situacijama stvaraju se kristali kalcijevih oksalata raznih oblika i veličina koji su bezopasni za biljke. Također je zabilježena i njihova sekundarna uloga prilikom čega kalcijevi oksalati nastaju kao fizička zaštita od nametnika. Dakle, osim patogene aktivnosti kalcijevih oksalata, govorimo i o netopljivim mineralima koji imaju vrlo važnu ulogu u zaštiti biljaka od insekata i održavanje homeostaze kalcija [33].



Slika 9. Morfološke razlike kalcijevih oksalata kao produkata metabolizma biljaka: A: Rozete, tetragonalni sustav; A-D: Tetragonalni sustav: E-F: Monoklinski sustav [34].

U prirodi kalcijev oksalat kristalizira u tri modifikacije kao: termodinamički stabilan kalcijev oksalat monohidrat (COM, $CaC_2O_4 \cdot H_2O$) [3,4], metastabilan dihidrat (COD, $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) [5,6] te metastabilan trihidrat (COT, $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$) [7,8]. Prema Ostwaldovoj teoriji, taloženjem iz prezasićene otopine nastaje prvo najnestabilnija hidratna (najtopljivija) faza koja

se s vremenom transformira u termodinamički stabilnu, odnosno najstabilniju fazu. Ako se topljivost može opisati odnosom COT > COD > COM [35], možemo COT zapravo smatrati prekursorom za nastajanje hidratne faze COD, odnosno najstabilnije COM [36,37].

COM je termodinamički najstabilnija hidratna faza kalcijeva oksalata i najčešće se pojavljuje u sastavu bubrežnih kamenaca, odmah iza COM slijedi COD, a vrlo često se pronalazi smjesa oba hidratna oblika. Inače, COM je više patogen u odnosu na COD s obzirom da se može naći u urinu osoba koje su sklone stvaranju kamenaca, a dihidrat je više fiziološki obzirom da se može naći u urinu zdravih osoba. COT se vrlo rijetko pronalazi u sastavu bubrežnih kamenaca [35], ali može biti prekursor za stvaranje navedenih dviju faza. Eksperimentalno se pokazalo da se COM može dobiti dehidratacijom sintetičkog COT pri temperaturi od 116,5 ^{0}C bez usputnog stvaranja COD kao intermedijara [38].

2.4.1 Kalcijev oksalat monohidrat (COM)

Opće prihvaćena strukturna analiza COM proizlazi od Tazzoli and Domeneghetti koji su COM klasificirali prema monoklinskom sustavu prizmatske klase, odnosno COM kristalizira u dvije monoklinske strukture [39]:

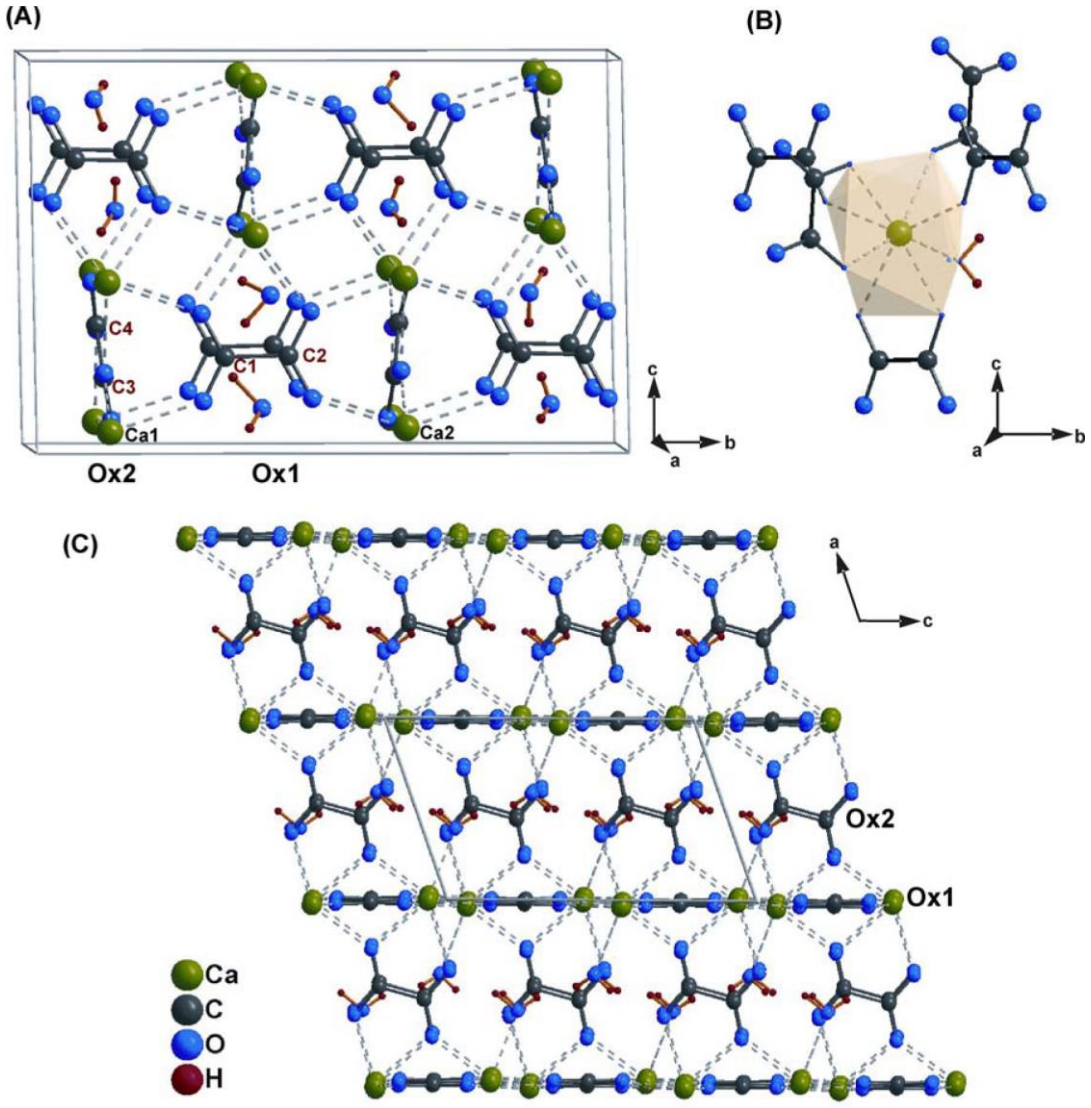
1) osnovnoj, koja je stabilna iznad 45 ºC (a = 9,978 Å, b = 7,295 Å, c = 6,292 Å, β = 107,07º, Z = 8, V = 876.228 Å^3, prostorna grupa $I2/m$). Sastoji se od naslaganih planarnih slojeva iona kalcija i oksalata u omjeru 2:1 koji se izmjenjuju sa slojevima oksalata i molekula vode u položaju paralelnom s ravninom [40-42].

2) stabilnoj ispod 45 ºC (a = 9,9763 Å, b = 14,5884 Å, c = 6,29134 Å, β = 107,05º, prostorna grupa $P2_1/c$). Oksalati u (010) ravnini trpe malu distorziju pa se duljina osi b udvostručuje, a simetrija smanjuje [40,41].

Malo je poznato da postoje tri polimorfa COM-a. Jedna struktura, rompska nastaje dehidratacijom dihidrata (COD) u temperaturnom području od 118 - 130 ^{0}C [42]. Ima rompsku simetriju s parametrima ćelije: a = 12.088 Å, b = 10.112 Å, c = 14.634 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Druge dvije strukture su predložene prema radu Deganella [40] koji razlikuje visokotemperaturnu (stabilna u rasponu od 45 – 152 °C) i niskotemperaturnu (stabilna u raspoonu od 20 – 45 °C) strukturu COM. Stoga, prijelaz iz visokotemperaturne u niskotemperaturnu strukturu je zabilježen na temperaturama ispod 45 °C.

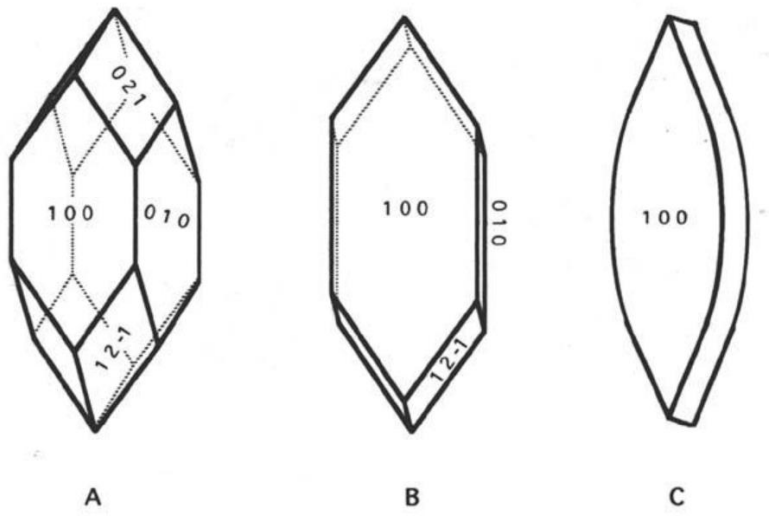
Oksalat se bidentantno koordinira na kalcij u poliedarsku strukturu gdje je atom kalcija koordiniran s osam atoma kisika od kojih sedam potječe od sveukupno pet oksalatnih iona

($C_2O_4^{2-}$) te jedan od molekule vode. Na **(B)** uočavamo da je kalcij vezan bidentantno preko dva $C_2O_4^{2-}$ iona, dok je monodentantno vezan na tri $C_2O_4^{2-}$ iona. Sva tri kraja poliedra oko kalcija vezana su na tri susjedna atoma kalcija. Prema tome, dobivamo paralelne slojeve. Iz **Slike 10 (A)** se može uočiti kako Ox1 i Ox2 (oznake za $C_2O_4^{2-}$ ion) nisu kristalografski ekvivalentni. Ox1 je koordiniran sa šest kalcijevih iona, a Ox2 s četiri kalcijeva iona i dvije molekule vode preko vodikovih veza s kisikom $C_2O_4^{2-}$ iona.



Slika 10. Prikaz strukturnih karakteristika hidratne faze COM – Struktura COM (A) i poliedar Ca^{2+} (B) [38].

COM se također može prepoznati i preko svojih morfoloških karakteristika te razlikujemo: prizmatski, pločasti te oblika suze. Na **Slici 11.** su prikazane navedene morfologije COM s oznakama ravnina, odnosno Millerovim indeksima [43]. Moguća je pojava i COM oblika štapića, sraslaca, odnosno pojava sraštenih dva ili više pojedinih oblika COM ili pak dendrita oblika slova X za koji je pretpostavka da se može dobiti pri višim koncentracijama kalcija i oksalata [40].



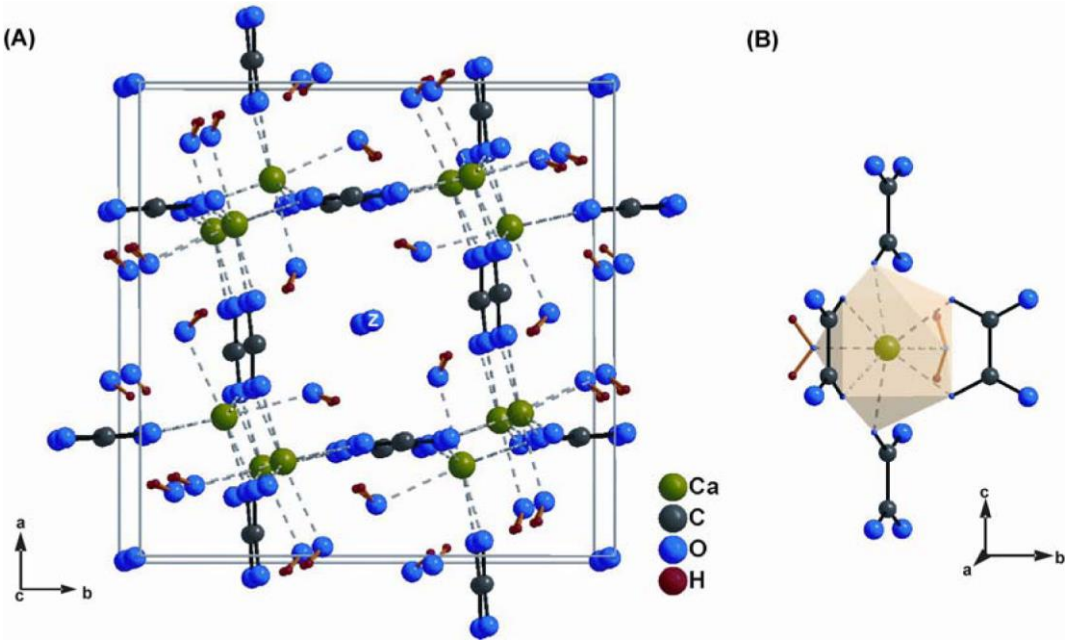
Slika 11. Morfologija COM - A: prizmatski kristali; B: pločast kristali; C: oblika suze [43].

Utvrđeno je i da je rast COM na kristalnom sjemenu kontroliran površinskim procesima drugog reda iz čega slijedi da je brzina rasta proporcionalna i površini kristala raspoloživoj za rast, odnosno omjeru ukupne površine kristala i količine kristalnog sjemena [44,45].

2.4.2 Kalcijev oksalat dihidrat (COD)

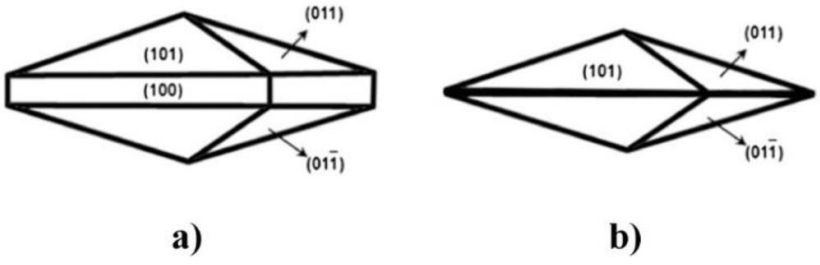
Kalcijev oksalat dihidrat (COD) je odmah iza COM po učestalosti pojave u sastavu bubrežnih kamenaca. Naime, radi se o metastabilnom obliku koji se vrlo teško dobiva u čistom obliku, a gotovo uvijek je potrebna prisutnost aditiva kako bi se dobio u laboratorijskim uvjetima.

Kalcijev oksalat dihidrat (COD) kristalizira u tetragonskom sustavu s parametrima jedinične ćelije: a = 12,371 Å, b = 14,583 Å, c = 10,116 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90°$, Z = 8, V = 1125.937 Å^3, prostorna grupa $I4/m$ [39,46]. Četiri atoma kalcija koordinirano je s osam molekula vode.



Slika 12. Prikaz strukturnih karakteristika hidratne faze COD – Struktura COD (A) i poliedar Ca^{2+} (B) [38].

Ca^{2+} ion je koordiniran s osam atoma kisika koji potječu od četiri molekule vode i četiri oksalatna iona. Uspoređujući strukturu COD s COM, ion kalcija je koordiniran s jednim oksalatom manje, ali jednom molekulom vode više. Pritom nastaje vodikova veza dvije molekule vode s kisikovim atomima oksalatne skupine. Oksalati tvore kanale koji prolaze kroz kristal i sadrže molekule vode (zeolitna voda Z - $CaC_2O_4 \cdot (2+x)H_2O$; **Slika 12 (A)**) [47]. Dihidrat koji nastaje u vodenoj otopini stvara karakterističnu tetragonalnu bipiramidu i tetragonske prizme s dominantnom (101) ravninom ili tetragonalnu bipiramidu s prizmom s izraženom (100) ravninom (**Slika 13**) [41,48,49].



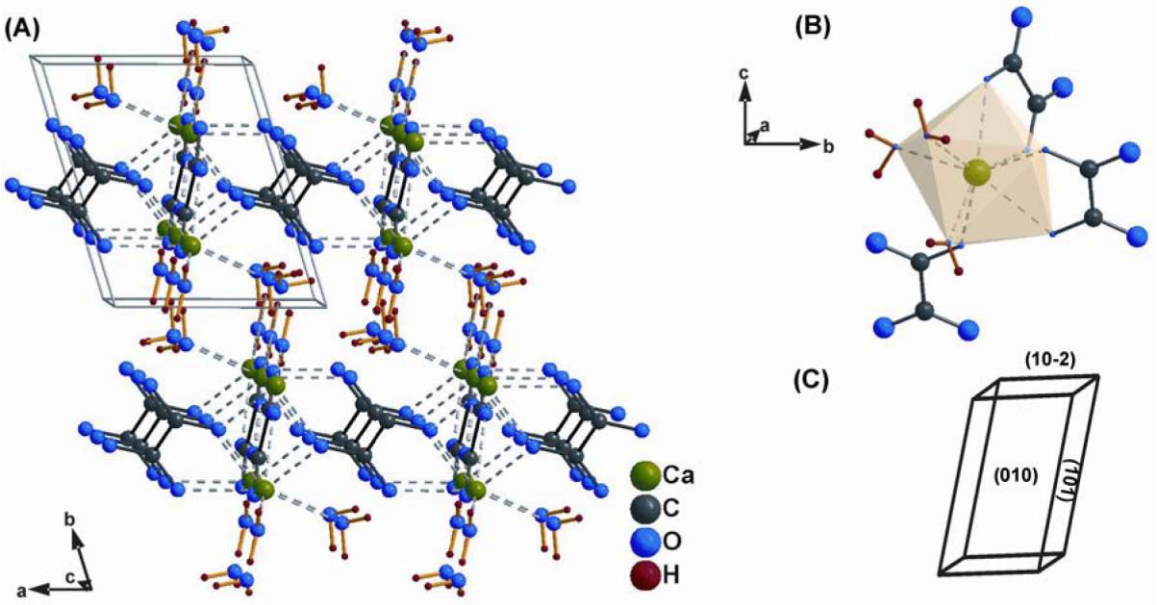
Slika 13. Karakteristične morfologije COD - a) tetragonalna bipiramida s prizmom, b) tetragonalna bipiramida

Kinetika taloženja COD je slabo istražena zbog ograničenih eksperimentalnih uvjeta kod inicijalnog taloženja. Kinetika COD se najčešće povezuje s transformacijom u termodinamički stabilan COM. Pretpostavka je, uz pojedine literaturne dokaze, da taloženje COD favorizira viši omjer $c(Ca^{2+})/c(C_2O_4^{2-})$, niska prezasićenost, prisutnost različitih aditiva (citrata, magnezija,…), otopina umjetnog urina te viši pH (pH ≥ 6) [6,50].

2.4.3 Kalcijev oksalat trihidrat (COT)

Pojava COT u sastavu bubrežnih kamenaca je vrlo rijetka, a eksperimentalno je pokazano da je sinteza COT olakšana u sustavu s povišenom ionskom jakosti [8], kao što je sinteza u kompleksnijem sustavu. Transformacija COT u COM se odvija izravnim prijelazom bez dobivanja COD kao međuprodukta [38].

COT kristalizira u triklinskom sustavu s parametrima jedinične ćelije: a = 12,371 Å, b = 14,583 Å, c = 10,116 Å, Z = 8, α = 76,5°, β = 70,35°, γ = 70,62°, V = 325,9 Å^3, prostorna grupa $P\bar{1}$ [51]. Atom kalcija koordiniran je s tri od osam kisikovih atoma od molekule vode, četiri atoma od dva oksalatna iona, dok jedan potječe od trećeg oksalatnog iona. Što znači da sveukupno u poliedarskoj koordinaciji imamo tri oksalatna iona i tri molekule vode (**Slika 14**.).

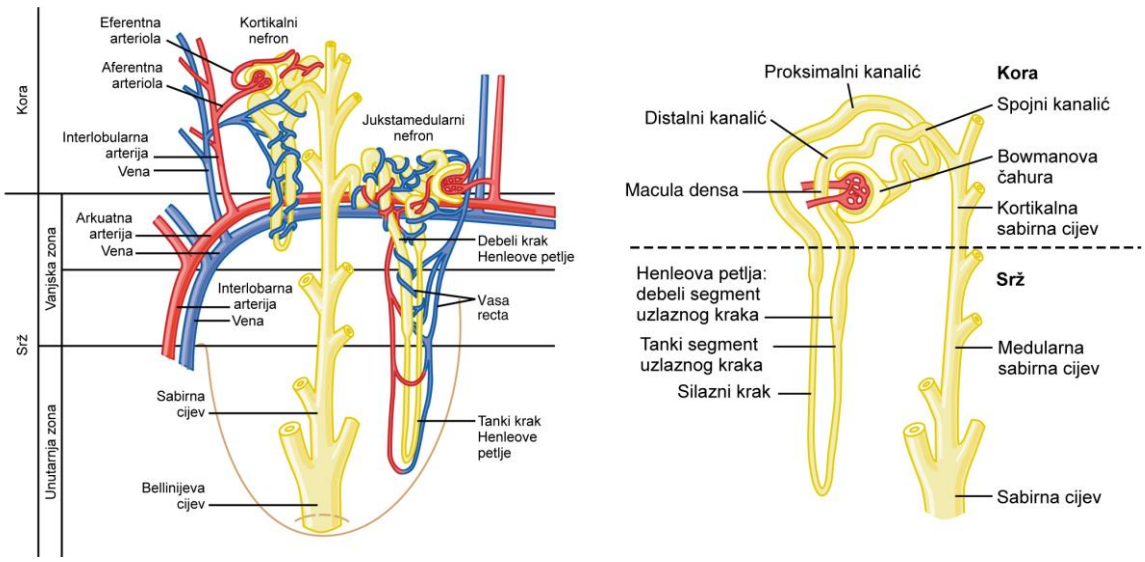


Slika 14. Prikaz strukturnih karakteristika hidratne faze COT – Struktura COT (A) i poliedar Ca^{2+} (B) [38].

