Primjena mikroskopije prilikom istraživanja bubrežnih kamenaca

Horvatić, Sanda

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:503848

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

PRIMJENA MIKROSKOPIJE PRILIKOM ISTRAŽIVANJA BUBREŽNIH KAMENACA

Diplomski rad

Sanda Horvatić

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

SANDA HORVATIĆ

PRIMJENA MIKROSKOPIJE PRILIKOM ISTRAŽIVANJA BUBREŽNIH KAMENACA

Diplomski rad

predložen Geološkom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra prirodnih znanosti, znanstveno polje geologija,

grana geologija zaštite okoliša

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Bermanca.

Zahvala

Posebno zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Vladimiru Bermancu na strpljenju, pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Srdačno se zahvaljujem dr. sc. Vesni Babić-Ivančić s Instituta Ruđer Bošković na susretljivosti, pruženom znanju i stručnim savjetima koji su olakšali pisanje ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jasenki Sremac i prof. dr. sc. Jasni Hrenović na sugestijama prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem gosponu Marinu i asistentici Andrei na utrošenom vremenu i velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog djela ovog rada, te veliko hvala dr. sc. Galji Pletikapić, kolegici s Instituta Ruđer Bošković na pomoći u eksperimentalnom dijelu i ustupljenoj literaturi.

Zahvaljujem se doktorici Alki Vrčić na ustupljenoj literaturi i stručnim savjetima. ☺

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima i braceku na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom studiranja. Gospon Entoni, hvala i tebi što si uz mene. ^^

Svim kolegama i prijateljima veliko hvala jer bez vas studij ne bi bio tako zabavan, a posebno hvala mojim najdražim kolegicama, Sanjuški i Emmaču. Curke, najbolje ste. ☺

Sanda

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Diplomski rad

PRIMJENA MIKROSKOPIJE PRILIKOM ISTRAŽIVANJA BUBREŽNIH KAMENACA

SANDA HORVATIĆ

Rad je izrađen na: Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Horvatovac 102a, Zagreb

Sažetak: Analizirano je sedam uzoraka bubrežnih kamenaca prikupljenih od bolesnika na području grada Zagreba i grada Osijeka. Korištene su metode rentgenske difrakcije na prahu (XRD), pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i mikroskopije atomskih sila (AFM). Rentgenskom analizom dobivene su informacije o kemijskom sastavu kamenca, a pomoću SEM i AFM analiza interpretirane su morfološke značajke uzoraka. SEM rezultati pokazuju razliku u komponentama određenog kamenca, habitus kristalnih faza, te njihove strukture i teksture, dok su AFM metodom promatrane površinske jezgre kristalizacije i tragovi rasta kristala. Istraživani uzorci se razlikuju po mineralnom sastavu, te je analizama utvrđena prisutnost kalcijskih oksalata (whewellit, weddellit), fosfata (brushit, hidroksilapatit, struvit), urata i cistina.

Ključne riječi: AFM, bubrežni kamenci, fosfati, mikroskopija, oksalati, SEM, XRD

Rad sadrži: 61 stranicu, 36 slika, 16 tablica, 33 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u: Središnjoj geološkoj knjižnici, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Horvatovac 102a, Zagreb

Mentor: dr. sc. Vladimir Bermanec, akademik

Ocjenjivači: dr. sc. Vladimir Bermanec, akademik

dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.

dr. sc. Jasenka Sremac, izv. prof.

Rad prihvaćen: 13. veljače, 2015.

Zagreb, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Geology

Master of Science Thesis

USE OF MICROSCOPY IN RENAL STONES RESEARCH

SANDA HORVATIĆ

Thesis completed in: Faculty of Science, Horvatovac 102a, Zagreb

Abstract: Seven samples of renal calculi were analysed, which have been collected from patients in area of Zagreb and Osijek. Methods used for their analysis include X-ray powder diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). XRD results show the chemical composition of individual sample, and microscopic methods (SEM, AFM) are used to observe their morfological features. With SEM images individual compounds are observed and explained, including crystal habit, texture and structure of calculus. AFM images indicate different characteristics of crystal growth and the presence of surface nuclei. The composition of every sample is different. Mineral compounds in the samples include calcium oxalate (whewellite, weddellite), phosphate (brushite, hidroxiapatite, struvite), urate and cistine.

Keywords: AFM, microscopy, oxalate, phosphate, renal calculi, SEM, XRD

Thesis contains: 61 pages, 36 figures, 16 tables, 33 references

Original in: croatian

Thesis deposited in: Faculty of Science, Central geological library, Horvatovac 102a, Zagreb

Supervisor: PhD Vladimir Bermanec, Prof. Emer.

Reviewers: PhD Vladimir Bermanec, Prof. Emer.

PhD Jasna Hrenović, Assoc. Prof.

PhD Jasenka Sremac, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 13th, 2015.

Zagreb, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Pregled dosadašnjih istraživanja 3
3. Patogeneza bubrežnih kamenaca 5
4. Nefrolitijaza 7
5. Vrste nefrolitijaza i tipovi kamenaca 8
   5.1. Kalcijska litijaza 8
      5.1.1. Kalcijski oksalati 10
      5.1.2. Kalcijski fosfati 12
   5.2. Litijaza u „inficiranom mediju“ (struvitna litijaza) 14
      5.2.1. Magnezijski fosfati 14
   5.3. Uričnа litijaza 16
      5.3.1. Kamenci mokraćne kiseline 16
   5.4. Cistinska litijaza 17
      5.4.1. Cistinski kamenci 17
6. Materijali i metode istraživanja 18
   6.1. Rentgenska difrakcija na prahu (X-Ray Diffraction, XRD) 19
   6.2. Pretražna elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy, SEM) 20
   6.3. Mikroskopija atomskih sila (Atomic Force Microscopy, AFM) 22
7. Rezultati 25
   7.1. Rentgenska difrakcija na prahu 25
   7.2. Mikroskopske analize 32
8. Rasprava 51
9. Zaključak 57
10. Literatura 58

Prilog I.

1. Uvod

Zapisi o bolesti stvaranja kamenaca na mokraćnim organima potiču još iz starog Egipta. U prošlosti su se ljudi suočavali s problemima stvaranja kamenaca unutar mokraćnog mjehura, ali se u današnje vrijeme, osobito u razvijenim zemljama, bilježi češće nastajanje kamenca unutar bubrega, odnosno gornjih dijelova urotrakta (Kuzmanić, 1991). Ovisno o prehrambenim navikama, klimatskim, genetskim, anatomskim i endokrinim faktorima, te upalnim procesima u tijelu, može doći do razvitka kristala unutar mokraćnog sustava. Nefrolitijaza je pojam koji se odnosi upravo na stvaranje kamenaca unutar bubrega, koji prolaskom kroz ureter uzrokuje jake bolove, krv u mokraći i retenciju mokraće, ponekad u potpunosti.

Oko 70% bubrežnih kameca koji se javljaju kod ljudi čine kalcijski kamenci. Uz kalcijske oksalate i fosfate, bubrežne kamence izgrađuju magnezijski fosfati, mokraćna kiselina i urati. Nastali kamenac može biti jednostavnog kemijskog sastava ili može sadržavati više različitih komponenata (Coe *et al.*, 1992). U svrhu razumijevanja patogeneze (nastanka) kamenaca, te prevencije i liječenja nefrolitijaze, kamenci se moraju identificirati. Točnom identifikacijom liječnik može dati pravu terapiju (uključujući i promjene u prehrambenim navikama), i gotovo je u mogućnosti spriječiti njihov ponovni nastanak zahvaljujući suradnji i multidisciplinarnim istraživanjima. Za identificiranje kamenaca koriste se razne kemijske, fizikalne i mikroskopske metode. Da bi se dobili što bolji rezultati prilikom istraživanja bubrežnih kamenaca najbolje je napraviti analizu kemijskog i mineralnog sastava, te obradu morfologije samog kamenca. Do sada nije pronađena niti jedna metoda koja će obuhvaćati sva tri faktora, pa se zbog toga tehnike tradicionalne mikroskopije (svjetlosna i elektronska mikroskopija) kombiniraju s drugim metodama kemijske i strukturne analize, najčešće rentgenskom difrakcijom na prahu da bi se dobila pouzdana identifikacija bubrežnih kamenaca (Giannossi & Summa, 2012).

U ovom radu analizirano je sedam uzoraka bubrežnih kamenaca prikupljenih od oboljelih ljudi na području grada Zagreba i grada Osijeka. Korištene su metode rentgenske difrakcije na prahu (XRD), pretražna elektronska mikroskopija (SEM) i mikroskopija atomskih sila (AFM). Rentgenskom analizom se dobivaju informacije o kemijskom sastavu i strukturi kamenca, a SEM i AFM služe za interpretaciju njihove morfologije i topografije površine.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

Prva tri desetljeća 20. stoljeća, istraživanje bubrežnih kamenaca odvijalo se pomoću kvalitativnih kemijskih analiza koje su uključivale identifikaciju određenih kationa i aniona prisutnih u kamencima (Giannossi & Summa, 2012). Kasnije analize uključivale su kvantitativna mjerenja određenih iona pomoću atomske absorpcijske spektroskopije ili atomske emisijske spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom (ICP – AES).