2.5 Urin

Nefron je funkcionalna jedinica bubrega koja je odgovorna za stvaranje urina, a tekućina koja nastaje na kraju nefrona kao konačni produkt filtracije i reapsorpcije vode te niskomolekularnih tvari se naziva urin (mokraća). Svaki se ljudski bubreg sastoji od približno 800 000 do milijun nefrona, a svaki je nefron sposoban stvarati mokraću. Broj nefrona se postepeno može smanjivati uslijed bubrežnog oštećenja, bolesti ili uslijed starenja. Stoga se funkcionalnost nefrona obično smanjuje za približno 10 % svakih 10 godina, ali to ne mora predstavljati opasnost po život jer adaptacijske promjene preostalih nefrona omogućuju izlučivanje potrebne količine vode, elektrolita i ostalih razgradivih tvari.

Svaki nefron sadrži splet glomerularnih kapilara (glomerul) kroz koji se velika količina tekućine filtrira iz krvi u kanalić (tubul) gdje se filtrirana tekućina pretvara u urin na putu do bubrežne nakapnice [52]. Mokrenje je, najjednostavnije opisano, proces u kojem se prazni mokraćni mjehur. Mokraćni mjehur je glatkomišićna komora koja ima sposobnost punjenja sve dok napetost njegove stijenke ne dosegne neku graničnu vrijednost, čime senzorička vlakna prate stupanj istegnutosti stjenke mokraćnog mjehura i time potaknu živčani refleks tj. autonomni refleks kralježične moždine (refleks mokrenja). U simpatičkim živcima se nalaze i pokoja senzorička vlakna koja su važna i za osjet boli, osim za osjećaj napunjenosti mjehura.



Slika 15. Shematski prikaz odnosa između krvnih žila i tubularnih struktura nefrona [52].

Mokraćni sustav i kardiovaskularni sustav pronalaze poveznicu u krvi, odnosno krvnoj plazmi. Krvna plazma je žućkasta tekućina koja sadrži različite ione (natrij, kalij, magnezij, kloridi,…) te anorganske i organske molekule. Od tih molekula se mogu izdvojiti proteini, glukoza, različite soli, hormoni, aminokiseline i voda, ali u krvnoj plazmi se nalaze i različiti razgradni proizvodi koji se mogu izlučiti bubrezima.

Na **Slici 15.** možemo vidjeti anatomiju nefrona. Stvaranje urina se može podijeliti u tri procesa: a) filtracija u glomerularnim kapilarama gdje dolazi do razdvajanja makromolekula (proteini, krvne stanice) od onih manjih jedinica kao što je glukoza, aminokiseline, urea, ioni i voda. Stoga, prisutnost proteina u mokraći može ukazivati na potencijalni poremećaj filtracije bubrega; b) reapsorpcija u kanalićima što upućuje na prijenos tvari iz kanalića nefrona u peritubularne kapilare i na kraju c) tubularna sekrecija kojom dolazi do dodatnog uklanjanja razgradivih proizvoda iz krvne plazme.

Tvari dolaze kroz aferentnu (ulaznu) arteriolu u glomerul pod visokim tlakom. Manje čestice difundiraju kroz membranu Bowmanove čahure, ostavljajući veće molekule u glomerulu koje će se ukloniti kroz eferentnu (izlaznu) arteriolu. Bistra, izdvojena tekućina s manjim česticama se naziva filtrat koja prolazi kroz proksimalni kanalić i ovisno o potrebi organizma, neke se tvari mogu reapsorbirati iz nefrona u krv (HCO_3^-, H_2O, Na^+, Cl^-, aminokiseline,…). Tijekom protjecanja glomerulnog filtrata, vrši se reapsorpcija vode i drugih otopljenih tvari male molekulske mase (npr. NaCl) u peritubularne kapilare koje okružuju bubrežne kanaliće. Nereapsorbirani dio tekućine čini urin. Takav filtrat protječe kroz Henleovu petlju, odnosno kroz silazni krak gdje dolazi do reasorpcije vode ili do reasorpcije iona (Na^+, Cl^-,…) i sekrecije ureje, dok kroz uzlazni krak dolazi do razrjeđenja tekućine. Nastala tekućina prolazi kroz distalni zavijeni kanalić gdje dolazi do sekrecije NH_3 iz glutamina, H^+, K^+ iona ili lijekova gdje pronalazi put do sabirne cijevi. U sabirnoj cijevi tekućina može nastaviti put u razrijeđenom obliku ili se voda dodatno može reapsorbirati pri čemu nastaje koncentriraniji urin koji nastavlja put do mokraćovoda. Preko hormona koji djeluju na bubrežnu funkciju, tijelo ima sposobnost kontroliranja koncentracije mokraće prema potrebi za vodom.

Vrlo je bitno spomenuti i acidobaznu ravnotežu u kojoj bubrezi imaju ključnu ulogu u regulaciji izdavanja H^+ iona (i ostalih iona) izlučivanjem kiselog ili bazičnog urina [52]. Izlučivanjem kiselog urina smanjuje se količina kiseline u izvanstaničnoj tekućini, dok se bazičnom odstranjuje baza iz izvanstanične tekućine. Pri tom važnu ulogu imaju acidobazni puferi koji kontroliraju koncentraciju H^+ iona. Bubrezi posebice imaju važnu ulogu kod odstranjivanja nehlapljivih kiselina koje se ne mogu izdahnuti plućima. Pluća su zadužena za održavanje

koncentracije CO_2 koji se veže za vodu i nastaje ugljična kiselina H_2CO_3. Ovdje glavnu ulogu ima hidrogenkarbonatni pufer koji se sastoji od slabe, ugljične kiseline H_2CO_3 i njezine soli, $NaHCO_3$. Enzim karboanhidraza ima ulogu stvaranja ili disocijacije ugljične kiseline i regulacije CO_2 prema:

$$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{karboanhidraza}} H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \quad \text{(najčešće s } Na^+\text{)} \qquad (16)$$

Reakcija je vrlo spora bez enzima koji je posebice zastupljen u stijenkama plućnih alveola gdje se izdaje CO_2 te u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića gdje nastaje ugljična kiselina. Ugljična kiselina je slaba kiselina pa slabo disocira. Hidrogenkarbonatni sustav je najefikasniji jer se koncentracija CO_2 može fino podešavati ventilacijom alveola, dok se koncentracije H^+ i HCO_3^- isti tako nijansirano regulira bubrežnim izlučivanjem. Kada se hidrogenkarbonatnom puferu doda jaka kiselina, tada će HCO_3^- puferirati H^+ ione pri čemu nastaje ugljična kiselina, odnosno CO_2 i H_2O pri čemu se intenzivno aktivira dišni sustav.

Bubrezi reguliraju pH reapsorpcijom HCO_3^- iona iz proksimalnih kanalića (u manjoj mjeri i u distalnom kanaliću i sabirnoj cijevi) prilikom čega se povećava koncentracija reapsorbiranog HCO_3^- uslijed veće koncentracije H^+ iona. Hidrogenkarbonatni ioni odfiltrirani u glomerulu ne mogu se izravno reapsorbirati zbog nemogućnosti prolaska iona kroz membranu stanica bubrežnih kanalića. Stoga će se na HCO_3^- prvo vezati H^+ da bi nastala kiselina koja daje CO_2 i vodu koja je zatim membranski propusna te će ponovno stvoriti kiselinu koja disocira – nastaje nova HCO_3^- jedinka.

U bubrežnu regulaciju su još uključeni i fosfatni (HPO_4^{2-}) i amonijačni puferi (iz svake molekule glutamina nastaje dva NH_4^+ iona i dva nova hidrogenkarbonatna iona) čiji zajednički rad daje približni pH raspon urina od 4,5 – 8,0, iako su moguće vrijednosti i iznad veće granične vrijednosti uslijed infekcija, genetskih poremećaja i konzumiranja određenih lijekova. Urin je u normalnim prilikama blago kiseo s približnim pH = 6,0 - 6,5 (vrlo je slična pK fosfatnog pufera (pK = 6,8)), a ta vrijednost može varirati kroz period od 24 sata. Značajna količina organskih, ponajviše anorganskih tvari (Na^+, Cl^-, Mg^{2+}, Ca^{2+},..) daje fiziološku ionsku jakost od oko 0,33 mol dm^{-3}.

2.5.1 Taloženje u kompleksnom sustavu umjetnog urina

Koncept sinteze u umjetnom urinu možemo reći da pripada polju biomimetičke kemije koja se bavi proučavanjem kemijskih postupaka koji za glavni cilj imaju oponašanje procesa i spojeva koje nalazimo u prirodi. Pod umjetnim urinom podrazumijevamo otopinu različitih kemikalija sa sastavom i uvjetima koji pobliže opisuju onaj ljudski, odnosno biološki urin. Mnogo je istraživača pokušalo pripremiti otopinu urina koja će biti što sličnija pravom urinu, međutim mnoge vrijednosti koncentracija kemijskih vrsta koje su primarno predložene nisu odgovarale vrijednostima u pravom urinu. Stoga su Burns i Finlayson 1980. godine objavili rad u kojem su iznijeli svoje istraživanje i iterativnu simulaciju za pojedine komponente umjetnog urina nazvan EQUIL [53]. Program simulira ravnotežne reakcije i daje stvarne koncentracije pojedinih kemijskih komponenti u zadanim uvjetima. Na taj su način dobili odgovarajući recept za umjetni urin koji mnogi i danas koriste i smatraju ga referentnim receptom umjetnog urina koji služi određenom tipu istraživanja (npr. taloženje kalcijeva oksalata).

Tablica 3. Usporedba protokola umjetnih urina različitih autora

	KONCENTRACIJA / mmol dm^{-3}						
KOMPONENTE	Isaacson [54]	Doremus [55]	Miller [56]	Barker [57]	Rose [58]	Brown [50]	Burns i Finlayson [53]
Na_2SO_4	14,9	16,5	23,4	16,5	14,9	16,95	16,95
KCl	92,6	25,0	111,5	52,0	92,6	63,70	63,70
NH_4Cl	65,1	20,0	59,5	-	65,1	-	27,60
NH_4OH	-	-	-	20,0	-	17,90	17,90
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6,7	2,0	8,1	2,0	6,7	3,85	3,85
Na_2HPO_4	1,8	-	4,1	13,0	1,8	32,30	32,30
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	39,6	16,5	29,9	3,5	39,6	-	-
NaCl	213,9	170,0	158,3	170,0	213,9	105,50	105,50
Citrate	2,7	1,6	2,7	1,6	2,7	3,21	3,21
Urea	291,4	500,0	-	500,0	291,4	-	-
Kreatinin	-	13,0	-	13,0	-	-	-
Hipurinska kiselina	-	3,0	-	3,0	-	-	-
Mokraćna kiselina	-	-	-	3,0	-	-	-
pH	5,4	5,7	-	6,5	5,4	6,50	6,50

U **Tablici 3.** je napravljena usporedba protokola priprave umjetnog urina različitih autora. Uobičajeno umjetni urin sadrži sljedeće komponente: natrijev i/ili kalijev klorid, natrijev sulfat, magnezijev sulfat, različite natrijeve fosfate, ureu, natrijev oksalat, kalcijev klorid i natrijev citrat. Istraživanjem u ovakvom jednom sustavu mogu se pobliže opisati uvjeti u kojima dolazi

do taloženja, ali isto tako i kontrolirati čimbenici koji mogu promovirati ili inhibirati taj proces. U svrhe pripreme urina i istraživanja za ovaj diplomski rad, kao referentni recept se iskoristio protokol Burnsa i Finlaysona uz manje modifikacije za potrebe sinteze kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije.

2.5.2 Čimbenici koji utječu na taloženje bubrežnih kamenaca u urinu

S kemijskog stajališta, prvi korak do nastajanja taloga ili kristala jest nukleacija što je već opisano u prethodnim poglavljima. Tada nastaju centri ili nukleusi na kojima može doći do spontanog rasta. Nukleusi nove faze nastaju spontano homogenom nukleacijom iznad kritične prezasićenosti, ali do taloženja može doći i ispod kritične vrijednosti ukoliko su u mediju prisutne nečistoće pa tada govorimo o heterogenoj nukleaciji.

Urin, kao što je to već prethodno spomenuto, sadrži veliki broj spojeva što od prehrane, lijekova i slično. Značajna količina anorganskih i organskih molekula daje fiziološku ionsku jakost urina približno 0,33 mol dm^{-3} te raspon pH od 4,5 – 8,0 koji uglavnom ne prelazi te granice uz acidobaznu ravnotežu koja je uspostavljena bubrežnom regulacijom. Postoje literaturni pregledi koji upućuje da različite infekcije, poremećaji i lijekovi mogu povisiti pH iznad više, granične vrijednost od pH = 8,0 [9,10]. Mnoga istraživanja pokazuju da je pH presudni čimbenik u formiranju kristala kalcijeva oksalata, ali da utječu na formiranje pojedine hidratne faze te na morfologiju kristala. Već je otprije poznato da COM favorizirano taloži i agregira u kiselijem mediju (urinu), a istraživanja na COM su od velike važnosti, posebice zbog njegove patogenosti. U prijašnjim provedenim istraživanjima utvrđeno je da važnu ulogu ima i promjena temperature sustava, koncentracija reaktanata, uspostavljena ionska jakost, mehanički utjecaji te prisutnost aditiva [6].

Različite molekule ili ioni mogu ubrzati ili usporiti taloženje anorganskih soli. Urin je sam po sebi prezasićen s obzirom na COM, ali to nije dovoljan preduvjet da dođe do taloženja. Razlog tom ponašanju je zapravo činjenica da urin sadrži prirodne inhibitorne tvari kao što su glikozaminoglikani, glikoproteini, citrat te magnezij. Glikozaminoglikani i glikoproteini su makromolekularni inhibitori koji djeluju na nukleaciju, na rast i agregaciju čime se sprječava blokada bubrežnih kanalića. Magnezij inhibitorno djeluje kompleksiranjem s oksalatnim ionom ili inkorporacijom u kristalnu rešetku kalcijeva oksalata [59]. Za citrat se pokazalo da također djeluje inhibitorno na nukleaciju, rast i agregaciju kalcijeva oksalata u vodenom mediju, ali u razrijeđenom i koncentriranom urinu [59]. Zapravo je ta pojava razlog velikog afiniteta citrata kao kelirajućeg agensa za kalcij, ali i vezanja za površinu kristala. Iako se u vodenom mediju

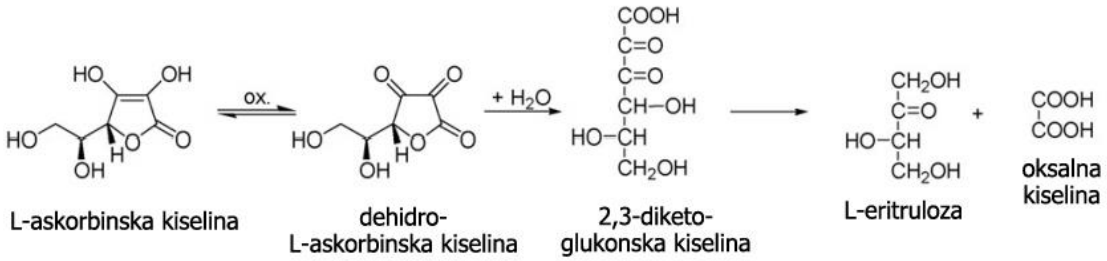
pokazalo da citrat ima važnu ulogu kod inhibicije taloženja kalcijeva oksalata, za urin to još uvijek nije dokazano.

Istraživačima najviše informacija o sastavu urina pojedinca ili pacijenta daje 24-satni urin. Tada se mogu dijagnosticirati poremećaji ili odrediti preventivne mjere. Sklonost formiranju kamenaca se može odrediti s obzirom na koncentracije pojedinih kemijskih vrsta, posebice kalcija, oksalata, fosfata, mokraćne kiseline ili prema rasponu pH vrijednosti urina. Međutim postoje klinička stanja ili poremećaji uslijed povećanog ili smanjenog izlučivanja pojedine tvari u urinu, a koji mogu doprinijeti ili inhibiciji ili promoviranju procesa nastanka bubrežnih kamenaca te razlikujemo: hipokalciuriju, hiperkalciuriju, hiperoksaluriju, hipocitraturiju te hipercitraturiji. Prefiks hipo- upućuje na smanjeno izlučivanje, dok hiper- na povećano izlučivanje pojedine kemijske vrste u urinu.

Hiperkalciurija je jedan od najistraživanijih poremećaja na području studija bubrežnih kamenaca. Jedan od razloga je što se hiperkalciurija javlja kod približno 60 % osoba oboljelih od bubrežnih kamenaca. Poremećaj hiperkalciurije se inače dijagnosticira ukoliko dnevna, izlučena količina kalcija u urinu prelazi granične i normalne vrijednosti od 7,5 mmol kod muškaraca te 6,5 mmol kod žena. Inače se smatra vrlo bitnim čimbenikom kod stvaranja bubrežnih kamenaca s obzirom da veća količina izlučenog kalcija znači i veće zasićenje s obzirom na kalcijev oksalat i fosfat. Naravno, smatra se da i poremećaji povećanog ili smanjenog izlučivanja citrata mogu imati inhibitorni utjecaj, odnosno kod smanjene koncentracije može djelovati promovirajuće na stvaranje bubrežnih kamenaca [60].

2.5.3 Hiperoksalurija

Hiperoksalurija je metabolički poremećaj koji je definiran kao povećano izlučivanje oksalata urinom. Oksalna kiselina je relativno jaka kiselina, a u organizmu se može metabolizirati različitim putevima: stvaranje oksalne kiseline iz serina i etanolamina, moguće je stvaranje i iz hidroksiprolina, zatim iz glicina. Postoje indikacije da male količine oksalne kiseline mogu nastati i razgradnjom L-askorbinske kiseline prema **Slici 16.**



Slika 16. Metaboliziranje L-askorbinske kiseline do oksalne kiseline

Prvo L-askorbinska kiselina oksidacijom stvara lakton te hidrolizom istoga nastaje glukonska kiselina. Cijepanjem C-C veze nastaju dva međuprodukta od kojih je jedan oksalna kiselina. Upravo bi ovaj mehanizam upućivao da L-askorbinska kiselina može imati promovirajući utjecaj na stvaranja kalcijeva oksalata povećavajući koncentracije oksalata u organizmu, iako ova pretpostavka znanstveno i klinički nije dokazana [59].

Hiperoksalurija se dijagnosticira ukoliko vrijednosti oksalata koji se izlučuje urinom prelaze normalne granične vrijednosti od 20 - 40 mg na dan (od 0,22 do 0,44 mmol), dok se vrijednosti oksalata od 50 do 60 mg (0,56 do 0,67 mmol) ostvaruju povećanim unosom oksalata prehranom. Hiperoksalurija djeluje promovirajuće na stvaranje bubrežnih kamenaca zasićenjem urina s obzirom na kalcijev oksalat.

Poremećaj se može javiti kao primarna ili sekundarna hiperoksalurija, ovisno o koncentraciji izlučenog oksalata urinom i o biokemijskom putu stvaranja oksalata [2].

2.5.3.1 Primarna hiperoksalurija

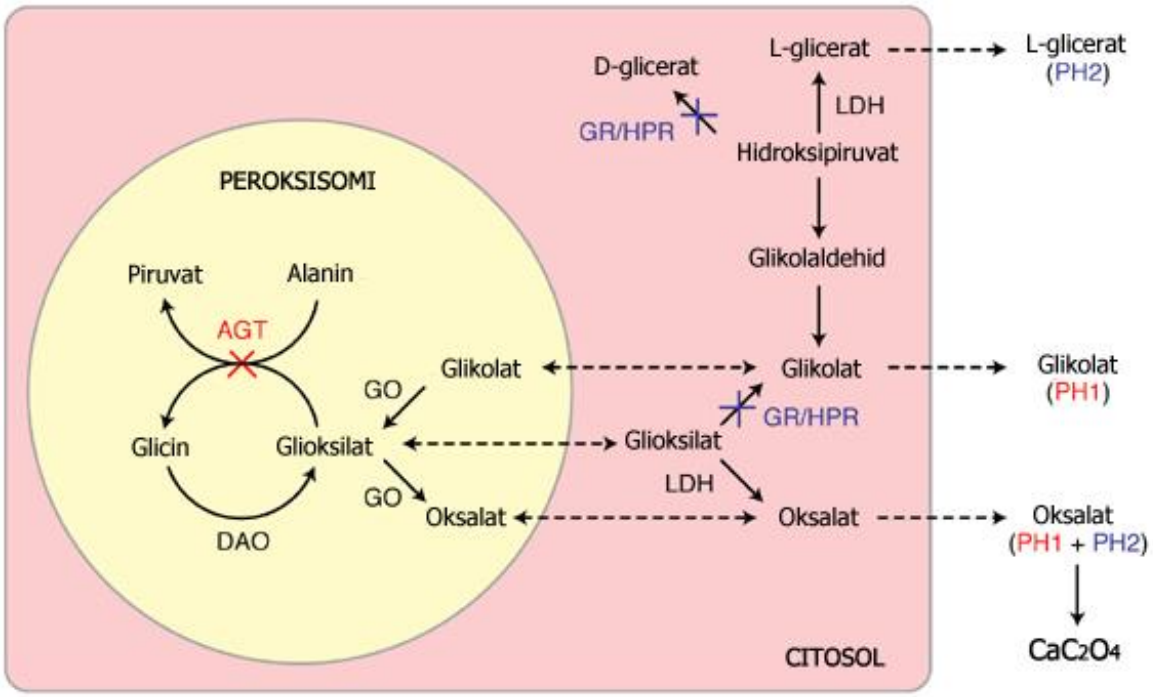
Primarna hiperoksalurija (PH) je metabolički poremećaj koji je posebno je izražen kod djece. Ukoliko se posumnja na prisutnost poremećaja kod osobe, urin se analizira na kemijske komponente glioksilata i glicerata [61]. Dijagnoza se postavlja ukoliko koncentracija izlučenog oksalata doseže vrijednosti iznad 100 mg na dan, točnije u rasponu od 135 do 270 mg (1,35 do 3,00 mmol). Primarna se hiperoksalurija se dijeli na Tip 1 (PH1) i Tip 2 (PH2) s obzirom na disfunkciju ili odsutnost pojedinog enzima kojim dolazi do neizravne regulacije oksalata u jetri [62].