1947. godine Prien i Frondel uvode polarizacijsku mikroskopiju u skupinu metoda za istraživanje bubrežnih kamenaca (Basiri *et al.*, 2012). Ona služi za otkrivanje kristalne strukture, redoslijeda taloženja i sastava jezgre kamenaca. Pomoću svjetlosnog mikroskopa mogu se odrediti optička svojstva, što uključuje boju, oblik, površinske značajke kamenca, te kristalinične slojeve i organsku materiju na površini, ali rezultati su samo kvalitativni (Giannossi & Summa, 2012).

1974. Gibson objavljuje članak u kojem interpretira rezultate istraživanja od oko 15 000 uzoraka bubrežnih kamenaca koja su izvršena rentgenskom analizom i metodom polarizacijske mikroskopije. U članku uspoređuje razlike u morfologiji kamenaca i opisuje asocijacije minerala unutar kamenaca.

Tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća povećava se uporaba fizikalnih metoda, te dolazi do prekretnice u istraživanju bubrežnih kamenaca. Fizikalne metode daju pozitivne rezultate istraživanja, uključujući infracrvenu spektroskopiju (IR spektroskopija), te se kemijske analize počinju smatrati nezadovoljavajućima, s obzirom da daju podatke samo o ionima unutar kamenca, a ne o cjelokupnom sastavu. Metoda IR spektroskopije sve se više počinje uvoditi u biokemijske laboratorije jer daje najtočnije podatke o funkcionalnim skupinama unutar kamenaca, te tako olakšava proceduru istraživanja i identifikacije određenog tipa kamenca.

Najnaprednija tehnika današnjice je mikro-XRD metoda koja koristi rentgenski mikrodifraktometar. Koristi se za klasifikaciju bubrežnih kamenaca prema sastavu, te može otkriti više od jedne komponente bez prethodne fragmentacije uzorka.

AFM analiza bubrežnih kamenaca nije često korištena metoda, više se koriste metode elektronske mikroskopije i optičke mikroskopije. Većina radova vezanih za AFM analizu bubrežnih kamenaca uključuje izolaciju pojedinog kristala u kamencu u određenoj otopini, gdje se tada gleda morfologija (habitus), odnosno jezgre kristalizacije i tragovi rasta kristala (Christmas, *et al*., 2002, De Yoreo *et al*., 2006, Basavaraj *et al*., 2007).

3. Patogeneza bubrežnih kamenaca

U procesu stvaranja kamenaca ključnu ulogu imaju tri faktora: prezasićenost urina (supersaturacija), prisutstvo inhibitora kristalizacije, te retencija kristalnih čestica (Kuzmanić, 1991).

Urin je u normalnim uvjetima prezasićena otopina, ali zbog prisutstva inhibitora kristalizacije ne mora doći do stvaranja kamenaca unutar sustava. U normalnoj zdravoj mokraći koncentracija soli kalcijskih oksalata četiri puta je veća od njihove topljivosti. Do supersaturacije urina dolazi prilikom dehidracije ili pretjeranim izlučivanjem kalcija, oksalata ili fosfata. Supersaturacija mokraćnom kiselinom ili cistinom također je ubrzana prilikom smanjenja volumena urina. Kada zasićenje mokraće kalcijskim oksalatima bude 7 do 11 puta veće od njihove topljivosti, otopljeni kalcijski oksalati mogu prijeći u svoju čvrstu fazu te formirati jezgru (nukleacija).

Jezgra se obično formira na već postojećim površinama (heterogena nukleacija), kao što su epitelna sluznica, stanice, te već postojeći kristali u mokraći. Vrlo rijetko dolazi do formiranja slobodnog kristala u otopini (homogena nukleacija), jer za takvu vrstu nukleacije moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti (visoka koncentracija, odnosno visoka prezasićenost) (Coe *et al.*, 1992). Kod visoke prezasićenosti urina ionima nekih prisutnih biokemijskih parametara (npr. kalcijevi, oksalatni, fosfatni, uratni ioni) mogu nastati nakupine koje dalje pridonose nastanku spoja koji se javlja u sastavu bubrežnog i/ili mokraćnog kamenca. Ako se supersaturacija otopine povećava, nakupine tih iona postaju sve veće i brojnije. Kada postanu stabilne, nastale jezgre mogu rasti čak i onda kada je supersaturacija urina manja od očekivane, tj. urin ne mora nužno biti toliko prezasićen za njihov daljnji rast (Coe & Favus, 1991). Nastale mikroskopske jezgre mogu formirati kamence velikih dimenzija jednostavno rastući (proces kristalizacije), ili spajanjem više jezgara u velike nakupine (agregacija) (Coe *et al.*, 1992).

Prisutstvo inhibitora u urinu je bitan faktor za nastajanje kristala u urinarnom traktu, jer su to tvari koje sprečavaju kristalizaciju unutar sustava. Oni se adsorbiraju na površinu kristala, te time sprečavaju daljnji rast kristala ili agregaciju. U inhibitore ubrajamo citrat, pirofosfat, magnezij, cink, glikozaminoglikan, nefrokalcin, te fragmente RNA (Kuzmanić, 1991).

Ioni kalcija, oksalata i fosfata mogu formirati mnogo stabilnih topljivih spojeva, međusobnim spajanjem ili spajanjem s drugim tvarima u urinu, kao što je npr. citrat. Obzirom da citrati s kalcijem tvore topljivi kompleks u mokraći (kalcij citrat), smanjuje se koncentracija kalcija u mokraći jer se veže s citratom, no s druge strane niske koncentracije citrata pospješuju mogućnost zasićenja oksalatima, te tako može doći do supersaturacije oksalatnim ionima koji su važan faktor za nastanak oksalatnih kamenaca (Coe *et al.*, 1992).

Oštećenja epitela bubrega na koje se zalijepi kristal, odnosno njihovo uklještenje na vršcima papila, dovodi do retencije kristala, a potom do njegovog daljnjeg rasta (Kuzmanić, 1991). Formiranje kristala unutar bubrega prvenstveno će ovisiti o sastavu tubularne tekućine, dok će za njihovu retenciju biti odgovorne površine bubrežnih tubularnih epitelnih stanica (Basavaraj *et al.*, 2007).

pH urina može biti važan faktor prilikom stvaranja kamenaca. S obzirom da su fosfatna i mokraćna kiselina slabe kiseline, vrlo lako disociraju u većem rasponu pH vrijednosti u urinu. Alkalni urin sadržava disocirane fosfate, što pogoduje nastanku brushita i kamenaca koji se sastoje od minerala grupe apatita. U određenim uvjetima alkalnog, odnosno lužnatog urina, najčešće uz djelovanje bakterija nastaje infektivni kamenac, struvit ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$). Ako je pH urina manji od 5,5 dominiraju kristali mokraćne kiseline, a fosfatni kamenci su rijetki. Naime, topljivost kalcijskih oksalata se ne mijenja promjenom pH uvjeta u urinu (Coe & Favus, 1991).

4. Nefrolitijaza

Formirani kamenac unutar bubrega uzrokuje određene simptome. Jedan od najvažnijih i najčešćih simptoma nefrolitijaze je ureteralna kolika, a uvjetovana je grčevitom kontrakcijom glatke muskulature uretera koja je izazvana konkrementom. To je jedna od tri najintenzivnije boli u kliničkoj medicini. Tijekom liječenja javljaju se česte komplikacije, kao što su opstrukcija mokraćnih putova, hematurija, infekcije, itd. (Kuzmanić, 1991).

Bubrežne kolike počinju vrlo naglo i povećavaju se u periodu od 15 do 30 minuta dok ne dosegnu neizdrživu bol koja izaziva mučninu i povraćanje. Bol obično počinje na području iznad struka, na bočnoj strani trupa i širi se prema preponama, što ukazuje na promjenu položaja kamenca koji se počeo kretati prema mokraćnom mjehuru. Nakon određenog perioda javlja se bol pri mokrenju ili nemogućnost uriniranja. Kada kamenac uđe u mokraćni mjehur bol prestaje u potpunosti. Bubrežni kamenci mogu uzrokovati tešku uropatiju, pogotovo ako su bezbolni, te tako ostanu neprepoznatljivi duže vrijeme (Coe *et al.*, 1992). Bolest je češća kod muškaraca u omjeru 2:1 do 4:1, a pojavljuje se obično kod osoba iznad 30 godina starosti (Kuzmanić, 1991).

5. Vrste nefrolitijaza i tipovi kamenaca

Na temelju kemijskog sastava kamenca koji je nastao unutar organizma razlikuju se: kalcijska litijaza (nastanak kalcijskih oksalata ili fosfata), struvitna litijaza (nastanak magnezijskih fosfata), urična litijaza (nastanak uričnih kamenaca) i cistinska litijaza (nastanak cistinskih kamenaca) (Kuzmanić, 1991).