PH1 nastaje zbog odsutnosti enzima jetre alanin-glioksilat transferaze (AGT) uslijed čega dolazi do povećanog stvaranja glioksilata koji se ireverzibilno pretvara u oksalnu kiselinu. Poremećaj u radu enzima AGT u peroksisomima jetre onemogućava transaminaciju glioksilata u glicin te dolazi do oksidacije u oksalat. Peroksisomalni glioksilat također može nastati iz glicina s pojačanom aktivnošću enzima D-aminokiselina oksidaza (DAO) ili glikolat oksidazom (GO) iz glikolata [59]. Normalnim tijekom reakcije transaminacije glioksilata nastaje glicin i piruvat, međutim uslijed disfunkcije enzima dolazi do nakupljanja glioksilata koji se može metabolizirati na sljedeće načine (**Slika 17**) [2,63]:

Glioksilat se reducira u glikolat enzimom glioksilat/hidroksipiruvat reduktazom. Glioksilat se također može oksidirati u glikolat u reakciji kataliziranoj enzimom glikolat oksidazom (GO). Zapravo se ova točka biokemijskog puta smatra regulacijskom točkom enzima. Mnoga istraživanja na miševima upućuju da se inhibicijom enzima glikolat oksidaze (GO) u primarnoj hiperoksaluriji može reducirati stvaranje kalcijeva oksalata. Ali i većinom su istraživanja usmjerena upravo na enzimatsku aktivnost glikolat oksidaze. Vitamin B6 (piridoksin) se pokazao izvrsnim za liječenje hiperoksalurije, iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti istražen. Smatra se da može utjecati inhibitorno na stvaranje oksalata djelovanjem kao kofaktor AGT enzima povećavajući njegovu katalitičku aktivnost. Nadalje, jedan od načina stvaranja oksalata jest da se glioksilat transportira u citosol gdje se u reakciji kataliziranoj enzimom laktat dehidrogenazom (LDH) oksidira u oksalat.

Primarna hiperoksalurija tipa 2 (PH2) se javlja rjeđe i u ranijoj životnoj dobi uslijed odsutnosti ili disfunkcije enzima glioksilat/hidroksipiruvat reduktazom (GR/HPR) što uzrokuje inhibitorni učinak na redukciju glioksilata u glikolat te hidroksipiruvata u D-glicerat u citosolu. Tada dolazi do prekomjernog stvaranja međuprodukta L-glicerata u citosolu, odnosno povećane koncentracije oksalata u organizmu. Iz međuprodukta hidroksipiruvata u reakciji

dekarboksilacije potpomognutoj enzimom hidroksipiruvat dekarboksilazom nastaje glikolaldehid koji se može oksidirati u glikolat.



Slika 17. Biokemijski put, odnosno metaboliziranje oksalata uslijed primarne hiperoksalurije [63].

Postoji i Tip 3 (PH3) koji je vrlo rijedak, a manifestira se mutacijom na HOGA1 genu koji dovodi do disfunkcije enzima 4-hidroksi-2-oksoglutarat aldolaze (HOGA), što za posljedicu ima povećano izlučivanje oksalata urinom [62].

2.5.3.2 Sekundarna hiperoksalurija

Sekundarna se hiperoksalurija (SH) javlja češće u odnosu na PH te se manifestira kroz povećanu apsorpciju oksalata u crijevima pa govorimo o enteričkoj hiperoksaluriji ili uzrok može biti i neadekvatna prehrana bogata oksalatom te govorimo o prehrambenoj hiperoksaluriji. Moguća je pojava i takozvane idiopatske hiperoksalurije gdje je uzrok poremećaja nepoznat [63].

Enterička hiperoksalurija se najčešće javlja uslijed kroničnih crijevnih bolesti, a osobe oboljele od poremećaja izlučuju manji volumen urina i dolazi do smanjene ekskrecije kalcija, magnezija i citrata [63]. Vrijednosti izlučenog oksalata urinom enteričkom hiperoksalurijom dosežu vrijednosti iznad 100 mg na dan (1,11 mmol). Prehrambena hiperoksalurija se javlja zbog konzumiranja hrane bogatom oksalatima kao što je špinat, naranča, čokolada, soja, kelj te malina.

2.6 Predviđanje stabilnosti otopine

2.6.1 Temeljni kemijski principi

Elektrolitna otopina može biti stabilna (zasićena ili podzasićena otopina) ili nestabilna (prezasićena otopina). U uvjetima podzasićene otopine taloženje čvrste faze nije moguće, a postojeći kristali će se u dodiru s otopinom otapati. Kod zasićene otopine govorimo o ravnotežnom sustavu u kojem je kemijski potencijal tvari u otopini jednak kemijskom potencijalu kristala u otopini. Izraz za razliku kemijskog potencijala opisan je jednadžbom (5).

U prezasićenoj otopini je, kao što je to već spomenuto, moguće nastajanje jedne ili više čvrstih faza. Prezasićenu otopinu je moguće prirediti iz zasićene ili podzasićene otopine promjenom različitih parametara poput temperature ili pH, dodatkom slabog otapala u otopinu jakog otapala ili odgovarajućom kemijskom reakcijom.

Taloženje čvrste faze iz elektrolitne otopine prikazano je jednadžbom u stehiometrijskom omjeru:

$$\alpha A^{a+}_{(aq)} + \beta B^{b-}_{(aq)} \rightleftharpoons A_\alpha B_{\beta(s)} \tag{17}$$

Aktivitet tvari (a) je definiran kao efektivna koncentracija neke tvari u otopinama elektrolita, a opisan je umnoškom koeficijenta aktiviteta (γ) i koncentracije (c), dok c^0 predstavlja standardnu koncentraciju koja iznosi 1 mol dm^{-3}. Za danu reakciju slijedi:

$$a(A^{a+}) = \frac{\gamma(A^{a+}) \cdot c(A^{a+})}{c^0} \tag{18}$$

$$a(\mathrm{B}^{b-}) = \frac{\gamma(B^{b-}) \cdot c(B^{b-})}{c^0} \tag{19}$$

Produkt aktiviteta iona (π ili *IAP*) je vrlo koristan parametar kod predviđanja prezasićenosti otopine. Definiran je umnoškom aktiviteta iona pojedine kemijske vrste prema:

$$\pi = a(\mathrm{A}^{a+}) \cdot a(\mathrm{B}^{b-}) \tag{20}$$

Također je u modeliranju ili predviđanju stupnja prezasićenosti vrlo važan i stehiometrijski produkt topljivosti, K_{sp}. Iako nam termodinamički produkt topljivosti K^0_{sp} daje prave vrijednosti za svaku tvar, tu vrijednost je teže izračunati zbog efektivne koncentracije iona. Stoga se u

većini slučajeva koristi stehiometrijski produkt topljivosti, nazivan samo produkt topljivosti K_{sp}.

$$K^0_{sp} = ((a(\mathrm{A}^{a+}))^{\alpha} \cdot (a(\mathrm{B}^{b-}))^{\beta})_{eq} = \pi_{eq} \tag{21}$$

$$K_{sp} = (c(\mathrm{A}^{a+}))^{\alpha} \cdot (c(\mathrm{B}^{b-}))^{\beta} \tag{22}$$

Poveznicu između termodinamičke i stehiometrijske konstante topljivosti možemo dobiti uvrštavanjem jednadžbe (22) u (21) prema relaciji:

$$K^0_{sp} = K_{sp} \frac{\left[(\gamma(A^{a+}))^{\alpha} \cdot (\gamma(B^{b-})^{\beta}\right]}{(c^0)^{(\alpha+\beta)}} \tag{23}$$

Kada se sve sumira, stabilnost otopine se može predvidjeti i preko termodinamičkog produkta topljivosti K^0_{sp} i preko produkta aktiviteta iona π za dane uvjete:

1. $\pi < K^0_{sp}$; otopina je stabilna, podzasićena (taloženje čvrste faze iz takve otopine nije moguće)

2. $\pi = K^0_{sp}$; otopina je stabilna, zasićena – ravnotežni sustav, π_{eq}

3. $\pi > K^0_{sp}$; otopina je nestabilna, prezasićena.

Iz priloženog je moguće uočiti da je vrlo bitno odrediti koeficijent aktiviteta, γ kako bi se mogao odrediti stupanj prezasićenosti otopine. Inače, koeficijent aktiviteta opisuje odstupanje realne otopine od idealne uslijed interakcija iona u otopini. Uobičajeno se određuje preko Debye-Hückelove jednadžbe koja je u određenim slučajevima limitirajuća:

$$-\log \gamma_z = A_{DH} \left| z_+ \, z_- \right| \sqrt{\frac{I_c}{c^0}} \tag{24}$$

gdje je γ oznaka za koeficijent aktiviteta iona, A_{DH} oznaka za Debye - Hückelovu konstantu koja je ovisna o temperaturi izraženoj u °C i dielektričnoj konstanti otapala ε, c^0 je oznaka za standardnu koncentraciju koja iznosi 1 mol dm^{-3}, I_C je oznaka za ionsku jakost, dok je z nabojni broj iona. Vrijedi za ionske jakosti $I_C < 0{,}01$ mol dm^{-3} pa joj je primjena dosta ograničena.

Pojedina proširenja Debye - Hückelova jednadžbe uzimaju u obzir i veličinu iona jedinki za svaki ion. Stoga je pogodnije koristiti Daviesovu jednadžbu (26) kao jedno od proširenja Debye - Hückelove jednadžbe koja u račun uzima u obzir ionske jakosti I_C (25) u rasponu $0 < I_C < 0{,}5$ mol dm^{-3}.

$$I_c = \frac{1}{2}\sum_i c_i z_i^{\,2} \tag{25}$$

$$\log \gamma_{\mathrm{i}} = -A_{DH} z^2 \left(\frac{\sqrt{I_c}}{1+\sqrt{I_c}} - 0,3 I_c \right) \tag{26}$$

Prezasićenost se može definirati na razne načine, ali svaka će jednadžba sadržavati koncentracije kemijskih vrsti koje kristaliziraju, produkt topljivosti K_{sp} te produkt aktiviteta iona, π.

Prezasićenost se može definirati kao razlika kemijskih potencijala prezasićene i stabilne, zasićene otopine. Uzimajući u obzir te kemijske potencijale, jednadžbu za relativnu prezasićenost možemo svesti na:

$$S - 1 = \frac{a - a_s}{a_s} \tag{27}$$

gdje je *S-1* oznaka za relativnu prezasićenost, *a* za aktivitet iona u prezasićenoj otopini, a_s aktivitet iona u ravnoteži. Stupanj zasićenosti *S* izražava se preko produkta aktiviteta iona, π i termodinamičkog produkta topljivosti istaložene tvari, K^0_{sp} prema:

$$S = \frac{\sqrt{a(A^{a+}) \cdot a(B^{b-})}}{\sqrt{K^0_{sp}}} \tag{28}$$

Koji će se izraz ili definicija koristiti, ovisi prvenstveno o dostupnim podacima i poznavanja sastava otopine.

2.7 Metode identifikacije uzoraka

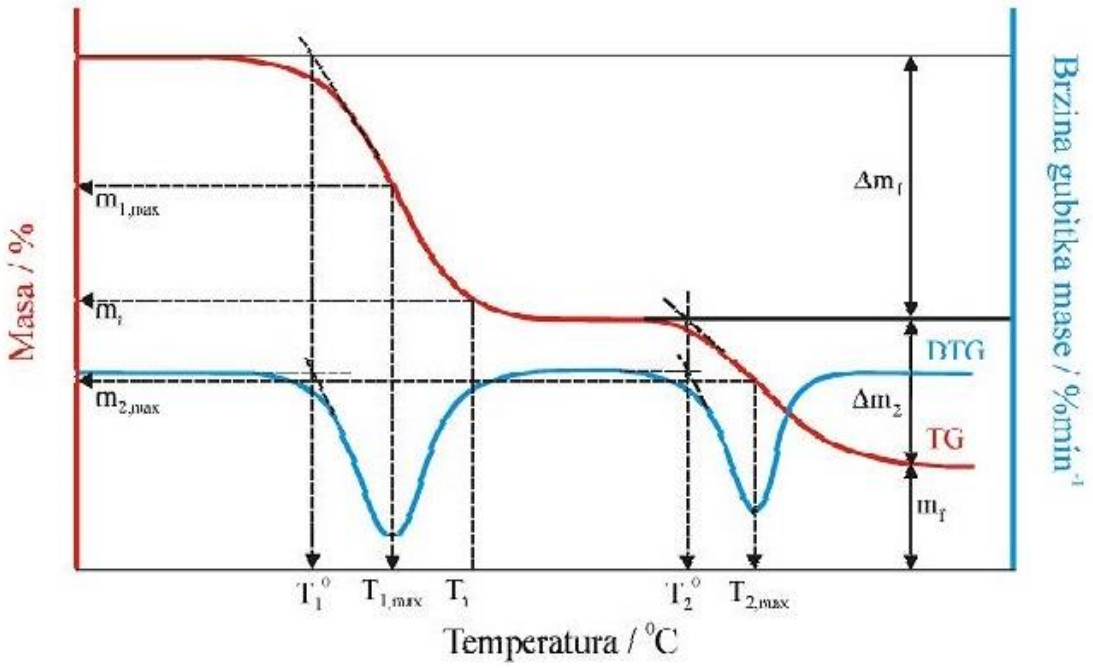
2.7.1 Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska metoda je jedna od eksperimentalnih termičkih tehnika koja istražuje kemijske i fizikalne karakteristike tvari u funkciji vremena ili temperature u kontroliranoj atmosferi (O_2, N_2, zrak,…). Termičke metode ispituju promjene veličine stanja kao što je masa tvari, primijenjena temperatura da bi se okarakterizirala pojedina tvar (kemijski sastav, talište, promjena faze,…). Pod fizikalne promjene se podrazumijeva sublimacija, isparavanje i uključuje informacije o apsorpciji, adsorpciji ili desorpciji, dok kemijske promjene uključuju kemisorpciju, dehidrataciju ili razgradnju nekog spoja. Upravo se ove promjene mogu odvijati uz konstantnu brzinu porasta temperature u funkciji vremena pa govorimo o izotermalnim metodama ili neizotermalnim koja se odvija u funkciji temperature.

Termogravimetrijska metoda se najčešće koristi za procjenu toplinske stabilnosti ili ispitivanje mehanizma raspada neke tvari. Rezultat neizotermne analize je termogravimetrijska krivulja, odnosno grafički prikaz (termogram), prikazana kao promjena mase uzorka Δm u ovisnosti o promjeni temperature najčešće izražena u °C (**Slika 18.**). Svaki termogram sadrži karakteristične točke koje daju potrebne informacije za karakterizaciju uzoraka.

Instrument koji se koristi u termogravimetrijskoj analizi se naziva termovaga, a sastoji se od precizne vage te peći kontrolirane temperaturnim programerom. Računalo spojeno na instrument bilježi promjene koje se odvijaju uslijed zagrijavanja ispitivanog uzorka. Zdjelica u koju se dodaje uzorak se uvlači u peć gdje se uzorak kontrolirano zagrijava. Termovage su vrlo precizne i osjetljive. Vaga je, kako bi se održala preciznost, zaštićena toplinskim štitovima i propuhivanjem inertnog plina kroz kućište, dok se konstantna temperatura održava regulacijom temperature.

Pojedini instrumenti imaju mogućnost analize diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC). To je metoda kojom se mjeri količina energije, odnosno topline koja se apsorbira ili oslobađa tijekom zagrijavanja ili hlađenjem uzorka pri konstantnoj temperaturi. Kako bi se napravila potpuna karakterizacija uzorka, najčešće se koristi kombinacija navedenih metoda.



Slika 18. Karakteristične točke termograma

Najvažnije točke na termogramu su:

$T°$ – temperatura početka razgradnje (engl. *onset*) – određuje se kao sjecište tangenti povučenih uz baznu liniju i uz silazni dio krivulje DTG u točki minimuma / °C

T_{max} – temperatura pri maksimalnoj brzini razgradnje – određuje se kao temperatura minimuma krivulje DTG / °C

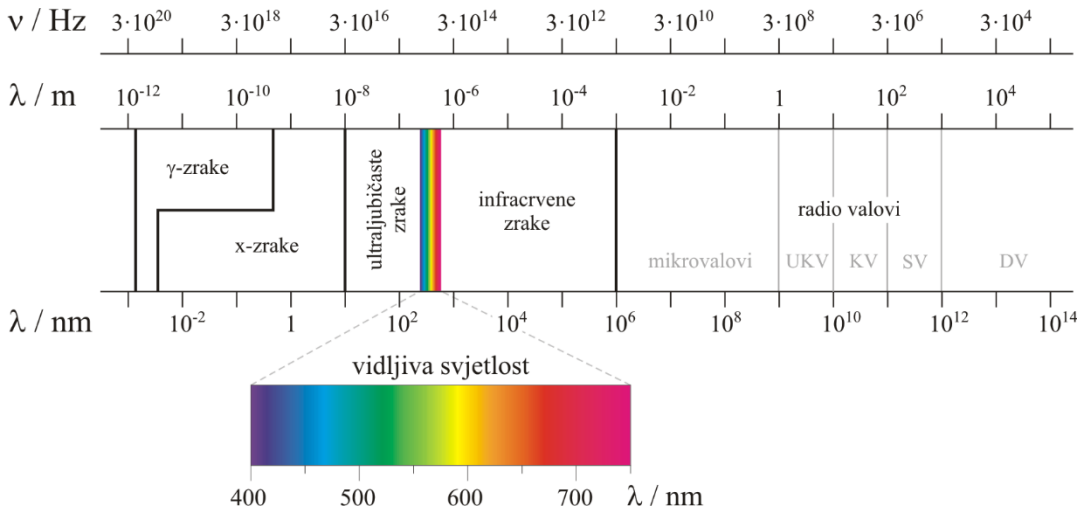
m_f – konačna masa uzorka / g

R_{max} – brzina gubitka mase uzorka / %

Δm – gubitak mase uzorka / g

2.7.2 Infracrvena spektroskopija (FTIR)

Infracrvena spektroskopija je jedna od najčešće korištenih metoda za strukturnu karakterizaciju spojeva, a temelji se na interakciji molekula s infracrvenim zračenjem. Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje u rasponu valnih duljina od 0,7 μm do 500 μm (**Slika 19.**).



Slika 19. Grafički prikaz elektromagnetskog spektra

S obzirom na područje u elektromagnetskom spektru i energiji, odnosno valnoj duljini zračenja, infracrveno područje možemo podijeliti na blisko, srednje i daleko područje što je pobliže prikazano u **Tablici 4.**

Tablica 4. Podjela infracrvenog područja prema pripadajućim valnim duljinama, odnosno valnim brojevima

PODRUČJE	VALNA DULJINA	VALNI BROJ
1. BLISKO	0,7 μm – 2,8 μm	1400 cm^{-1} – 3600 cm^{-1}
2. SREDNJE	2,8 μm – 50 μm	3600 cm^{-1} – 200 cm^{-1}
3. DALEKO	50 μm – 500 μm	200 cm^{-1} – 20 cm^{-1}

Da bi molekula apsorbirala infracrveno zračenje, mora postojati promjena dipolnog momenta koji se mijenja vibracijom određenog dijela molekule. Takve molekule nazivao IR aktivnim molekulama. Naime, samu interakciju infracrvenog zračenja s određenom tvari možemo objasniti promjenom dipolnog momenta povezanom s rotacijom i vibracijom molekula. Kada se IR zračenje apsorbira, amplitude oscilacije rastu, razmak između jezgara je veći, jače je i razdvajanje naboja što dovodi do veće promjene dipolnog momenta. Ako bismo molekulu

zamislili kao skupinu atoma povezanih vezama koje se ponašaju kao opruge, pomicanjem atoma dolazi do promjene u duljini i kutu veze, a tu pojavu nazivamo vibracijama. U srednjem području se odvija promjena vibracijskih razina većine molekula, dok se u dalekom opažaju promjene u rotacijskim razinama molekule. Obično se apsorpcija zračenja promatra u ovisnosti o valnoj duljini, odnosno njezinoj recipročnoj vrijednosti koja odgovara valnom broju.

Molekulske vibracije dijelimo na vibracije istezanja i vibracije deformacije (**Slika 20.**):

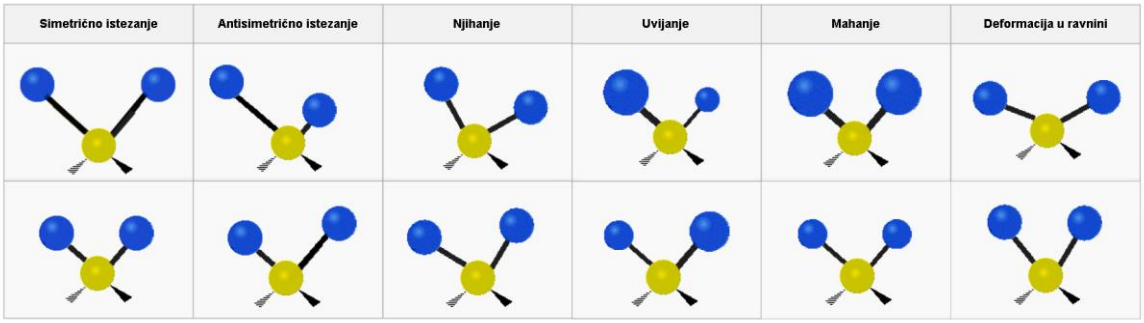
1) Vibracije istezanja

Istezanje može biti simetrično i antisimetrično i odvija se uzduž međunuklearne osi. Simetrično se istezanje događa kada se dvije jezgre istovremeno približavaju centru mase ili udaljavaju od njega. Antisimetrično istezanje se odvija kada se jedna jezgra približava centru mase, dok se druga udaljava.

2) Vibracije deformacije

Vibracije deformacije uzrokuju promjenu kuta između dvije veze koje vibriraju. Za tu vrstu vibracije potrebno je najmanje tri atoma. Dijeli se na:

Njihanje (eng. *rocking*)
Uvijanje (eng. *twisting*)
Mahanje (eng. *wagging*)
Deformacija u ravnini (eng. *scissoring*)



Slika 20. Shematski prikaz vibracija molekula

Klasični IR instrumenti su koristili individualne frekvencije pomoću optičkih uređaja, a sama analiza je i duže trajala s obzirom na današnje, naprednije uređaje. Nedostatke klasične IR spektroskopije nadoknadila je FTIR spektroskopija, odnosno infracrvena spektroskopija s

Fourierovom transformacijom. FTIR spektroskopija je omogućila simultano mjerenje svih frekvencija što je omogućeno interferometrom, reduciralo se vrijeme analize te se unaprijedila kvaliteta infracrvenog spektra. Interferometar koristi dvije zrake, od kojih se jedna reflektira od ravnog zrcala koje se ne pomiče, a druga se zraka reflektira od zrcala koje se može pomicati pod određenim kutem. Rezultat interferometra je interferencija (međudjelovnje) tih dviju zraka različitih duljina, odnosno signal koji sadrži informaciju o svakoj frekvenciji koja dolazi od izvora - interferogram. Konačno, iz interferograma Fourierovim transformacijama dobivamo karakterističan IR spektar za svaku IR aktivnu tvar.

2.7.3 Optička mikroskopija (OM)

Mikroskopija je vrlo važna tehnika kojom se vrlo sitni predmeti mogu učiniti vidljivima. Obično se mikroskopijom samo potvrđuju podaci dobiveni drugim metodama o fizikalno-kemijskim svojstvima ili za ispitivanje morfoloških karakteristika dobivenih kristala.

Svjetlosni mikroskop bez polariziranog svjetla ima mogućnost ispitivanja veličine, boje i oblika kristala, dok uz primjenu polarizirane svjetlosti moć karakterizacije anizotropnih kristala se izrazito povećala. Tehnološkim razvojem omogućeno je snimanje uzoraka s vrlo velikim povećanjima. Kod optičke mikroskopije maksimalno povećanje je i do 1000 puta, a moć razlučivanja mikroskopa ne ovisi samo o broju i kvaliteti leća, već i o valnoj duljini svjetlosti koja se koristi za osvjetljivanje uzoraka.

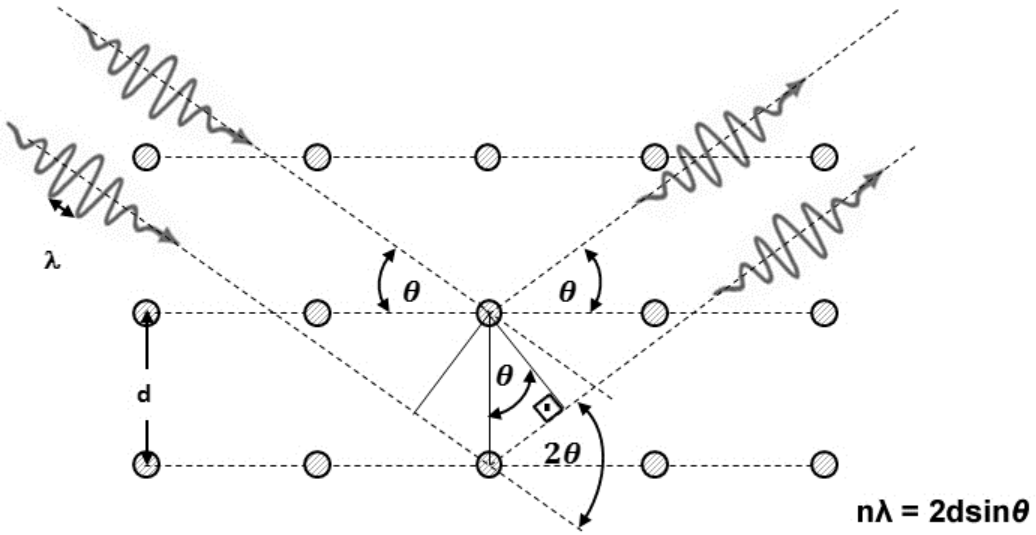
2.7.4 Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD)

Rendgentske zrake su elektromagnetski val po prirodi, a u elektromagnetskom spektru mjesto pronalaze između ultraljubičastog i γ-zračenja. Valna duljina rendgenskih zraka odgovara promjeru atoma te su reda veličine 10^{-10} m (1 Å) što je prikazano i na **Slici 19**.

Wilhelm Conrad Röntgen je prvi otkrio rendgentske zrake izvodeći pokus u Crooksovoj cijevi s katodnim zrakama. Tada je opazio svjetlucanje na fluorescentnom zastoru premazanom barijevim platinocijanidom koji je bio udaljen metar od aparature, a otkrićem da „nepoznate“ zrake (X-zrake) imaju mogućnost prolaska kroz materiju, označilo je revolucionarnu spoznaju. Daljnjim proučavanjem rendgenskih zraka, primijetio je da različite tvari posjeduju različit stupanj prozirnosti, odnosno prodornosti kroz materiju.

Ovisno o vrsti ispitivanog uzorka, postoji rendgenska difrakcija monokristala i praha. Kod rendgenske difrakcije na prahu (PXRD), monokromatska se rendgenska zraka usmjerava na ravnu površinu usitnjenog uzorka uz pretpostavku da se prah sastoji od nasumično posloženih

kristala (kristalnih ravnina) u svakom mogućem smjeru. Bitno je naglasiti da će barem jedna od tih ravnina biti tako posložena da će zatvoriti Braggov kut θ s upadnim snopom zrake te govorimo o difrakciji (**Slika 21.**).



Slika 21. Shematski prikaz Braggovog zakona

Zadovoljavanjem Braggove jednadžbe ostvaruje se konstruktivna interferencija, dok u suprotnom se dobije destruktivna interferencija, odnosno gašenje refleksa. Difraktirane zrake moguće je detektirati ili okruživanjem uzorka trakom ili fotografskim filmom (Debye-Scherrer metoda i Guinier metoda) ili korištenjem pokretnog detektora (kao što je Geigerov brojač, scintilacijski brojač ili slikovna ploča) povezanog na snimač grafa ili računalo (difraktometar). Danas se Debye-Scherrer metoda pokazala kao jedna od najboljih metoda za mjerenje i proučavanje osnovnih veličina i svojstava polikristalinih materijala.

Kada uzorak obasjamo monokromatskim rendgenskim zračenjem skup mrežnih ravnina ostvarit će difrakcijski maksimum u obliku konusa. U ovom slučaju dodatno može pripomoći rotacija uzorka kako bi se povećala nasumična orijentacija kristalnih ravnina. Detektor registrira rendgenske zrake u obliku impulsa te prenosi zapis u obliku grafičkog zapisa intenziteta maksimuma u ovisnosti o različitim položajima (2θ).

Rendgenska difrakcija na prahu je vrlo korisna metoda za određivanje informacija o prisutnim fazama u uzorku, o kristalnoj strukturi tvari i veličini kristalita. Međutim, da bi se mogli odrediti navedeni parametri, potrebno je poznavati kemijski sastav uzorka.

2.7.5 Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Elektronske mikroskopije su vrlo korisne tehnike za dobivanje informacija o strukturnim i morfološkim karakteristikama ispitivanog uzorka na vrlo velikim povećanjima. Upad elektronskog snopa na uzorak može izazvati različite pojave koje uključuju transmisiju ili refleksiju pa prema tome i postoji podjela pojedinih tehnika koje se temelje na transmisijskim tehnikama poput: TEM (transmisijska elektronska mikroskopija), EELS (spektrometrija gubitka energije elektrona), CBD (difrakcija pomoću konvergentnih zraka) ili refleksijskim tehnikama kao što je SEM (pretražna elektronska mikroskopija), EDX (energijski razlučujuća rendgenska spektroskopija) te RHEED (topološki kontrast, refleksijska visokoenergijska elektronska difrakcija).

Refleksijske tehnike se temelje na detekciji signala iz početnog medija s površine uzorka, dok se transmisijske tehnike temelje na detekciji signala koji prolaze kroz drugi medij mijenjajući smjer uslijed interakcije s uzorkom.

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM), kao jedna od najkorištenijih refleksijskih tehnika, temelji se na skeniranju površine ispitivanog uzorka s fokusiranim snopom elektrona. Uzorak se pripremi i unosi na nosač u komoru mikroskopa, a elektroni se emitiraju iz elektronskog topa. Površina na koju se nanosi uzorak mora biti vodljiva kako ne bi došlo do naelektriziranja površine što bi imalo utjecaja na kvalitetu slike. Elektroni se ubrzavaju u prostoru između katode i anode pod razlikom potencijala. Sastavni dio mikroskopa su i magnetske leće koje usmjeravaju elektronski snop i kontroliraju širinu njegova poprečnog presjeka, a koje imaju izravan utjecaj na oštrinu konačne slike.

U komori se također nalaze i više vrsta detektora poput SE detektora (detektor sekundarnih elektrona), BSE (detektor povratnog raspršenja), EDS (energijsko disperzivni spektrometar). Ti detektori prepoznaju više vrsta signala koji se prenosi na računalo koji ih obrađuje i daje virtualnu sliku. Elektronski mikroskopi mogu razlučivati sliku veličina 0,1 nm, odnosno mogu omogućiti prikaz objekta vrlo malih dimenzija.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Priprema otopine umjetnog urina

Otopina umjetnog urina pripremljena je iz izvornih otopina kemijskog sastava i koncentracija prikazanih u **Tablici 5.** Izvorne otopine Na_2SO_4, KCl, NH_4Cl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl i ureje pripremljene su odvagom kemikalija *p.a.* čistoće i otapanjem u destiliranoj vodi provodnosti ≤ 0,055 μS/cm u odmjernim tikvicama. Recept za umjetni urin slijedio je standardni protokol Burnsa i Finlaysona uz određene modifikacije za potrebe provođenja eksperimenata. Naime, Na_2HPO_4 je prilikom pripreme namjerno izostavljen jer se u tijeku eksperimenata utvrdilo preferirano taloženje fosfatnih soli pri pH_i = 9,0. Nadalje, u prijašnjim istraživanjima smo utvrdili da citratni ioni promoviraju stvaranje dihidratnog oblika kalcijeva oksalata te je recept modificiran i s obzirom na citrat [6]. Dodatak ureje je također modifikacija u odnosu na standardni recept Burnsa i Finlaysona [53].

Tablica 5. Kemijski sastav pripremljenog umjetnog urina

KEMIJSKI SPOJ	*c* / mmol dm^{-3}	PROIZVOĐAČ
Na_2SO_4	16,95	Kemika
KCl	63,70	Kemika
NH_4Cl	45,50	Kemika
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,85	Kemika
NaCl	105,50	Kemika
Urea	291,40*	Kemika
pH	**5,0 ili 9,0**	**-**

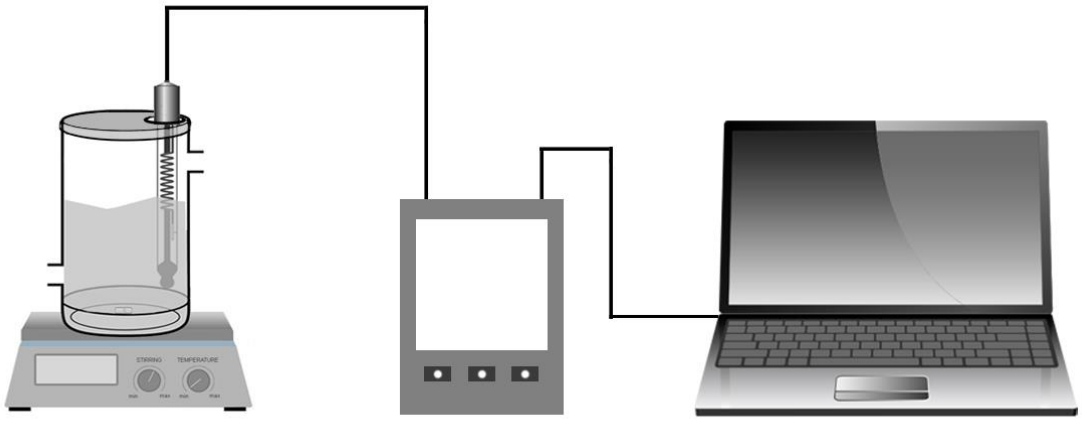
*Kod ljudi i viših primata, izlučuje se većinom putem bubrega te je stoga dodana u sastav umjetnog urina

Početna pH vrijednost, pH_i, podešena je dodatkom standardiziranih otopina HCl i/ili NaOH na pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0 te je stoga koncentracija NH_4Cl podešena na 45,50 mmol dm^{-3}.

3.2 Priprema taložnih sustava

Otopinom umjetnog urina pripremljene su otopine različitih koncentracija konstitucijskih iona kalcija u širem koncentracijskom području od 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq 10$ mmol dm^{-3} i oksalata u koncentracijskom području od 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq 8{,}0$ mmol dm^{-3} kako bi se zadovoljio uvjet hiperoksalurije. Bitno je spomenuti da je otopina natrijeva oksalata (Merck) standardizirana standardnom otopinom $KMnO_4$ ($c(KMnO_4)$ = 0,02000 mol dm^{-3}),, a otopina kalcijeva klorida (Merck) kompleksometrijskom titracijom s EDTA (c(EDTA) = 0,1000 mol dm^{-3}). Taložni sustav je stoga pripremljen od konstitucijskih komponenti, kalcijevih i oksalatnih iona, uz dodatak drugih komponenti koje su u vrsti i količini pobliži sastavu biološkog urina.

Eksperimenti su provedeni u staklenoj reakcijskoj posudi dvostrukih stijenki volumena 400 cm^3 pri temperaturi od 37 °C kontroliranom protočnim termostatom kako bi se ostvarili približno fiziološki uvjeti (**Slika 22.**).



Slika 22. Shematski prikaz aparature za spontano taloženje kalcijeva oksalata

Posuda se nakon dodatka otopina oksalat - umjetni urin (200 cm^3) i kalcij - umjetni urin (200 cm^3) zatvara teflonskim čepom i miješa magnetskim mješačem brzinom od 400 – 420 o/min. Napredovanje reakcije praćeno je mjerenjem pH otopine kombiniranom staklenom/kalomel elektrodom (HI1131) spojenom s digitalnim pH-metrom HANNA HI 5522, dok su podaci prikupljeni prijenosnim računalom. Elektroda je kalibrirana standardnim puferima na tri točke: pH = 4,01, pH = 7,01 te pH = 10,01. Nakon uspostavljanja približno konstantne pH vrijednost, eksperiment je zaustavljen (nakon približno 20 minuta). Dobivena suspenzija je profiltrirana

kroz membranski filter (Millipore) veličine pora 0,22 μm, a ostatak na filter papiru je ispran malim količinama deionizirane vode te sušen tijekom jednog sata u vakuumu.

3.3 Računska obrada podataka

Kako bi se izračunao indeks zasićenja te na kraju i prezasićenost za taložni sustav $CaCl_2$ – $Na_2C_2O_4$ – umjetni urin, korišten je program Visual MINTEQ (besplatno dostupan na: https://vminteq.lwr.kth.se/) koji simulira različite okolišne uvjete te modeliranjem pretpostavlja vjerojatnost pojave određenih kemijskih vrsta u otopini na temelju ravnotežnih reakcija. Kako bi se uopće mogla napraviti simulacija, potrebno je obuhvatiti nekoliko ulaznih parametara poput pH vrijednosti, početne koncentracije i temperature taložnog sustava. Na taj se način računa koncentracija slobodnih iona i kompleksa, ionska jakost, aktivitet slobodnih iona, produkti aktiviteta i indeks zasićenja.

Računanje koncentracije i aktiviteta relevantnih ionskih vrsta u otopini moguće je korištenjem sljedećih ionskih ravnoteža (29 – 37):

1) Ravnotežne reakcije za oksalatne vrste uz ravnotežu disocijacije vode:

$$H_2C_2O_4 \rightleftharpoons H^+ + HC_2O_4^- \qquad K_1^0 = \frac{c(HC_2O_4^-)/c^0 \cdot c(H^+)/c^0}{c(H_2C_2O_4)/c^0} \cdot \gamma_I^2 \tag{29}$$

$$HC_2O_4^- \rightleftharpoons H^+ + C_2O_4^{2-} \qquad K_2^0 = \frac{c(C_2O_4^-)/c^0 \cdot c(H^+)/c^0}{c(HC_2O_4^-)/c^0} \cdot \gamma_{II} \tag{30}$$

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad K_W^0 = (c(H^+)/c^0 \cdot c(OH^-) \cdot /c^0) \cdot \gamma_I^2 \tag{31}$$

2) Ravnotežne reakcije nastajanja relevantnih ionskih parova:

$$Ca^{2+} + C_2O_4^{2-} \rightleftharpoons CaC_2O_4^0 \qquad K_3^0 = \frac{c(CaC_2O_4)/c^0}{c(Ca^{2+})/c^0 \cdot c(C_2O_4^{2-})/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{II}^2} \tag{32}$$

$$Na^+ + C_2O_4^{2-} \rightleftharpoons NaC_2O_4^- \qquad K_4^0 = \frac{c(NaC_2O_4^-)/c^0}{c(Na^+)/c^0 \cdot c(C_2O_4^{2-})/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{II}} \tag{33}$$

$$Ca^{2+} + OH^- \rightleftharpoons CaOH^+ \qquad K_5^0 = \frac{c(CaOH^+)/c^0}{c(Ca^{2+})/c^0 \cdot c(OH^-)/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{II}} \tag{34}$$

$$Mg^{2+} + C_2O_4^{2-} \rightleftharpoons MgC_2O_{4(aq)} \qquad K_6^{\,0} = \frac{c(MgC_2O_4)/c^0}{c(Mg^{2+})/c^0 \cdot c(C_2O_4^{2-})/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{II}^{\,2}} \tag{35}$$

$$K^+ + SO_4^{2-} \rightleftharpoons KSO_4^- \qquad K_7^{\,0} = \frac{c(KSO_4^-)/c^0}{c(K^+)/c^0 \cdot c(SO_4^{2-})/c^0} \cdot \frac{1}{\gamma_{II}} \tag{36}$$

3) Ravnoteža čvrste faze i otopine

$$K_{sp}^{\,0} = (c(Ca^{2+})/c^0 \cdot c(C_2O_4^{2-})/c_0) \cdot \gamma_{II}^{\,2} \tag{37}$$

u kojoj K^0 predstavlja termodinamičku konstantu ravnoteže, dok γ_I i γ_{II} označavaju koeficijente aktiviteta za jednovalentne, odnosno dvovalentne ione. Za potrebe računanja, korištene su termodinamičke konstante ravnoteže prikazane u **Tablici 6**.

Za računanje sastava otopine korištene su sljedeće ravnoteže mase:

$Na_{(ukupni)} = c(Na^+) + c(NaCl_{(aq)}) + c(NaOH_{(aq)}) + c(Na\text{-}Ox^-) + c(NaSO_4^-)$

$Cl_{(ukupni)} = c(CaCl^+) + c(Cl^-) + c(KCl_{(aq)}) + c(MgCl^+) + c(NaCl_{(aq)})$

$Ca_{(ukupni)} = c(Ca(NH_3)_2^{2+}) + c(Ca^{2+}) + c(CaCl^+) + c(CaNH_3^{2+}) + c(CaOH^+) + c(Ca\text{-}Ox_{(aq)}) + c(CaSO_{4(aq)})$

$Ox_{(ukupni)} = c(Ca\text{-}Ox_{(aq)}) + c(H_2\text{-}Ox) + c(H\text{-}Ox^-) + c(K\text{-}Ox^-) + c(Mg\text{-}Ox_{(aq)}) + c(Na\text{-}Ox^-) + c(NH_4\text{-}Ox^-) + c(Ox^{2-})$

$K_{(ukupni)} = c(K^+) + c(KCl_{(aq)}) + c(KOH_{(aq)}) + c(K\text{-}Ox^-) + c(KSO_4^-)$

$Mg_{(ukupni)} = c(Mg(NH_3)_2^{2+}) + c(Mg^{2+}) + c(MgCl^+) + c(MgOH^+) + c(Mg\text{-}Ox_{(aq)}) + c(MgSO_{4(aq)})$

$SO_{4(ukupni)} = c(CaSO_{4(aq)}) + c(HSO_4^-) + c(KSO_4^-) + c(MgSO_{4(aq)}) + c(NaSO_4^-) + c(NH_4SO_4^-) + c(SO_4^{2-})$

$NH_{4(ukupni)} = c(NH_{3(aq)}) + c(NH_4^+) + c(NH_4\text{-}Ox^-) + c(NH_4SO_4^-) + c(Ca(NH_3)_2^{2+}) + c(CaNH_3^{2+}) + c(Mg(NH_3)_2^{2+})$

te ravnoteže naboja prema:

$c(H^+) + c(CaCl^+) + c(MgCl^+) + 2 \cdot c(Ca(NH_3)_2^{2+}) + 2 \cdot c(Ca^{2+}) + 2 \cdot c(CaNH_3^{2+}) + c(CaOH^+) + c(K^+) + 2 \cdot c(Mg(NH_3)^{2+}) + 2 \cdot c(Mg^{2+}) + c(MgCl^+) + c(MgOH^+) + c(NH_4^+) = c(OH^-) + c(Na\text{-}$

Ox^-) + $c(NaSO_4^-)$ + $c(Cl^-)$ + $c(H\text{-}Ox^-)$ + $c(K\text{-}Ox^-)$ + $c(NH_4\text{-}Ox^-)$ + $2 \cdot c(Ox^{2-})$ + $c(KSO_4^-)$ + $c(HSO_4^-)$ + $c(NH_4SO_4^-)$ + $2 \cdot c(SO_4^{2-})$

U konačnici, ionska jakost, aktiviteti iona, koeficijenti aktiviteta te koncentracije navedenih vrsta mogu se izračunati postupkom iteracije uz navedene konstante i ravnotežne reakcije.