5.1. Kalcijska litijaza

Ranije je istaknuto da su kalcijski kamenci najčešći, a poremećaj zbog kojeg najčešće dolazi do nastanka kalcijske litijaze je hiperkalciurija (40-70% populacije). Hiperkalciurija je pojam koji označava visoke koncentracije kalciju u urinu. Ako se dogodi povećano izlučivanje kalcija mokraćom, dolazi do povećane saturacije urina kalcijskim solima, što omogućuje početak procesa stvaranja kamenaca. Povećanim unosom tekućine u organizam relativno se smanjuje koncentracija kalcija, jer se povećava volumen mokraće. Međutim, i tada je koncentracija kalcija u mokraći „kritična“ i ima tendenciju stvaranja kristala (Kuzmanić, 1991).

Hiperkalciuriju prema postanku možemo podijeliti na renalnu, apsortivnu i resorptivnu hiperkalciuriju. Renalna hiperkalciurija se odnosi na poremećaj u tijelu kada je primarno smanjena tubularna reapsorpcija kalcija u bubregu, uslijed čega se javlja povećano izlučivanje kalcija mokraćom. Apsorptivna hiperkalciurija označava primarnu intestinalnu hiperapsorpciju kalcija u tijelu, a resorptivna hiperkalciurija nastaje prilikom povećanog izlučivanja paratireoidnog hormona (5% populacije) (Kuzmanić, 1991). Naime, paratiroidni hormon povećava intestinalnu apsorpciju kalcija, te tada podiže i reapsorpciju kalcija u bubregu. Taj poremećaj se naziva hiperparatiroidizam (Coe *et al.*, 1992).

U slučaju povećanih koncentracija kalcija u urinu, oboljelima se preporučuje smanjeni unos namirnica bogatih kalcijem (kao što su mliječni proizvodi). Ako se primjeni takav dijetetski postupak, tada se paralelno s ograničenjem kalcija treba smanjiti i unos namirnica bogatih oksalatima (čaj, repa, špinat, čokolada), jer sama redukcija kalcija omogućuje povećanu apsorpciju oksalata iz crijeva s posljedičnom hiperoksalurijom (Kuzmanić, 1991). Naime, kalcij se veže za oksalate iz hrane, te tako sprječava apsorpciju oksalata u crijevima. Kalcijsko-oksalatni spoj crijeva ne mogu apsorbirati – neprobavljiv je. Sam pojam hiperoksalurije označava visoke koncentracije oksalata u mokraći, u ovom slučaju zbog prehrambenih navika (Coe *et al.*, 1992).

Osim prehrambenih navika, uzroci koji dovode do nastanka hiperkalciurije mogu biti uvjetovani i genetski. Naime, primarna hiperoksalurija je rijetka genetska bolest. To je nasljedna bolest koja je karakterizirana formacijom bubrežnih kamenaca u mladoj dobi, s vrlo visokom koncentracijom oksalata u mokraći. To se događa zbog genetskih defekata na jetri, te je jedini lijek transplantacija jetre, tako da primatelj primi jetru sa zdravim genom. Ako se odugovlači s operacijom bubrezi mogu biti trajno i nepovratno oštećeni zbog stvaranja masivnih kristala (Coe *et al.*, 1992).

Ponekad se kod oboljelih može javiti i manjak koncentracije citrata u urinu, tzv. hipocitraturija (5-50% populacije). Citrat je važan inhibitor kristalizacije jer se veže u kompleks s kalcijevim ionom, te tako sprječava kristalizaciju kalcijskih kamenaca. Uzroci mogu biti manjak kalija u organizmu, velike količine proteina u prehrani, proljev i sl. Liječenje tog stanja uglavnom se provodi kalijevim citratom (Kuzmanić, 1991).

Kod 20% bolesnika s kalcijskom litijazom razvija se hiperurikozurija. Hiperurikozurija se odnosi na povećane koncentracije mokraćne kiseline, te se uglavnom javlja prilikom povećanog unosa namirnica bogatih purinom, te u manjoj mjeri pojačanom sintezom mokraćne kiseline (Kuzmanić, 1991). Iako to stanje uzrokuje nastanak kamenaca koje gradi mokraćna kiselina, može dovesti i do nastanka kalcijskih kamenaca. Kristal mokraćne kiseline može poslužiti kao „sjeme“ na kojem će rasti kalcijski kamenac (oksalat ili fosfat) (heterogena nukleacija) (Coe *et al.*, 1992).

5.1.1. Kalcijski oksalati

Kalcijski oksalati su u prirodi vrlo rijetki, ali se često pojavljuju u ljudskim i životinjskim organizmima gdje svojom kristalizacijom tvore probleme unutar samog organizma. Prirodno se nalaze u biljnim tkivima i u sedimentnim stijenama vezanim za organsku materiju, ali mogu biti zastupljeni i u različitim ljudskim organima i tkivima, što uključuje zube, kosti, mliječne žlijezde, urinarni trakt i sl. (Katkova *et al.*, 2007). Oni mogu kristalizirati u tri različite forme, kao monoklinski monohidrat, tetragonski dihidrat i triklinski trihidrat (caoxit). U urinarnom traktu javljaju se u dvije kristalinične forme – dihidrat i monohidrat (Grases *et al*., 1989). Dihidrat predstavlja mineral weddellit ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$), dok monohidrat predstavlja mineral whewellit ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$) (Echigo *et al.*, 2005). Oko 70% ljudskih urolita čine whewellit i/ili weddellit, kao pojedinačni kristali, ili pomješani sa ostalim komponentama kao što su fosfati, mokraćna kiselina ili urati (Tazzoli & Domeneghetti, 1980).

Whewellit

Whewellit, ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$) (Back & Mandarino, 2008) je organski mineral koji kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu (Katkova *et al.*, 2007). Često se nalazi blizu ležišta ugljena, ili u stijenama koje sadrže neku organsku materiju.

Whewellit u urinarnom traktu često dolazi u obliku grozdastih, sferičnih i zrakastih agregata (Gibson, 1974). Zasebni kristali su rijetko prisutni, ali se na kristaliničnoj masi mogu vidjeti monoklinske forme. Boja minerala nađenih u urinarnom traktu najčešće varira od smeđe do maslinasto zelene, rjeđe se nalaze žuti ili bijeli kristali. Varijabilnost boje ovisi o količini uklopaka organske materije u mineralu, što uključuje i krv. Whewellitski kamenci su uglavnom smješteni na bubrežnoj papili, maloj izbočini unutar bubrega. Kada se to dogodi kamenac u većini slučajeva sadrži jezgru koja je po sastavu fosfatna i uključuje minerale kao što su brushite ili whitlockit, te minerale iz grupe apatita. Ako se kamenac nije formirao na bubrežnoj papili uglavnom ima centralnu apatitsku jezgru. Oba tipa kamenaca se formiraju koncentrično ili radijalno oko centralne jezgre.

Weddellit

Weddellit ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) (Back & Mandarino, 2008) je organski mineral koji kristalizira u tetragonskom sustavu (Katkova *et al.*, 2007). Dobio je ime po lokalitetu gdje je nađen, u sedimentima Weddellskog mora na Antartici. Nalazi se kao autigeni mineral u tresetu i u lagunskim sedimentima. Može se formirati prilikom reagiranja kalcita i oksalne kiseline ($H_2C_2O_4$) koju ispuštaju lišajevi ili kao derivat iz otopine šišmišjeg izmeta (guano) (Frost, 2004).

Za razliku od whewellita, weddellit se u urinarnom traktu javlja u obliku dobro formiranih tetragonskih dipiramidalnih kristala i agregata formiranih oko jednog kristala (Gibson, 1974). Boja je također varijabilna, ovisno o količini uklopaka organske materije. Najčešće se javljaju kristali u rasponu od žute do bijele boje, a ponekad mogu biti i bezbojni.

Pseudomorfoza

Whewellit se može formirati parcijalnom dehidracijom weddellita, stvarajući savršene pseudomorfe. Pojavljuje se u obliku pravilnih prizmi, fino zaglađenih ili oštrih rubova (Gibson, 1974). Postoje bezbojni, žuti, zeleni i smeđi varijeteti, ponekad u istim pseudomorfama. Izmjena započinje u centru kristala i kreće prema površini, gdje je rijetko kad izmijenjen cijeli kristal. Uglavnom je kristal na rubovima neizmijenjen, vjerojatno zbog kontakta s vodenom okolinom u urinarnom traktu koja uzrokuje stabilnost weddellita. Međutim, weddellitni kamenci držani na suhom mjestu ne pokazuju dehidraciju u whewellit, čak ni nakon 5 godina.