Koeficijenti aktiviteta *z*-valentnih iona su izračunati prema Daviesovoj jednadžbi (26), dok je ionska jakost izračunata pomoću standardne jednadžbe (25) uz pretpostavku da ionska jakost ne prelazi vrijednost I_C = 0,5 mol dm^{-3}.

Kako bismo izračunali indeks zasićenja, odnosno stupanj zasićenosti *S* potrebno je izračunati produkt aktiviteta iona, π ili *IAP* za kalcijev oksalat. Bitno je naglasiti da se stupanj zasićenosti računao preko najstabilnijeg oblika kalcijeva oksalata, odnosno COM (39).

$$\pi(COM) = a(Ca^{2+}) \cdot a(C_2O_4^{2-}) \tag{39}$$

Stupanj zasićenosti S je stoga izračunat prema produkta aktiviteta iona π i termodinamičkog produkta topljivosti kalcijeva oksalata, K_{sp}^0 prema jednadžbi (40):

$$S = \frac{\sqrt{a(Ca^{2+}) \cdot a(C_2O_4^{2-})}}{\sqrt{K_{sp}^{\ 0}}} \tag{40}$$

U **Tablici 6.** su prikazane termodinamičke konstante produkta topljivosti za pojedinu hidratnu fazu kalcijeva oksalata pri temperaturi od 37 °C

Tablica 6. Termodinamičke konstante produkta topljivosti kalcijevih oksalata pri 37 °C [55,65,66]

Hidratna faza	Formula	*Ksp*
kalcijev oksalat monohidrat, COM	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$	$2{,}26 \cdot 10^{-9}$
kalcijev oksalat dihidrat, COD	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$	$3{,}63 \cdot 10^{-9}$
kalcijev oksalat trihidrat, COT	$CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$	$8{,}20 \cdot 10^{-9}$

Dobiveni podaci mogu se iskoristiti u svrhu konstruiranja taložnog dijagrama koji mogu dati puno više informacija o taloženju pojedine hidratne faze, odnosno o samim uvjetima taloženja. Većinom se taložni dijagrami prikazuju u ovisnosti o početnim koncentracijama reaktanata i na temelju eksperimentalnih podataka utvrđuju područje taloženja, odnosno područje u kojem ne

dolazi do taloženja. Ukoliko se dijagramu pridoda još jedan parametar, odnosno parametar prezasićenosti, takav jedan dijagram može donijeti nova saznanja ne samo o uvjetima taloženja, već i o veličini i morfologiji kristala koja je od izuzetne važnosti kada govorimo o kalcijevim oksalatima kao o najčešćim konstituentima bubrežnih kamenaca.

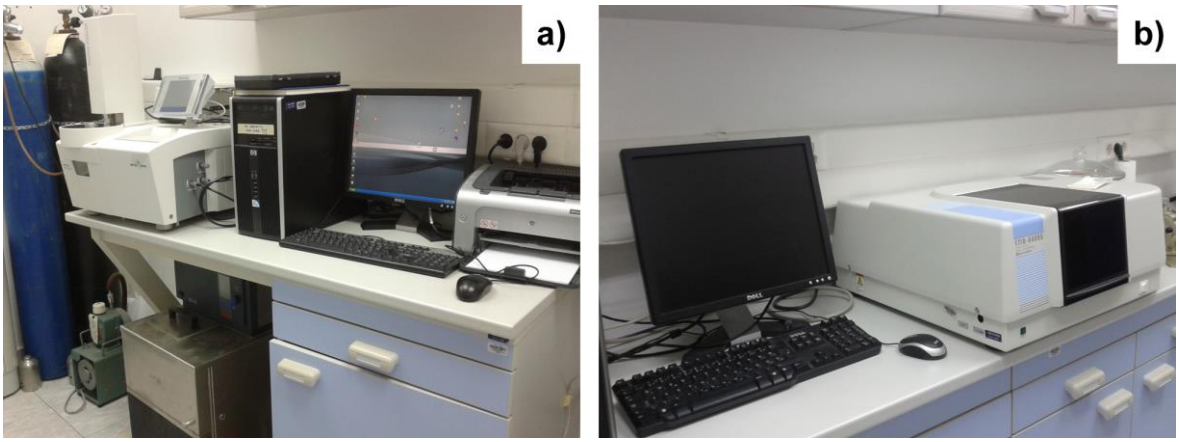
3.4 Karakterizacija kristalnog sjemena

Za karakterizaciju kristalnog sjemena kalcijeva oksalata korištene su sljedeće metode: termogravimetrijska analiza (TGA), infracrvena (FT-IR) spektroskopija, rendgenska difrakcija na prahu (PXRD), pretražna elektronska mikroskopija (SEM) te optička mikroskopija (OM).

TGA-DSC analiza provedena je na instrumentu Mettler Toledo System 1 (**Slika 23 a)**). Uzorci su ispitivani u atmosferi kisika, uz brzinu protoka plina 200 cm^3 min^{-1}, s korakom snimanja 5 °C min^{-1} u temperaturnom području od 30 do 300 °C. Rezultati su obrađeni pomoću računalnog programa STARe Software 10.0.

Izvagane su posudice od aluminijeva oksida. U svaku od njih je dodano približno 10 mg uzorka te je posudica s uzorkom ponovno izvagana. Točna dodana masa uzorka je izračunata iz razlike mase posudice s uzorkom i mase prazne posudice. Uzorak u posudici je stavljen u instrument na zagrijavanje tako da temperatura ravnomjerno raste zadanom brzinom, a promjena mase je bilježena instrumentom. Na temelju zabilježene promjene mase moguće je odrediti udio pojedinog hidratnog oblika u uzorku.

IR spektri snimljeni su pomoću Shimadzu FTIR 8400S spektrometra (**Slika 23. b)**) u valnom području od 400 do 4000 cm^{-1} (rezolucija: 4 cm^{-1}) DRS tehnikom. Analizirani su spojevi u čvrstom stanju, dok je za snimanje na FT-IR spektrometru korištena DRIFT (*eng. diffuse reflectance infrared Fourier transform*) tehnika. Približno 1 mg krutog uzorka homogeno je pomiješano s približno 100 mg KBr. Za snimanje spektara i obradu podataka korišten je računalni program IR Solution 1.30.



Slika 23. Instrumentacija za a) termogravimetrijsku analizu i b) FT-IR spektroskopiju

Rendgenska difrakcijska analiza provedena je na dva instrumenta:

1) PANanalytical X'PertPRO difraktometar. Korišteno je Cu Kα zračenje pri 295 K i Bragg - Brentano geometrijom s X'Celerator detektorom. Mjerno područje bilo je 2θ = 10 - 60° s korakom 0,02°. PANalytical HighScore Plus softver je korišten za analizu podataka.

2) Rigaku Ultima IV Multipurpose difraktometra (Cu Kα zračenje, Ni filter, 5° Soller prorez i proporcionalni brojač) u Bragg - Brentano geometriji. Mjerno područje bilo je 2θ = 10 - 60 s korakom 0,02°. Podaci su obrađeni na softveru Rigaku (PDXL 2).

Za analizu difrakcijskih slika korištena je baza podataka International Centre for Diffraction Data (ICDD Powder Diffraction File), Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). Identifikacija kristalne faze i veličina kristalita je napravljena usporedbom položaja i intenziteta difrakcijskih maksimuma u rendgenskim difraktogramima uzoraka (Debye-Scherrer metoda) s podacima iz baze podataka pomoću Rigaku (PDXL 2) softvera. COM je uspoređen s karticom broj 20-231 i/ili karticom broj 14-768, COD s karticom broj 17-541, a COT s karticom broj 20-232. Kvantitativno određivanje faza određeno je metodom referentnog intenziteta (RIR metoda).

Za vizualnu karakterizaciju taloga te za utvrđivanje morfoloških svojstava istaloženih faza, korišteni su svjetlosni mikroskop (Orthoplan photographic microscope, E. Leitz, Wetzlar) i pretražni elektronski mikroskop, SEM (FESEM, JEOL JSM-7000F). Da bi se provelo ispitivanje uzoraka pretražnom elektronskom mikroskopijom, manja količina uzorka je bez dodatnog tretiranja (naparavanje zlatom) stavljeno na ugljikovu traku fiksiranu na aluminijski nosač.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Provedeni su eksperimenti spontanog taloženja kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u sustavu umjetnog urina. Sustavi su pripremljeni u širem koncentracijskom području kalcija 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10,0 mmol dm^{-3} te koncentracijskom području oksalata (0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3}) kako bi se zadovoljio uvjet hiperoksalurije. Taloženje se promatralo miješanjem otopina $CaCl_2$ - umjetni urin te $Na_2C_2O_4$ - umjetni urin. Također je istražen i utjecaj pH na taloženje kalcijeva oksalata te su u ovisnosti o pH vrijednosti provedene dvije serije eksperimenata. Kako je već u prijašnjim poglavljima spomenuto, ovisno o acidobaznom stanju izvanstanične tekućine, normalni raspon pH mokraće kreće se od pH = 4,5 – 8,0, a značajnije količine iona anorganske i organske prirode pridaju prosječnoj ionskoj jakosti od 0,33 mol dm^{-3}. U normalnim uvjetima, pH biološkog urina iznosi približno pH = 6,0 - 6,5 te može varirati u periodu od 24 sata. U određenim okolnostima (u slučaju infekcija, uzimanja lijekova,…) te vrijednosti mogu dosegnuti pH ≥ 8,0 [50,51]. U ovom diplomskom radu ispitano je taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije pri pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0 te pri temperaturi od 37 °C, približno fiziološkim vrijednostima. Radi jednostavnosti, odabran je jedan sustav u svakoj seriji eksperimenata koji je usporedno pobliže ispitan. Radi se o sustavu u koncentracijskom području $c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3}, odnosno u uvjetima koji odgovaraju graničnim, normalnim vrijednostima kalcija te koncentracijama oksalata za primarnu hiperoksaluriju.

4.1 Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije pri pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0 u sustavu umjetnog urina

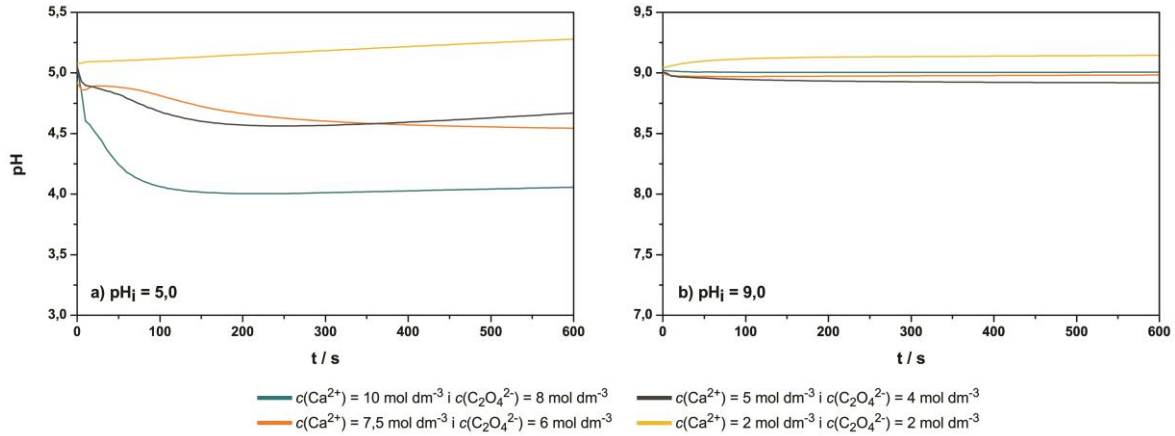
Reakcija je praćena pH krivuljom prikazanoj na **Slici 24.**, dok su u **Tablici 7.** prikazane početne koncentracije reaktanata u taložnim sustavima s odgovarajućim početnim vrijednostima prezasićenosti.

Tablica 7. Početne koncentracije reaktanata $CaCl_2$ i $Na_2C_2O_4$ te izračunate vrijednosti prezasićenosti S_i (COM) s obzirom na hidratnu fazu COM pri pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0

TALOŽNI SUSTAV		**UMJETNI URIN**	
		pH_i = 5,0	**pH_i = 9,0**
$c(CaCl_2)_i$ / mmol dm^{-3}	**$c(Na_2C_2O_4)_i$ / mmol dm^{-3}**	**S_i (COM)**	
2,0	**0,6**	3,82	3,89
5,0		5,77	5,87
7,5		6,82	6,93
10,0		7,62	7,74
2,0	**2,0**	6,93	7,07
5,0		10,47	10,67
7,5		12,39	12,60
10,0		13,85	14,08
2,0	**4,0**	9,67	9,87
5,0		14,66	14,95
7,5		17,38	17,68
10,0		19,45	19,77
2,0	**6,0**	11,65	11,90
5,0		17,72	18,05
7,5		**21,04**	**21,40**
10,0		23,58	23,99
2,0	**8,0**	13,21	13,47
5,0		20,14	20,54
7,5		23,96	24,41
10,0		26,92	27,35

Tijek spontanog taloženja promatran je mjerenjem pH taložnog sustava. Na **Slici 24.** prikazane su pH krivulje odabranih sustava s različitim početnim koncentracijama reaktanata u ovisnosti o vremenu spontanog taloženja te različitim početnim vrijednostima prezasićenosti (**Tablica 7.**). Bitno je spomenuti da u sustavima niže prezasićenosti u umjetnom urinu, odnosno kada je $S_i \approx 10$, ne dolazi do taloženja, točnije, zamućenje nije uočeno. Do zamućenja dolazi tek u

sustavima u kojima je koncentracija oksalata viša od $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 0,6 mmol dm^{-3} u cijelom istraženom vremenu od 20 min.



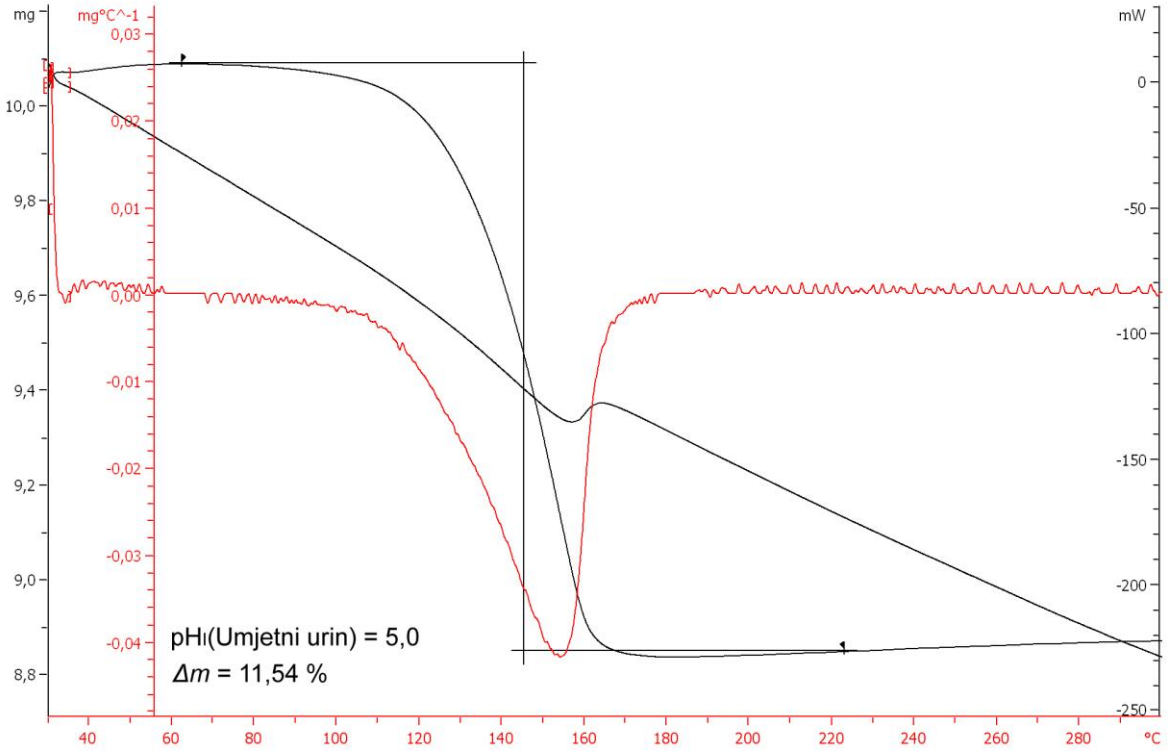
Slika 24. Grafički prikaz pH krivulja za odabrane sustave pri a) pH_i = 5,0 te b) pH_i = 9,0

Na grafičkom prikazu pH krivulja može se uočiti da se najveća promjena pH odvija pri povećanim koncentracijama kalcija i oksalata, odnosno pri višim prezasićenostima. Najveća promjena pH u sustavu taloženim pri pH_i = 5,0 je uočena u koncentracijskom području $c_i(Ca^{2+})$ = 10,0 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 8,0 mmol dm^{-3} gdje je zabilježeno najveće zamućenje ($S_i \approx$ 26,92). Najslabije zamućenje zabilježeno je pri ekvimolarnim koncentracijama reaktanata, odnosno pri $c_i(Ca^{2+}) = c_i(C_2O_4^{2-})$ = 2 mmol dm^{-3} pri oba pH_i spontanog taloženja ($S_i(pH_i = 5,0) \approx 6,93$ i $S_i(pH_i = 9,0) \approx 7,07$). Razlike se već uočavaju u sustavu spontanog taloženja pri pH_i = 9,0 gdje također do taloženja dolazi tek pri koncentracijama oksalata višima od $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 0,6 mmol dm^{-3}, ali promjene pH vrijednosti s vremenom nisu značajnije.

U svim taložnim sustavima umjetnog urina i pri pH_i = 5,0 i pri pH_i = 9,0 do taloženja dolazi tek kada početne prezasićenosti dosegnu vrijednosti $S_i > 10$.

4.1.1 Kvantitativna i kvalitativna analiza kalcijeva oksalata istaloženih pri pH_i = 5,0

Identifikacija hidratne faze i strukturna analiza promatranog sustava umjetnog urina ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3}) provedene su pomoću PXRD, FT-IR i TG analiza koje su uspoređene sa standardima COM i COD (vidi FT-IR, TG i PXRD analizu standarda COM i COD u **Dodacima 7.1, 7.2 i 7.3**).



Slika 25. Termogram promatranog sustava $c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 5,0 – termogravimetrijska krivulja označena crnom, prva derivacija crvenom bojom, dok Δm označava eksperimentalnu vrijednost

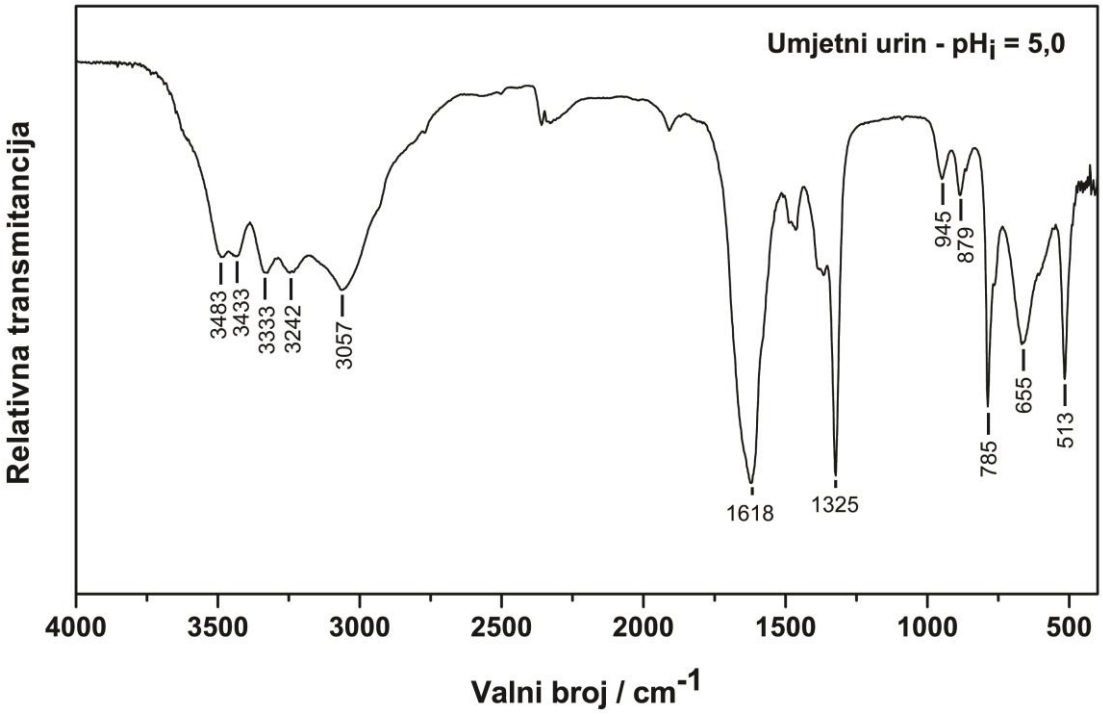
Podaci u **Tablici 8.** očitani su s termograma prikazanog na **Slici 25.**, a rezultati upućuju da se gubitak mase odvio u jednom koraku. Ukupni gubitak mase iznosio je 11,54 % što odgovara gubitku jedne molekule vode, odnosno ukazuje da u promatranom sustavu taloži jedna i to najstabilnija hidratna faza COM. Teoretski gubitak mase za kristalnu vodu u čistom COM iznosi 12,33 % te za COD 21,96 % [66-68].