5.1.2. Kalcijski fosfati

Grupa apatita

U grupu apatita ubrajamo niz kalcijskih fosfata, čiji se članovi vrlo teško razlikuju zbog čestih izmjena. Na temelju kemijskog sastava minerala razlikujemo fluorapatit, hidroksilapatit, klorapatit i karbonat-apatit. Ovi minerali su važan dio ljudskog organizma u kojem izgrađuju kosti i zube. Kristaliziraju u heksagonskom sustavu (Back & Mandarino, 2008). U bubrežnim kamencima javljaju se kao dva člana, hidroksilapatit, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, i karbonat-apatit u kojem funkcionalna skupina CO_3OH zamjenjuje fosfatnu skupinu (Gibson, 1974).

Oni su jedni od najzastupljenijih minerala u kamencima. Dolaze u asocijaciji s drugim tvarima koje izgrađuju kamence, često kao centar taloženja ostalih tvari. Mogu se javljati kao sitnozrnati bijeli, žuti ili svijetlosmeđi prah, te kao staklasti, masivni materijal, žute, smeđe ili crne boje. Naravno, boja je ovisna o količini uklopaka organske materije. Uglavnom su tanko laminirani, bilo da se radi o čistom apatitnom kamencu ili apatitu koji se nalazi unutar pukotina na oksalatnom kamencu. Staklasti apatit se ponekad sastoji od koncentričnih lamina debljine 2-4 mikrona tvoreći sferične kamence.

Pri neutralnoj pH vrijednosti i niskim koncentracijama magnezija u organizmu, doći će do stvaranja hidroksilapatita koji se može pojaviti kao komponenta u mješovitim kamencima, odnosno dolaziti će u asocijacijama s ostalim mineralima koji mogu tvoriti kamence (Grases *et al.*, 1998). Tada najčešće kristalizira u obliku sferula koje su vidljive pod većim povećanjem, te daju kamencu praškastu teksturu. Sferule zapunjavaju pukotine na površini kamenca i u njegovoj unutrašnjosti. Mogu se pojaviti pojedinačno ili kao aglomerat, te u većini slučajeva imaju centralnu šupljinu. Njihov mali promjer, centralna šupljina i okrugli oblik ukazuje da se razvijaju u skučenim prostorima sa slabim protokom urina. Njihov nastanak povezan je s malim šupljinama okruglastog oblika na površini kamenaca. Šupljine su ispunjene tekućinom, te ako pored njihovog otvora prođe slabi protok, tekućina unutar šupljine počinje se rotirati oko centra tvoreći vrtlog. Vrtlog taloži male čestice unutar šupljine, odnosno oko njene površine, tako da u centru zaostaje tekućina. Ta tekućina kasnije presuši i ostaje samo centralna šupljina u kamencu.

Kamenci koji nastaju tim putem mogu se, ali i ne moraju do kraja razviti. U slučaju da se razvije u potpunosti (ako ima prostora za daljnji rast), kamenac će imati centralnu šupljinu koja će biti vidljiva tek razbijanjem sferule. A ako se ne razviju u potpunosti, zbog nedostatka prostora ili oslabljenog protoka tekućine, centralna šupljina bit će uočljiva i bez prethodnog razbijanja sferule.

Brushit

Brushit ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) (Back & Mandarino, 2008) je manje zastupljeniji mineral od apatita, ali ga se svejedno smatra čestim mineralom u kamencima (Gibson, 1974). Uglavnom je vezan za kiseli medij. Javlja se u formi bezbojnih do žutih monoklinskih kristala, te često tvori radijalne agregate, dajući površini kamenaca grubu nodularnu teksturu. Ima izraženu kalavost, a na plohama kalavosti vidljiv je sedefasti sjaj. Brushitni kamenci su najčešće kuglastog oblika, te nemaju centralnu šupljinu (Grases *et al.*, 1998).

Monetit

Monetit ($CaHPO_4$) (Back & Mandarino, 2008) nije toliko čest mineral u bubrežnim kamencima. Kristalizira u triklinskom sustavu, te predstavlja brushit bez vode (Gibson, 1974). Njegova pojava u živim organizmima opisana je tek 1974. godine. Tada je proučavana i njegova formacija u ljudskom tijelu, gdje se javlja pri vrlo niskoj pH vrijednosti urina, od 4,13 do 5,08, te dolazi u asocijaciji s brushitom.

Whitlockit

Whitlockit ($Ca_9Mg(PO_3OH)(PO_4)_6$) (Back & Mandarino, 2008) unutar urinarnog trakta nije stabilan, te umjesto njega precipitira apatit. S obzirom da je whitlockit u prirodi stabilan ukoliko u svojoj strukturi ima magnezija i cinka, pretpostavka je da se ista stvar događa u ljudskom tijelu. Male količine whitlockita ponekad mogu stvoriti koricu oko kamenaca koji su građeni od struvita (magnezijskog fosfata). U asocijaciji s apatitom, whitlockit tvori debele slojeve, što upućuje na dugotrajne promjene u okolišu, te također ukazuje na obogaćenje magnezijem. U kamencima se također mogu događati izmjene funkcionalnih skupina, gdje CO_3OH zamjenjuje PO_4, kao što je već spomenuto kod minerala grupe apatita (Gibson, 1974).