Tablica 8. Rezultati termogravimetrijske analize za promatrani sustav $c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 5,0

Taložni sustav		t_0/ °C	t_{peak}/ °C	t_e/ °C	Δm/ mg	Δm/ %	Hidratna faza
pH_i = 5,0	Urin	89,24	147,60	188,72	1,32	11,54	COM

U sustavu umjetnog urina pri pH_i = 5,0 ukupan gubitak mase iznosi 11,54 % što također upućuje na prisutnost jedne hidratne faze, odnosno na prisutnost COM u uzorku.

Rezultati FT-IR analize također potvrđuju prisutnost isključivo jedne faze što se moglo odrediti po karakterističnim pikovima (minimumima) za COM (standard COM prikazan u **Dodacima 7.2**). Iz očitanih podataka sa spektra (**Slika 26.**) uočena je prisutnost COM u promatranom sustavu pri pH_i = 5,0 u čistom obliku što je nadalje potvrđeno i PXRD analizom.



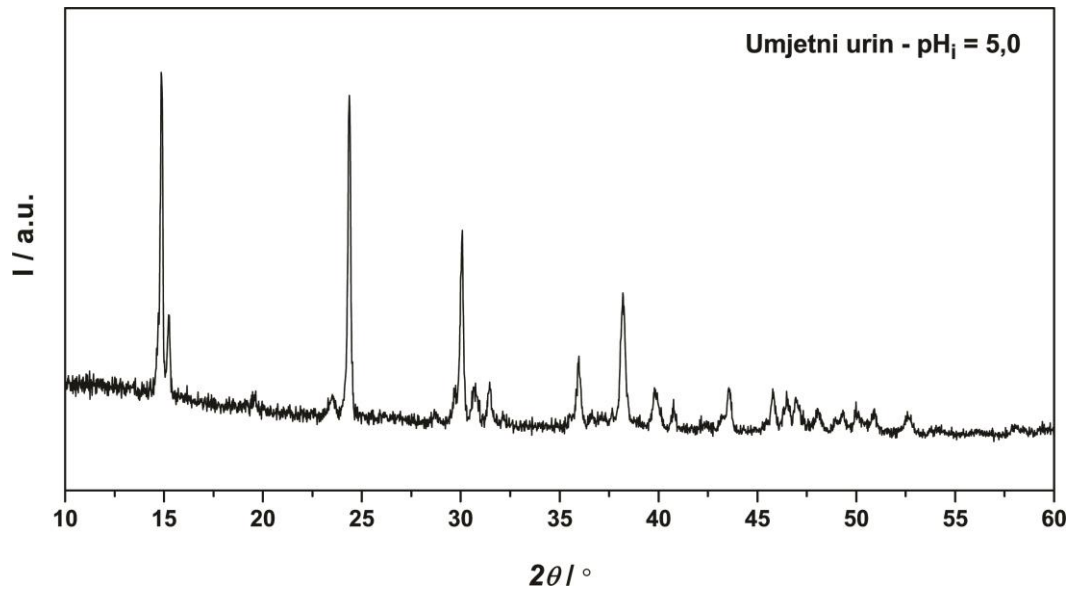
Slika 26. IR spektar uzorka istaloženog u sustavu umjetnog urina pri pH_i = 5,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

U IR spektru (**Slika 26., Tablica 9.**) COM pokazuje 5 karakterističnih pikova u područja O-H istezanja kod približno 3483, 3433, 3333, 3242 i 3057 cm^{-1} što odgovara simetričnim i asimetričnim vibracijama koordiniranih voda. U području od 400 - 1000 cm^{-1} nalaze se pikovi koji su korisni u analizi i identifikaciji prisutnosti COM u uzorku, posebice pikova na približno 945, 879 te 655 cm^{-1}. Pikovi na približno 785 i 513 cm^{-1} mogu se razlikovati po obliku i intenzitetu. Karakteristična karbonilna istezanja uočena su u području od 1200 – 1800 cm^{-1}, dok je antisimetrično istezanje karbonilne skupine na 1618 cm^{-1} te simetrično istezanje karbonilne skupine uočeno na približno 1325 cm^{-1} koji može biti koristan u predviđanju udjela COM/COD oblika u uzorku. FT-IR analizom je također utvrđeno da je u svim uzorcima istaloženim pri pH_i = 5,0 COM dominantna hidratna faza.

Tablica 9. Karakteristične IR vibracijske vrpce za promatrani sustav pH_i = 5,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

Vibracijske vrpce / cm^{-1}	Asignacija
~ 3483 ~ 3433 ~ 3333 ~ 3242 ~ 3057	Antisimetrično i simetrično istezanje koordinirane vode (O-H istezanje)
~ 1618	Antisimetrično karbonilno istezanje
~ 1325	Simetrično karbonilno istezanje
~ 945 ~ 879	H-O-H svijanje
~ 785 ~ 655	O-C-O antisimetrično njihanje
~ 513	O-C-O antisimetrično mahanje

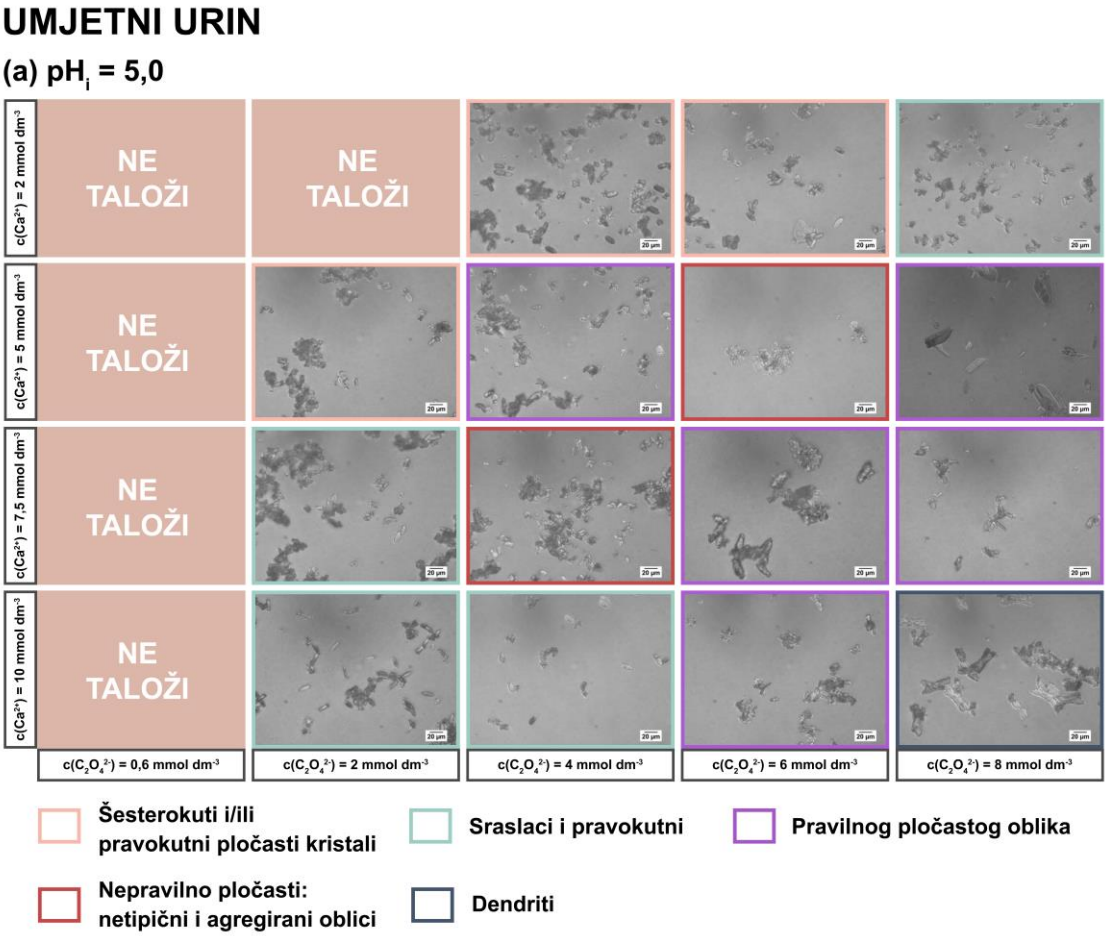
Konačno, kvantitativna analiza i identifikacija hidratne faze u uzorku provodena je rendgenskom difrakcijom na prahu (**Slika 27.**). Rezultati PXRD analize potvrdili su taloženje isključivo COM hidratne faze u promatranom sustavu umjetnog urina pri pH_i = 5,0. Ovaj se podatak slaže s rezultatima FT-IR i TG analize.



Slika 27. Rendgenogram uzorka pripravljenog spontanim taloženjem u umjetnom urinu pri pH_i = 5,0

4.1.2 Morfološka karakterizacija uzoraka pripravljenih pri pH_i = 5,0

Na **Slici 28.** prikazane su morfologije istaloženog kalcijeva oksalata u sustavu umjetnog urina u širokom koncentracijskom području kalcija 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10,0 mmol dm^{-3} te oksalata 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 5,0. Također su posebno naznačena područja u kojima nije došlo do zamućenja, odnosno taloženja.

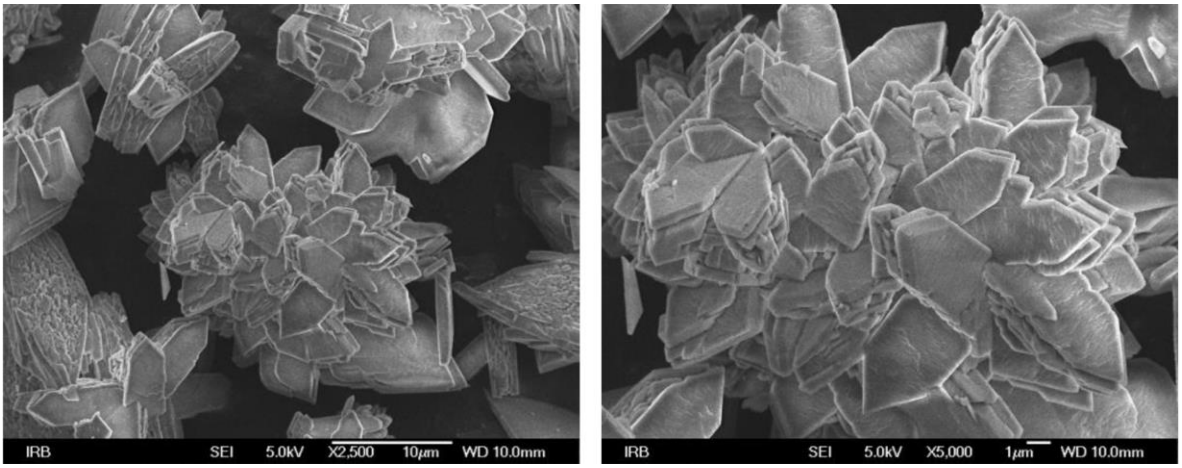


Slika 28. Morfologija kristala istaloženih u sustavu umjetnog urina u koncentracijskom području 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10,0 mmol dm^{-3} te 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 5,0 – povećanje: 25x; prikazana skala odgovara veličini od 20 μm

Pri nižim koncentracijama oksalata $c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 0,6 mmol dm^{-3}, odnosno kada je S_i < 10 ne dolazi do taloženja. Nastanak taloga također nije uočen ni pri ekvimolarnim koncentracijama kalcija i oksalata ($c_i(Ca^{2+}) = c_i(C_2O_4^{2-})$ = 2 mmol dm^{-3}). Iz **Slike 28.** se može uočiti da nepravilni oblici kristala nastaju čak i pri nižim koncentracijama oksalata, dok se s povećanjem prezasićenosti, povećava tendencija kristala za agregaciju. Pri nižim prezasićenostima $S_i \leq$ 15 dominatni su šesterokutni i pravokutni pločasti kristali, dok povećanjem prezasićenosti nastaju pravilniji (ljubičasto označena područja, **Slika 28.**), ali agregirani oblici kalcijeva oksalata.

Također, pri najvišim koncentracijama kalcija $c_i(Ca^{2+})$ = 10 mmol dm^{-3} i oksalata $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 8 mmol dm^{-3} nastaje dendritasti oblik kalcijeva oksalata. Naime, dendritna struktura u otopini ima vrlo pravilan oblik slova iks (X).

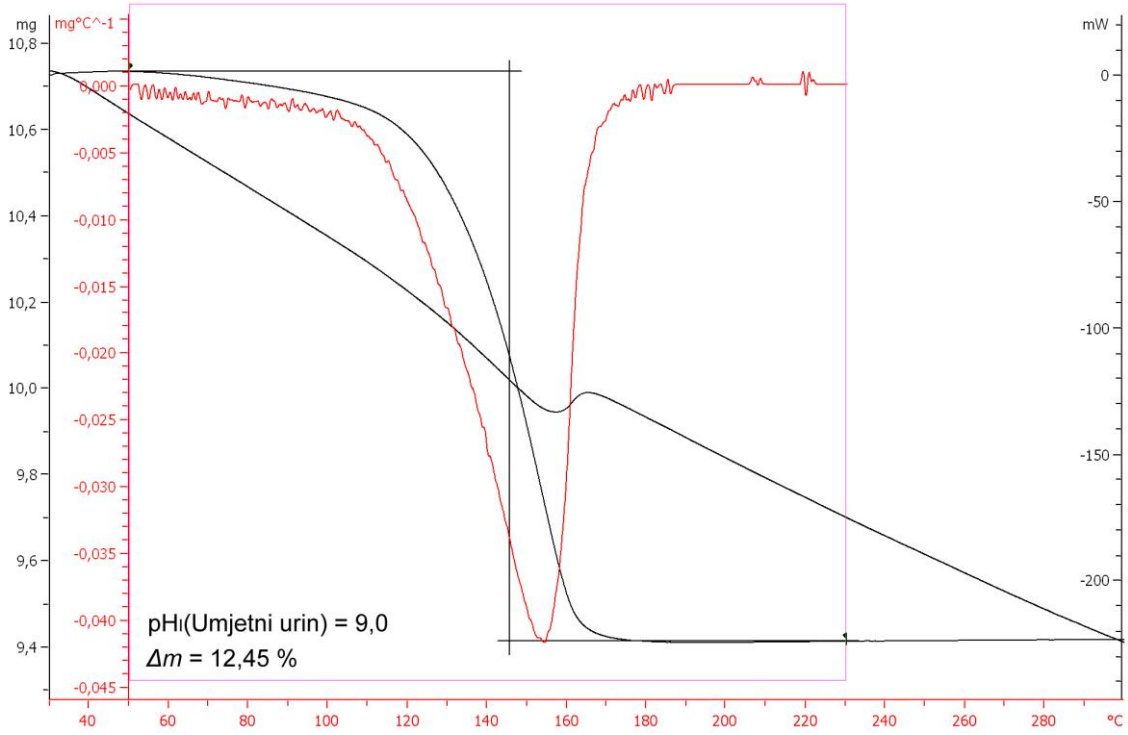
SEM analiza promatranog sustava utvrdila je taloženje nepravilnih i agregiranih oblika istaloženih pri pH_i = 5,0. Također je uočeno da su pri pH_i = 5,0 kristali izraženijih rubova te pravilnijeg oblika. I iz SEM analize je vidljivo da u promatranom sustavu talože pravilni šesterokuti, ali uz tendenciju agregacije iz jednog centra (**Slika 29.**). Također, povećanjem prezasićenosti u sustavima, sve je teže bilo razlikovati morfologiju kristala.



Slika 29. SEM snimke promatranog sustava istaloženog u sustavu umjetnog urina pri pH_i = 5,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

4.1.3 Kvantitativna i kvalitativna analiza kalcijeva oksalata istaloženih pri pH_i = 9,0

Identifikacija hidratne faze i strukturna analiza promatranog sustava umjetnog urina istaloženog pri pH_i = 9,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3}) provedene su pomoću PXRD, FT-IR i TG analiza te su rezultati uspoređeni sa standardima COM i COD (vidi FT-IR, TG i PXRD analizu standarda COM i COD u **Dodacima 7.1, 7.2. i 7.3**).



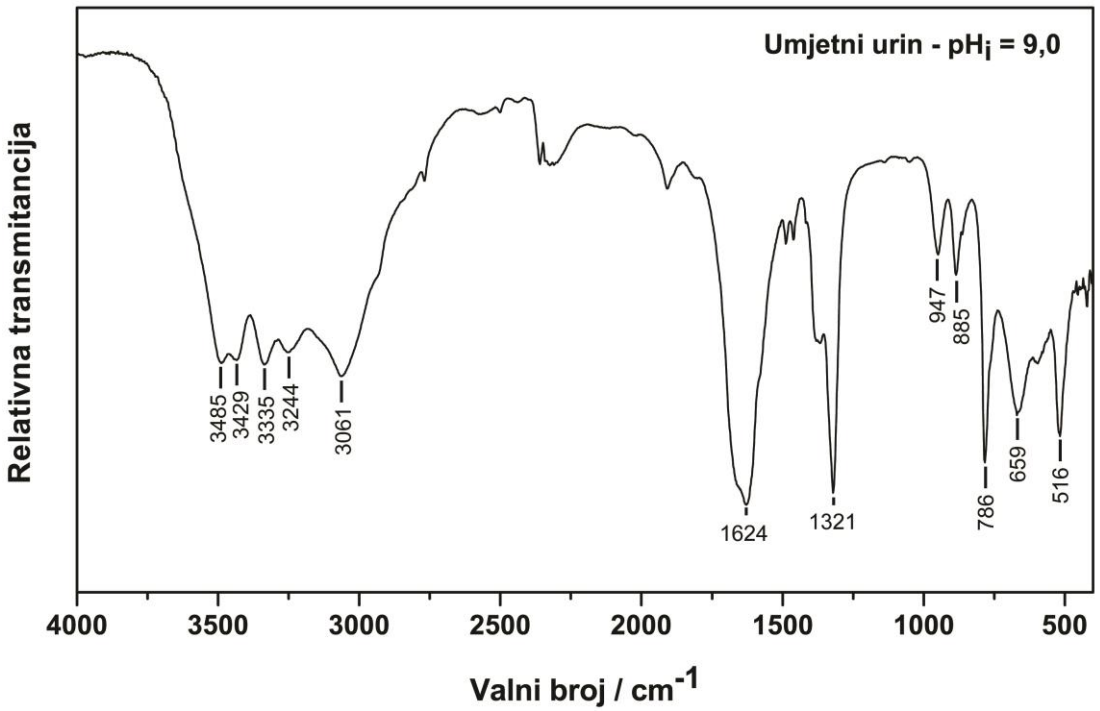
Slika 30. Termogram promatranog sustava $c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 9,0 – termogravimetrijska krivulja označena crnom, prva derivacija crvenom bojom, dok Δm označava eksperimentalnu vrijednost

Također, u sustavima istaloženih pri pH_i = 9,0 zabilježen je gubitak mase u jednom koraku, međutim za razliku od rezultata termogravimetrijske analize dobivenih analizom promatranog sustava pri pH_i = 5,0, nešto je veći gubitak mase od 12,45 % što može upućivati na prisutnost smjese COM i COD u uzorku (**Tablica 10.**). S obzirom na postotak, pretpostavka je da je COM i dalje dominantna hidratna faza u ispitivanom uzorku. Teoretski gubitak mase za kristalnu vodu u čistom COM iznosi 12,33 % te za COD 21,96 % [66-68].

Tablica 10. Rezultati termogravimetrijske analize za promatrani sustav $c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 9,0

Taložni sustav		t_0/ °C	t_{peak}/ °C	t_e/ °C	Δm/ mg	Δm/ %	**Hidratna faza**
pH_i = 9,0	Urin	86,47	143,49	184,35	1,37	12,45	COM/COD

Rezultati FT-IR analize su dosljedni rezultatima TGA. Naime, pojavljuju se karakteristični pikovi za COM (**Slika 31.**), bez naznaka prisutnosti COD u smjesi. Razlog ovoj pojavi može biti činjenica da se FT-IR spektroskopija smatra semikvantitativnom metodom za određivanje oksalata u smjesi, posebice ukoliko je udio pojedine hidratne faze u smjesi ≤ 10 %.



Slika 31. IR spektar uzorka istaloženog u sustavu umjetnog urina pri pH_i = 9,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

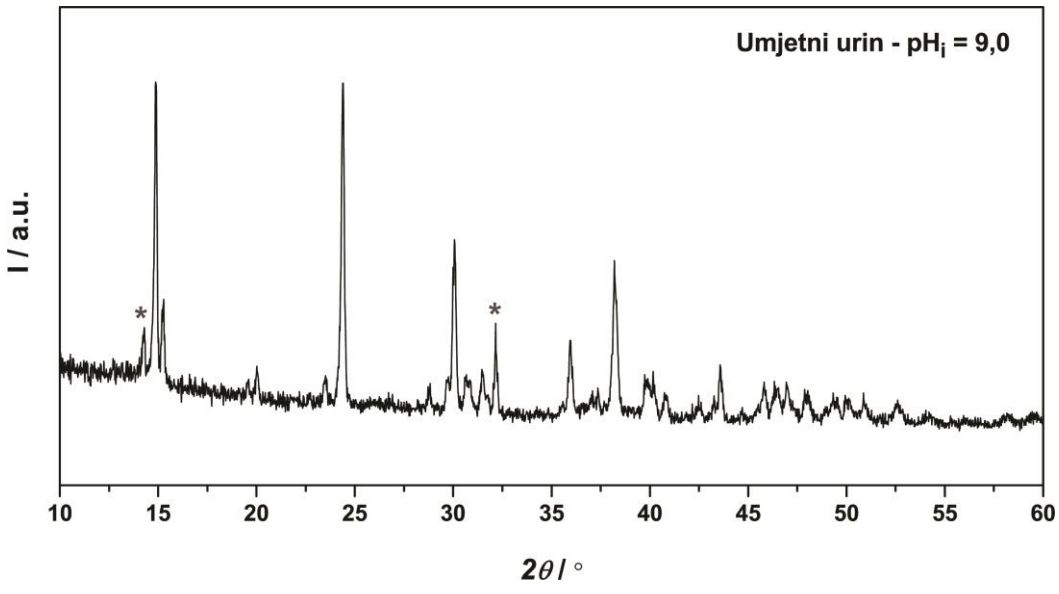
Na IR spektru se mogu uočiti karakteristični i oštri pikovi COM u području O-H istezanja poput 3485, 3429, 3335, 3244 te 3061 cm^{-1} koji odgovaraju vibracijama kooridiniranih voda (**Tablica 11.**). U području od 400 – 1000 cm^{-1} se nalaze pikovi koji su korisni za identifikaciju COM u uzorku, poput na približno 947, 885 te 659 cm^{-1}. Pikovi na približno 786 i 516 cm^{-1} mogu se razlikovati po obliku i intenzitetu. U području od 1200 – 1800 cm^{-1} se nalaze karakteristična karbonilna istezanja koja za pik na približno 1624 cm^{-1} odgovara antisimetričnom istezanju karbonilne skupine, dok je na 1321 cm^{-1} uočeno simetrično karbonilno istezanje te se po obliku i intezitetu navedenog pika može kvantificirati udio COM/COD u smjesi.

Vrlo je bitno spomenuti da je pomak pika 1317 cm^{-1} karakterističnog za COM vidljiv na 1329 cm^{-1} za COD, što vrijedi i za pik 1618 cm^{-1} koji je pomaknut na 1648 cm^{-1} za COD.

Tablica 11. Karakteristične IR vibracijske vrpce za promatrani sustav pH_i = 9,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

Vibracijske vrpce / cm^{-1}	Asignacija
~ 3485 ~ 3429 ~ 3335 ~ 3244 ~ 3061	Antisimetrično i simetrično istezanje koordinirane vode (O-H istezanje)
~ 1624	Antisimetrično karbonilno istezanje
~ 1321	Simetrično karbonilno istezanje
~ 947 ~ 885	H-O-H svijanje
~ 786 ~ 659	O-C-O antisimetrično njihanje
~ 516	O-C-O antisimetrično mahanje

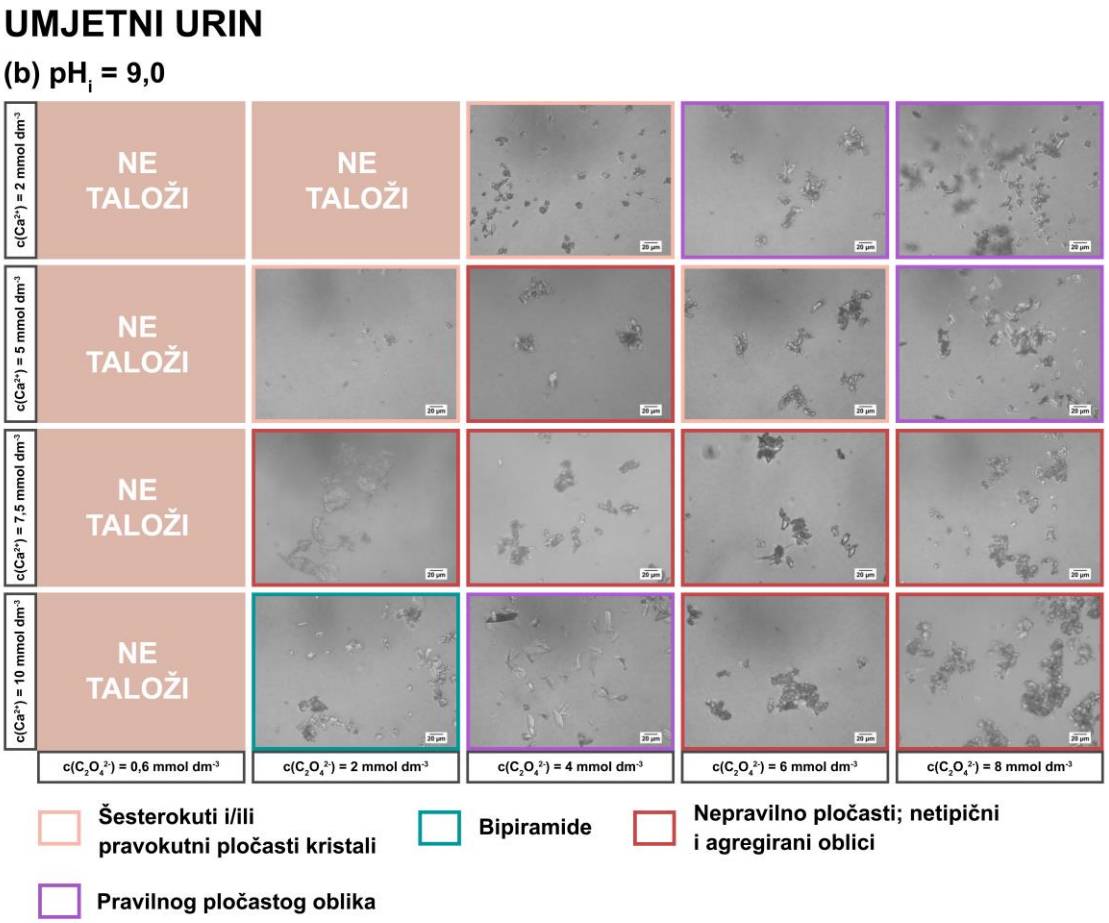
Razlike se jasno vide u rezultatima dobivenih PXRD analizom. Za razliku od serije spontanog taloženja pri pH_i = 5,0 u ovoj seriji, odnosno uzorku promatranog sustava pri pH_i = 9,0 evidentirana je smjesa COM i COD. Kvantitativnom analizom rendgenograma utvrđeno je da je dominantna hidratna faza ipak COM s 91 %, dok je udio COD u uzorku 9 %. Time se ujedno može objasniti odsutnost pikova COD na FT-IR spektru. Karakteristične difrakcijske maksimume COD oblika uočavamo na približno 2θ = 15° te na 2θ = 32° što je označeno zvjezdicama na rendgenogramu (**Slika 32.**)



Slika 32. Rendgenogram uzorka pripravljenog spontanim taloženjem u umjetnom urinu pri pH_i = 9,0; zvjezdice iznad pikova označavaju difrakcijske maksimume COD

4.1.4 Morfološka karakterizacija uzoraka pripravljenih pri pH_i = 9,0

Na **Slici 33.** prikazane su morfologije istaloženog kalcijeva oksalata u sustavu umjetnog urina u širokom koncentracijskom području kalcija 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10,0 mmol dm^{-3} te oksalata 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 9,0. Posebno su naznačena koncentracijska područja u kojima nije došlo do zamućenja otopine, odnosno taloženja.

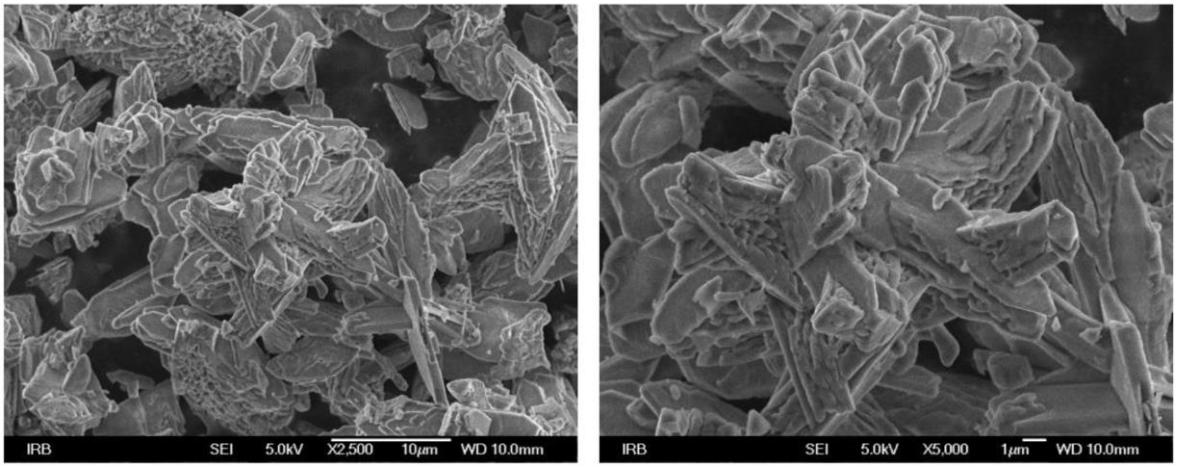


Slika 33. Morfologija kristala istaloženih u sustavu umjetnog urina u koncentracijskom području 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq$ 10,0 mmol dm^{-3} te 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq$ 8,0 mmol dm^{-3} pri pH_i = 9,0 – povećanje: 25x; prikazana skala odgovara veličini od 20 μm

Iz taložnog dijagrama se može uočiti da u sustavu umjetnog urina spontanog taloženja pri pH_i = 9,0 dominantno talože nepravilni i agregirani oblici kalcijeva oksalata (crveno označena područja, **Slika 33.**). Također, povećanjem prezasićenosti sustava sve je teže razlikovati morfologiju kristala. Za razliku od sustava taloženih pri pH_i = 5,0, pri pH_i = 9,0 niti u jednom ispitanom koncentracijskom području kalcija i oksalata ne talože dendritne strukture COM, dok

se COD pojavljuje u obliku karakteristične tetragonalne bipiramide pri najvećoj koncentraciji kalcija $c_i(Ca^{2+})$ = 10,0 mmol dm^{-3} i oksalata od $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 2,0 mmol dm^{-3}.

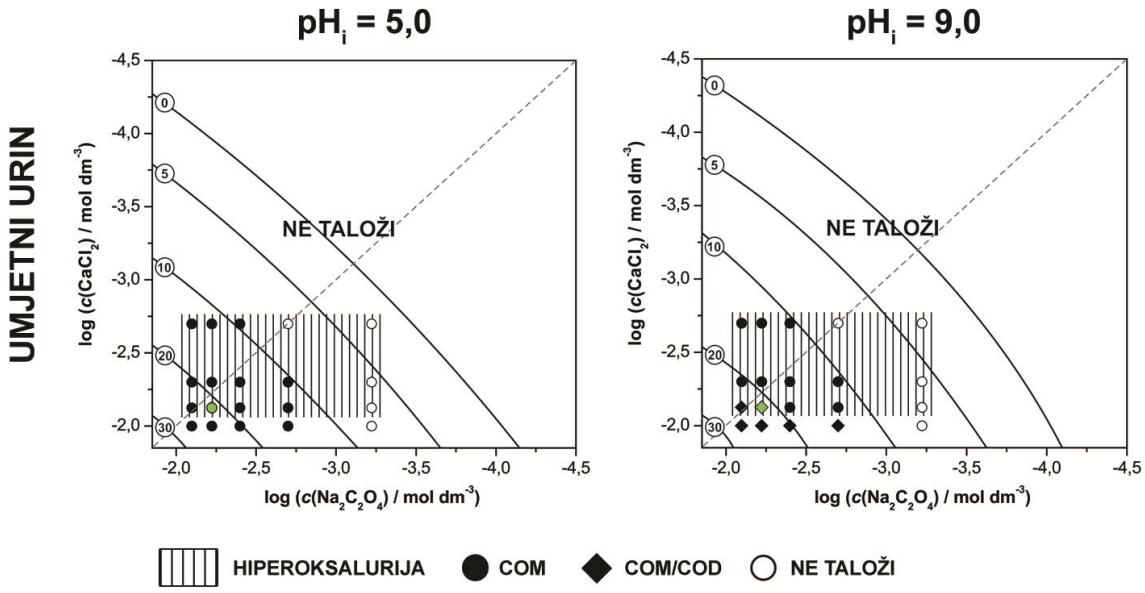
Vrlo slično ponašanje uočeno je i SEM analizom. Na **Slici 34.** vidljivi su agregirani oblici kristala kalcijeva oksalata, bez pravilnih i oštrih rubova za razliku od sustava spontanog taloženja pri pH_i = 5,0.



Slika 34. SEM snimke promatranog sustava istaloženog u sustavu umjetnog urina pri pH_i = 9,0 ($c_i(Ca^{2+})$ = 7,5 mmol dm^{-3} i $c_i(C_2O_4^{2-})$ = 6,0 mmol dm^{-3})

U konačnici, raspodjela istaloženih sustava i njihovih karakteristika u ovisnosti o logaritmu koncentracija kalcija i oksalata te odgovarajućih prezasićenosti prikazana je taložnim dijagramom na **Slici 35**. za oba pH_i.

Kao što je ranije spomenuto, takve vrste taložnih dijagrama mogu dati korisne informacije o koncentracijskom području u kojem dolazi ili ne dolazi do taloženja ili pak o taloženju pojedine hidratne faze. Također, mogu dati korisne informacije o morfologiji, veličini kristala, topljivosti na jednom dijagramu. Iz dijagrama se može uočiti da do taloženja ne dolazi u promatranom vremenu od 20 minuta (kinetički uvjetovano) ukoliko vrijednosti prezasićenosti ne dosegnu vrijednosti $S_i \approx 10$, odnosno ukoliko indeks zasićenja ne dosegne vrijednost od 2. Razlog tomu može biti da umjetni urin sadrži pojedine ione (poput Mg^{2+},…) koji mogu djelovati kompleksirajuće, uzrokuju smanjenje u prezasićenosti sustava te proširuju metastabilnu zonu. Također, jasno je uočen utjecaj pH_i vrijednosti na taloženje pojedine hidratne faze što je rezultiralo razlikama u sastavu uzoraka.



Slika 35. Taložni dijagram u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu nakon 20 minuta taloženja. Granice prezasićenosti označene su tankim punim linijama (brojevi označavaju S_i vrijednost s obzirom na COM za promatrano područje). Okomitim linijama je označeno područje hiperoksalurije. Istaložene hidratne faze (COM i smjesa COM/COD) u dijagramu su prikazani različitim oblicima. Puni oblici označavaju sustave u kojima se pojavljuje talog koji je analiziran, a prazni krugovi sustave u kojima nije došlo do taloženja. Sustav označen zelenom bojom u nastavku je detaljnije analiziran.

U nekim literaturnim navodima se usko povezuje morfologija s prezasićenosti sustava te omjerom kalcija i oksalata u otopini umjetnog urina [53]. Zajedničko za obje serije taloženja jest da se u većini slučajeva pojavljuju agregirani oblici kalcijeva oksalata u uzorcima. Uzrok tome može biti starenje taloga, promjena koncentracije suspendirane faze, dodatak elektrolita, pH, itd. Naime, uočeno je da COM preferirano i dominantno taloži u kiselom mediju, a ujedno je COM patogen u stvaranju bubrežnih kamenaca. Značajnije razlike u vrijednostima prezasićenosti nisu uočene između serija, odnosno između dva ispitana pH_i = 5,0 i pH_i = 9,0, ali vrijednosti nisu prelazile S_i = 30 što je i literaturno navedeno kod istraživanja taloženja kalcijeva oksalata u pravom urinu [69].

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bilo je ispitivanje i karakterizacija kalcijeva oksalata dobivenih spontanim taloženjem u sustavu umjetnog urina zadovoljavajući uvjete hiperoksalurije pri dva $pH_i = 5,0$ i $pH_i = 9,0$ te pri temperaturi od 37 °C tijekom 20 minuta. Istraživanje je provedeno u širokom koncentracijskom području kalcija 2,0 mmol $dm^{-3} \leq c_i(Ca^{2+}) \leq 10,0$ mmol dm^{-3} te oksalata 0,6 mmol $dm^{-3} \leq c_i(C_2O_4^{2-}) \leq 8,0$ mmol dm^{-3} te je zabilježeno da u obje serije sinteza dominantno taloži COM. Također, zaključeno je da pH_i ima utjecaja na taložne sustave s obzirom da pri $pH_i = 9,0$ taloži smjesa COM i COD (w(COD) < 10 %), što nije bio slučaj pri $pH_i = 5,0$ gdje u svim uzorcima taloži čisti COM oblik. To istodobno potvrđuje literaturne navode da kalcijev oksalat taloži i u kiselom i lužnatom mediju, dok COM preferira ipak kiseli medij. Također je pretpostavka da prisutnost NaCl i drugih anorganskih iona u sustavu umjetnog urina stabiliziraju metastabilni oblik u područjima više prezasićenosti, što je posebice izraženo pri $pH_i = 9,0$.

Bitno je naglasiti da do taloženja nije došlo u sustavima umjetnog urina u koncentracijskom području oksalata $c_i(C_2O_4^{2-}) \leq 0,6$ mmol dm^{-3} te pri ekvimolarnim koncentracijama reaktanata $c_i(Ca^{2+}) = c_i(C_2O_4^{2-}) = 2$ mmol dm^{-3}, odnosno sve dok vrijednosti prezasićenosti ne dosegnu vrijednosti veće od $S_i = 10$. Značajnije razlike između vrijednosti prezasićenosti kod oba pH_i nisu uočene, dok se raspon vrijednosti mijenjao $3,81 \leq S_i \leq 24,40$. U svim sustavima i pri oba pH_i, vrijednosti prezasićenosti ne prelaze $S_i = 30$, što su Carvalho i Vieira evidentirali kod istraživanja kalcijeva oksalata u pravom urinu. Značajnije količine iona koji mogu djelovati kao potencijalni inhibitori u pripremljenoj otopini umjetnog urina mogu utjecati na smanjivanje prezasićenosti sustava što direktno utječe na tendenciju taloženja.

Prezasićenost sustava se također može povezati i s morfologijom kristala kalcijeva oksalata dobivenih spontanim taloženjem u umjetnom urinu. Naime, u obje serije je uočena tendencija agregacije manjih kristala, dok su u kiselijem mediju ($pH_i = 5,0$) uočeni šesterokuti, pločasti, prizmatski COM te kristali s pravilnijim rubovima. U lužnatijem mediju ($pH_i = 9,0$) dominantniji su zaobljeniji, nepravilni i agregirani oblici već pri nižim prezasićenostima. Pri $pH_i = 5,0$ je također uočena dendritna struktura COM, dok u sustavu s najmanjom koncentracijom oksalata $c_i(C_2O_4^{2-}) = 2$ mmol dm^{-3} i najvećom kalcija $c_i(Ca^{2+}) = 10$ mmol dm^{-3} pri $pH_i = 9,0$ COD taloži kao karakteristična tetragonalna bipiramida.

Ovakva vrsta istraživanja je vrlo korisna u svrhe i s ciljem boljeg razumijevanja utjecaja kompleksnosti sustava na taloženje kalcijeva oksalata. Na taj način se pokazalo da

koncentracija reaktanata i prezasićenost nisu jedini i presudni čimbenici koji utječu na sastav i morfologiju istaloženih kristala kalcijeva oksalata, već da bitnu ulogu imaju i početni pH te sama kompleksnost sustava kao što je otopina umjetnog urina.

6. LITERATURA

[1] V. Šerić, V. Babić-Ivančić, H. Kuveždić, A. Tucak, Med Vjesn 42 (2010) 285-288.

[2] N. Mamizadeh, N. Hooman, H. Otukesh, R. Hosieni, A. Nickavar i M. Goldasteh, J. Ped. Nephrology 3 (2015) 121-123.

[3] A. S. Bramley, M. J. Hounslow i R. L. Ryall, Chem. Eng. Sci. 52 (1997) 747-757.

[4] K. Pitt, G. P. Mitchell, A. Ray, B. R. Heywood i M. J. Hounslow, J. Cryst. Growth 361 (2012) 176-188.

[5] C. Conti, M. Casati, C. Colombo, M. Realini, L. Brambilla i G. Zerbi, Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 128 (2014) 413-419.

[6] A. Šter, S. Šafranko, K. Bilić, B. Marković i D. Kralj, Urolithiasis. 46(3) (2018) 243-256

[7] D. Škrtić, M. Marković, Lj. Komunjer i H. Füredi-Milhofer, J. Cryst. Growth 66 (1984) 431-440.

[8] D. Škrtić, H. Füredi-Milhofer i M. Marković, J. Cryst. Growth 80 (1987) 113-120.

[9] M. J. Semins, B. R. Matlaga, Ther Adv Urol. 2(1) (2010) 3-9.

[10] P. J. Christo, L. Manchikanti, X. Ruan, M. Bottros, H. Hansen, D. R. Solanki, A. E. Jordan, J. Colson, Pain Physician 14(2) (2011) 123-43.

[11] A. E. Nielsen, Croat. Chem. Acta 42 (1970) 319-333.

[12] H. Füredi-Milhofer, Croat. Chem. Acta 53 (1980) 243-254

[13] J. W. Mullin, Crystallization, 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001.

[14] J. Everett Helt, Effects of supersaturation and temperature on nucleation and crystal growth in a MSMPR crystallizer, Retrospective Theses and Dissertations. 6213, 1976.

[15] P. Somasundaran, Encyclopedia of Surface and Colloid Science, 3rd edition, CRC Press, 2015.

[16] Lj. Brečević i D. Kralj, Kinetics and Mechanisms of Crystal Growth in Aqueous Systems, N. Kallay (ur.), Interfacial Dynamics, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, New York, 2000

[17] W. Ostwald, W. Engelmann (ur.), Grundriss der Allgemeinen Chemie, Leipzig, 1899, str. 6.

[18] D. Škrtić i suradnici, Med Vjesn, 22(3) (1990) 65-71.

[19] https://www.chop.edu/conditions-diseases/ureteropelvic-junction-upj-obstruction (20.8.2018.)