5.2. Litijaza u „inficiranom mediju“ (struvitna litijaza)

Prilikom infekcije mokraćnog sustava može doći do stvaranja fosfatnih kamenaca unutar urinarnog trakta (15 – 20% populacije) (Kuzmanić, 1991). Bakterije koje posjeduju enzim ureazu (najčešće rod *Proteus*), cijepaju ureu i stvaraju amonijak. Tada mokraća postaje alkalna što pogoduje kristalizaciji fosfata obzirom da je njihova topljivost u alkalnim sredinama vrlo slaba. Terapija u takvim slučajevima mora uključivati liječenje infekcije koja je dovela do stvaranja kamenaca, te naknadno zakiseljavanje mokraće primjenom amonijeva klorida.

5.2.1. Magnezijski fosfati

Magnezijski fosfati su indikatori infekcija u urinarnom traktu. U većini slučajeva, precipitacija samih minerala može biti pojačana ili katalizirana prisutnošću patogenih organizama (Gibson, 1974). Obzirom da su magnezijski fosfati stabilni u određenim pH uvjetima, terapija pacijenata se temelji na stabilizaciji pH uvjeta u urinarnom traktu nakon nestanka infekcije, odnosno nestanka patogenih organizama (Kuzmanić, 1991).

Struvit

Struvit ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) (Back & Mandarino, 2008) je mineral koji kristalizira u rompskom sustavu (Gibson, 1974). Unutar urinarnog trakta pojavljuje se u obliku bezbojnih kristala s vrlo dobro razvijenim formama. Takvi kristali su milimetarskih dimenzija, te ispunjavaju šupljine, pukotine i pore u laminiranim kamencima građenih od praškastog apatita, koji koprecipitira sa malim kristalima struvita. Takav kamenac se najčešće grana i zadire u bubrežne šupljine, zaokupljujući prostor u kojem se inače nalazi urin. Razgranati kamenac naziva se „staghorn“ i gotovo je uvijek vezan za bakterijske infekcije uzrokovane sojom bakterija koje cijepaju ureu. Postotak apatita i struvita u „staghorn“ kamencu može varirati od Ap_0 do Ap_{100}, ali najčešći odnos ostaje između Ap_{70} i Ap_{30}. Što je veća struvitna komponenta kamenci postaju porozniji, te kristali struvita u agregatima imaju stupičast, pomalo radijalan raspored.

Inficirani urin iz kojeg precipitira struvit je alkalan, zbog prisutnog amonijaka, te zbog toga skoro nikad ne dolazi u asocijaciji s oksalatima, kiselim kalcijskim fosfatima i mokraćnom kiselinom, koji su stabilni u kiselim sredinama.

Newberyit

Newberyit ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$) (Back & Mandarino, 2008) spada u kisele fosfate, ali se unutar urinarnog trakta javlja u asocijaciji sa struvitom, te je često vezan za infekcije urina uzrokovane bakterijom *Proteus mirabilis* (Gibson, 1974). Bakterije roda *Proteus* oslobađaju amonijak (NH_3) te tako povećavaju pH urina, koji tada postaje alkalan. Newberyit u kamencima može nastati na dva načina, može precipitirati zbog bakterijske aktivnosti (alkalni newberyit) ili samostalno, ali tada precipitira u kiselom mediju (kiseli newberyit).

Newberyit kristalizira u rompskom sustavu i najčešće se javlja na površini ili u pornom prostoru apatitno-struvitnih kamenaca u obliku blijedozelenkastih do bijelih sferula. Sferule zauzimaju 10 do 20% cijelokupnog volumena kamenca, ali ako je kamenac jako fragmentiran mogu sačinjavati i do 90% volumena. Naime, mogu se javljati i u vidu dobro formiranih kristala, također na površini apatitno-struvitnih kamenaca. Kristali su obično zelene boje i manji su od 0,5 mm u promjeru.

Newberyit se može javiti i u asocijaciji s kristalima mokraćne kiseline, te predstavlja stabilni magnezijski fosfat koji je vezan za kisele uvjete urinarnog trakta. Veza između kisele i alkalne faze može biti objašnjena biološkom aktivnošću. Pretpostavka je da određeni soj bakterija stvara kiseli mikro-okoliš