[20] R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, Rev Miner Geochem 54 (2003) 95–114.

[21] D. Kumari et al., Adv Appl Microbiol 94 (2016) 79-108.

[22] S. Weiner, P.M. Dove, Rev Mineral Geochem. 54 (2003) 1–29.

[23] E. Königsberger, L. Königsberger, Biomineralization – Medical Aspects of Solubility, 1st edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

[24] K. P. Aggarwal, S. Narula, M. Kakkar, C. Tandonm C, BioMed Res Int (2013).

[25] J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1991.

[26] H. G. Tiselius, B. Hess, E. Boeve, Eur. Urol. 41 (2002) 1-11.

[27] M. Sikirić, Taloženje mineralnih soli mokraćnih kamenaca, Magistarski rad, PMF Zagreb, 1998.

[28] http://www.virtualmedstudent.com/links/renal/nephrolithiasis.html (25.8.2018.)

[29] H. Kuveždić et al., Liječ Vjesn, 136 (2014) 68–72.

[30] K. Ahmed, P. Dasgupta, M. S. Khan, Postgrad Med J. 82(974) (2006) 799-801.

[31] https://www.marinahospital.com/urology/shock-wave-lithotripsy (26.8.2018.)

[32] F. Vlašić, Med Vjesn 22(3) (1990) 73-77.

[33] L. H. Smith, Trans Am Clin Climatol Assoc. 113 (2002) 1–20.

[34] http://etc.usf.edu/clipart/46600/46609/46609_calc_crystal.htm (29.8.2018.)

[35] W. Heijnen, W. Jellinghaus, W. E. Klee, Urol Res 13 (1985) 281-283.

[36] E. Sokol, E. Nigmatulina, N. Maksimova i A. Chiglintsev, Eur. J. Mineral. 17 (2005) 285-295.

[37] F. J. Opalko i S. R. Khan, J. Cryst. Growth 181 (1997) 410-417.

[38] A. Thomas, Biomimetic Growth and Morphology Control of Calcium Oxalates, Doktorski rad, TU Dresden, Njemačka, 2009.

[39] V. Tazzoli i C. Domenegheti, Am. Mineralogist, 65 (1980) 327-334.

[40] S. Deganello, Zeitschrift für Kristallographie, 152 (1980) 247-252.

[41] F. Grases, O. Söhnel, A. Millán, A. Costa-Bauzá, A. Conte, Current Topics in Crystal Growth Res. 1 (1994) 367-389.

[42] G. Mandel, N. Mandel, Kidney Stones: Medical and Surgical Management, F.L. Coe, M.J. Favus (ur.), C.Y.C. pak, J.H. Parks, G.M. Preminger, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

[43] X. Wei, J. Yang, Z. Li, Y. Su i D. Wang, Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 401 (2012) 107-115.

[44] J.L. Meyer and L.H. Smith, Invest. Urol. 13 (1975) 31.

[45] G.H. Nancollas and G.L. Gardner, J. Crystal Growth 21 (1974) 267.

[46] C. Sterling, Acta Cryst., 18 (1965) 917-921.

[47] A. Frey-Wyssling, Amer. J. Bot. 68 (1981) 130-141.

[48] Lj. Brečević, D. Škrtić i J. Garside, J. Cryst. Growth 74 (1986) 399-408.

[49] X. Y. Sun, J. M. Ouyang, A. J. Liu, Y. M. Ding i Q. Z. Gan, Mater. Sci. Eng. C 57 (2015) 147-156.

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

[51] S. Deganello, A.R. Kampf, P.B. Moore, American Mineralogist, 66 (1981) 859-865.

[52] J. E. Hall, Guyton and Hall textbook of medical physiology, 13th edition, Philadelphia, PA: Elsevier, 2016.

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

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

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

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

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

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

[59] P. R. Nagaraja, M. G. Preminger, J. P. Kavanagh, Urinary Tract Stone Disease, Springer-Verlag, London, 2011.

[60] J. M. Ouyang, Mat. Sci. Eng. C 26 (2006) 679-682.

[61] Leumann E, Hoppe B. The primary hyperoxalurias. J Am Soc Nephrol. 12 (2001), 1986.

[62] C.J. Danpure, Primary hyperoxaluria, The Molecular and metabolic basis of inherited disease, New York, McGraw-hill., 1995, str. 2385-2424.

[63] D. G. Assimos, H.O. Goodman, R. P. Holmes, Contemp Urol. 9 (1997) 47-60.

[64] G. Hamarsten, Etiologic Factors in Renal Lithiasis, A. J. Butt (ur.), Sprinfield: Ches. C. Thomas, 1956, str. 89.

[65] G. L. Gardner, J. Cryst. Growth, 30 (1975) 158-164.

[66] J. Kaloustian, T. F. El-Moselhy, H. Portugal, Clin Chim Acta 334 (2003) 117-129.

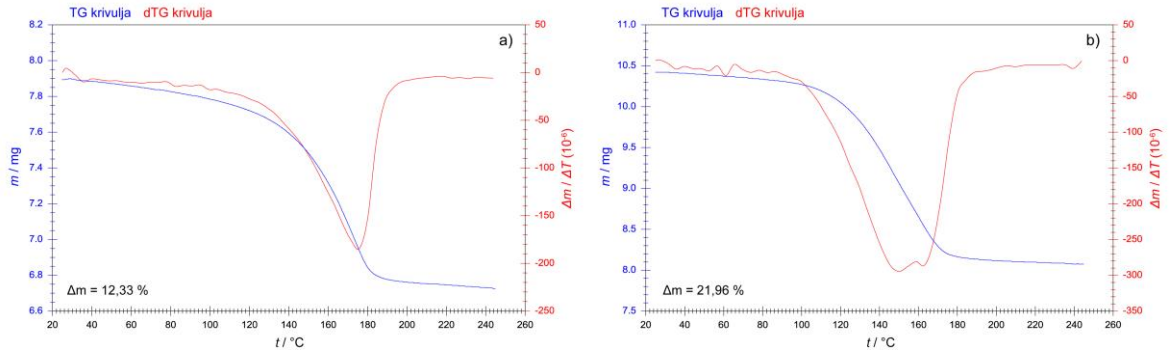
[67] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shmizu, T. Hatta, Mineralo Maga 69 (2005) 77-88.

[68] M. Berenyi, G. Liptay, J Therm Anal 3 (1971) 437-443.

[69] M. Carvalho i M. A. Vieira, International Braz. J. Urol. 30 (2004) 205-209.

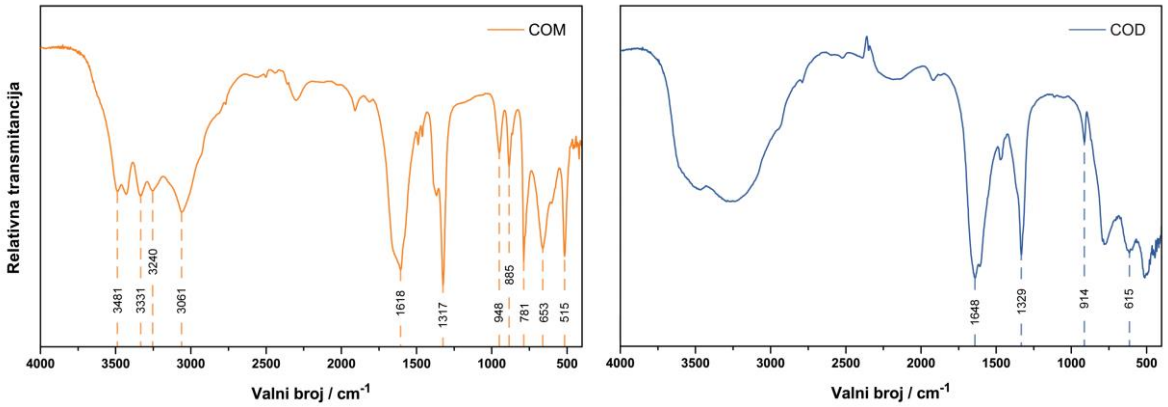
7. DODACI

7.1 TG krivulje standarda COM i COD



Slika 36. Termogravimetrijske krivulje (plavo) i prva derivacija termogravimetrijskih krivulja (crveno) standarda COM i COD (*Δm* označava teoretsku vrijednost)

7.2 FT-IR standardi COM i COD

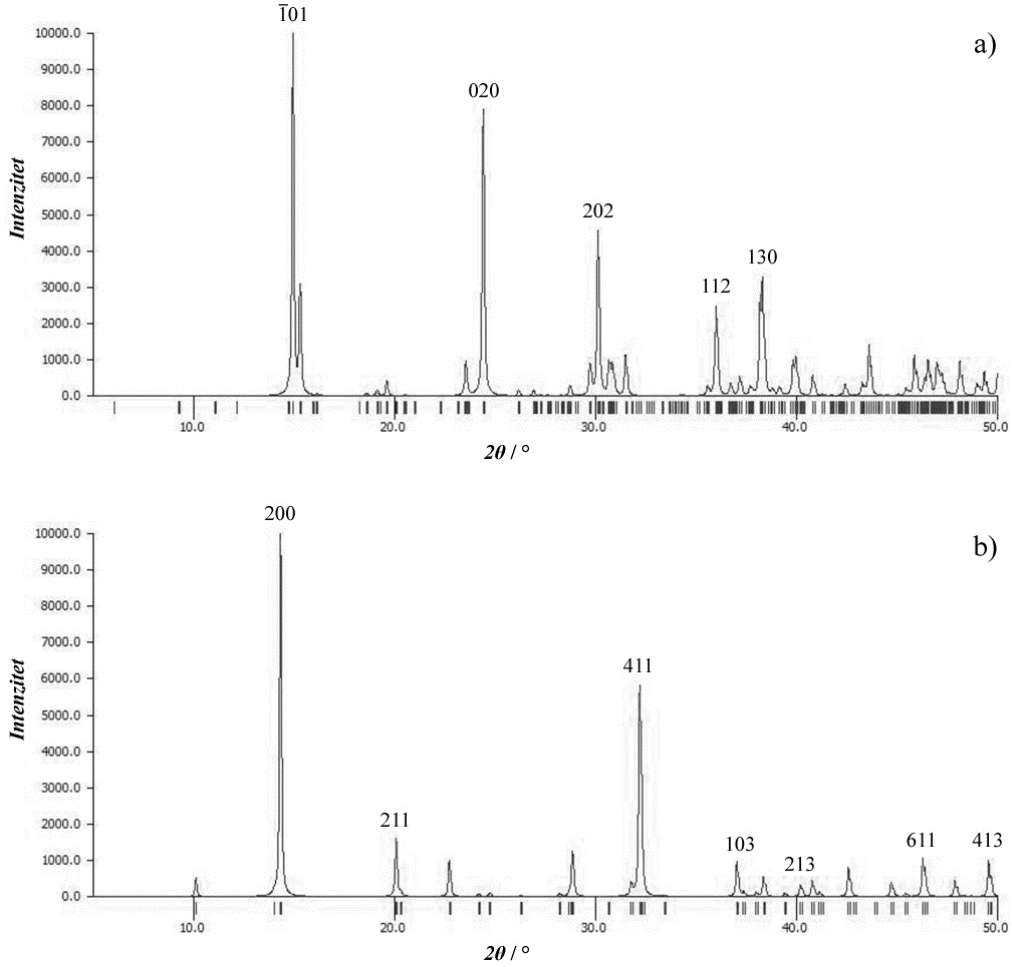


Slika 37. FT-IR standardi za COM i COD s karakterističnim vibracijskim vrpcama

Tablica 12. Karakteristične vibracije za COM, COD i COT

COM	COD	COT	Asignacija
3490 cm^{-1}	3560 cm^{-1}	3530 cm^{-1}	O-H istezanje
1622 cm^{-1}	1636 cm^{-1}	1630 cm^{-1}	Antisimetrično karbonilno istezanje
1316 cm^{-1}	1324 cm^{-1}	1375 cm^{-1}	Simetrično karbonilno istezanje
947 cm^{-1}	912 cm^{-1}		H-O-H svijanje
782 cm^{-1}	782 cm^{-1}	783 cm^{-1}	O-C-O antisimetrično svijanje
-	610 cm^{-1}	651 cm^{-1}	H-O-H svijanje
517 cm^{-1}	500 cm^{-1}	505 cm^{-1}	O-C-O antisimetrično njihanje
-	-	425 cm^{-1}	O-C-O antisimetrično mahanje

7.3 Rendgenogrami standarda COM i COD



Slika 38. Rendgenogrami standarda a) COM i b) COD (označene ravnine prema kartici 20-231 za COM i prema kartici 17-541 za COD)

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime / Prezime	**Silvija Šafranko**
Adresa	Braće Radić 2, 33514 Čačinci
E-mail adresa	safranko.silvija@gmail.com
Datum i mjesto rođenja	21/04/1994, Virovitica
Spol	Žensko
Radno iskustvo	
	Demonstrator na Praktikumu Anorganske kemije 2
09/10/2017 – 15/12/2017	Odjel za kemiju
	Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)
	http://www.kemija.unios.hr/
Djelatnost ili sektor	Odgoj I Obrazovanje
	Demonstrator na Praktikumu Anorganske kemije 1
07/03/2017 – 08/06/2017	Odjel za kemiju
	Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)
	http://www.kemija.unios.hr/
Djelatnost ili sektor	Odgoj I Obrazovanje
	Demonstrator na Praktikumu Anorganske kemije 2
16/10/2016 – 07/12/2016	Odjel za kemiju
	Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)
	http://www.kemija.unios.hr/
Djelatnost ili sektor	Odgoj I Obrazovanje
Obrazovanje i osposobljavanje	
	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer
2016 - 2018	Odjel za kemiju
	Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)
	http://www.kemija.unios.hr/
	Preddiplomski sveučilišni studij kemije
2013 - 2016	Odjel za kemiju
	Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)
	http://www.kemija.unios.hr/
Naslov završnog rada	Utjecaj mehaničkog miješanja, temperature i koncentracije citrata na taloženje kalcijeva oksalata (mentor: izv.prof.dr.sc. Berislav Marković, neposredna voditeljica: dr.sc. Anamarija Stanković)
	Srednja škola "Stjepan Ivšić" Orahovica; Opća Gimnazija
2009 - 2013	Trg Tina Ujevića 1, 33515 Orahovica

	http://www.ss-sivsic-orahovica.skole.hr/
2001 - 2009	**Osnovna škola Antuna Gustava Matoša Čačinci** Trg kardinala Franje Kuharića 3, 33514 Čačinci http://os-agmatosa-cacinci.skole.hr/

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik **Hrvatski**

Drugi jezici

Samoprocjena	Razumijevanje		Govor		Pisanje
Europska razina (*)	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C2
Njemački jezik	A2	A2	A2	A1	A1

(*) Zajednički europski referentni okvir za jezike

Računalne vještine i kompetencije: Odlično vladanje alatima Microsoft Office, OriginLab, ChemDoodle, MarvinSketch. Odlično vladanje alatima za obradu fotografija i video snimki kao što su Photoshop CS2 te Sony Vegas Pro. Također, dobro poznavanje programskog jezika Visual Basic te platforme Wordpress. U nekoliko navrata izradila logotipe (17. Ružičkini dani 2018., Dan mladih istraživača 2018.,...) te internetske stranice za konferencije domaćeg i međunarodnog karaktera

DODATNE INFORMACIJE

Znanstveni radovi u CC časopisima

2017 Šter, A., **Šafranko, S**., Bilić, K. et al. Urolithiasis (2018) 46: 243. https://doi.org/10.1007/s00240-017-0991-0

Znanstveni radovi u drugim časopisima

2018 **S. Šafranko**, D. Goman, F. Bolić, M. Sekulić, A. Stanković, N. Matijaković, I. Erceg i B. Marković: Mehanokemijska sinteza kalcijeva oksalata, KUI-21/2018 (prihvaćen za objavljivanje)

Sudjelovanje na projektima

2016 IZIP-2016; Taloženje kalcijeva oksalata u umjetnom urinu

Konferencije međunarodnog karaktera

2018 17. Ružičkini dani - „Danas znanost – sutra industrija"; Vukovar

Naslov rada: Digital technology in quantitative colorimetric analysis – **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Živković, Pavo; Stanković, Anamarija; Sečenji, Aleksandar)

2018 17. Ružičkini dani - „Danas znanost – sutra industrija"; Vukovar

Naslov rada: Calcium oxalate precipitation in model systems mimicking hyperoxaluria conditions – **postersko priopćenje** (autori: Anamarija Stanković, **Silvija Šafranko**, Jasminka Kontrec, Branka Njegić Džakula, Daniel M. Lyons, Berislav Marković, Damir Kralj)

2018	1st International Students` GREEN Conference, Osijek
Naslov rada	ColorX: A modified colorimetric method for quantitative analysis in simple systems – **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Živković, Pavo; Stanković, Anamarija; Sečenji, Aleksandar)
2018	1st International Students` GREEN Conference, Osijek
Naslov rada	New methods for biomaterial preparation: Mechanochemical synthesis of calcium oxalate monohydrate – **postersko priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Goman, Dominik; Bolić, Filip; Sekulić, Marina; Stanković, Anamarija; Matijaković, Nives; Marković, Berislav)
2017	13th Multinational Congress on Microscopy; Rovinj
Naslov rada	Microscopy in Urolithiasis Research – **postersko priopćenje** (autori: Vesna, Babić-Ivančić; Maja, Dutour Sikirić; Anamarija, Stanković; **Silvija, Šafranko**)
2016	16. Ružičkini dani - „Danas znanost – sutra industrija"; Vukovar
Naslov rada	Precipitation of calcium oxalate dihydrate – **postersko priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Bilić, Katarina; Šter, Anamarija; Marković, Berislav; Kralj, Damir)
Konferencije domaćeg karaktera	
2018	XII. susret mladih kemijskih inženjera; Zagreb, FKIT
Naslov rada	Mehanokemijska sinteza kalcijeva oksalata – **postersko priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija;** Goman, Dominik; Bolić, Filip; Sekulić, Marina; Stanković, Anamarija; Buljan Meić, Iva; Marković, Berislav; Kralj, Damir)
2017	4. Simpozij Studenata kemičara; Zagreb, PMF
Naslov rada	Taloženje kalcijevih oksalata u uvjetima hiperoksalurije – **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Stanković, Anamarija; Marković, Berislav; Kralj, Damir)
2017	12. Osječki urološki dani 5. Osječki nefrološki dani 4. Sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije; Osijek
Naslov rada	Urolitijaza i nastajanje kalcij oksalatnih kamenaca - Istraživanja u jednostavnom modelnom sustavu i u sustavu umjetnog urina u uvjetima hiperoksalurije – studentska sekcija; **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Stanković, Anamarija; Kontrec, Jasminka; Marković, Berislav; Kralj, Damir)
2016	3. Simpozij Studenata kemičara; Zagreb, PMF
Naslov rada	Djelovanje hidrodinamičkih i termodinaničkih čimbenika te aditiva na taloženje kalcijeva oksalata – **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Šter, Anamarija; Marković, Berislav; Kralj, Damir)
Ostale konferencije	
2018	45. Primatijada, regionalna znanstveno-sportska studentska manifestacija, Budva, Crna Gora, 2018.
Naslov rada	The effect of hydrodynamic and thermodynamic factors and the addition of citric acid on the precipitation of calcium oxalate dihydrate – **usmeno priopćenje** (autori: **Šafranko, Silvija**; Stanković, Anamarija; Marković, Berislav)

Nagrade i priznanja	
2018	Nagrada za najbolji poster - 17. Ružičkini dani - „Danas znanost – sutra industrija"; Vukovar Calcium oxalate precipitation in model systems mimicking hyperoxaluria conditions – **postersko priopćenje** (autori: Anamarija Stanković, **Silvija Šafranko**, Jasminka Kontrec, Branka Njegić Džakula, Daniel M. Lyons, Berislav Marković, Damir Kralj)
2018	Rektorova nagrada u akademskoj 2017./2018. godini
2018	3. osvojeno mjesto u natjecanju znanstvenih radova na 45. Primatijadi u Budvi (Crna Gora) 2018. godine
2017	Rektorova nagrada u akademskoj 2016./2017. godini
Funkcije	
2018	Predsjednica Studentskog zbora Odjela za kemiju
2017 - 2018	Zamjenica predsjednika Studentskog zbora Odjela za kemiju
2017 - 2018	Zamjenica predstavnika studenata u Sveučilišnom Studentskom zboru
2017 - 2018	Predstavnica studenata u Vijeću Odjela za kemiju
2016 - 2018	Predsjednica Odbora za multimediju i javna glasila Odjela za kemiju
2016 - 2017	Zamjena člana za stegovni sud Studentskog zbora Odjela za kemiju
Aktivnosti i organizacije	
14/06/2018	Dio organizacijskog odbora za skup „Dan mladih istraživača" u Osijeku – Grafička priprema
27/04/2018 – 02/05/2018	45. Primatijada 2018., Budva, Crna Gora - Suradnik u organizaciji za Osijek
16/04/2018 – 21/04/2018	Sudjelovanje na Festivalu znanosti 2018. usmenim i posterskim priopćenjem te sudjelovanje na radionicama
2018	Centar za informiranje i savjetovanje o karijeri (CISOK) - predstavljanje programa Odjela za kemiju maturantima
13/12/2017	Organizator studentske božićne radionice „Kemija Božića" na Odjelu za kemiju
08/12/2017 – 09/12/2017	21. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2017	Sudjelovanje na Danima otvorenih vrata 2017. usmenim priopćenjem te sudjelovanje na radionicama
24/04/2017 – 29/04/2017	Sudjelovanje na Festivalu znanosti 2017. usmenim i posterskim priopćenjem te sudjelovanje na radionicama
16/12/2016	Organizator studentske božićne radionice „Kemija Božića" na Odjelu za kemiju
09/12/2016 – 10/12/2016	20. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku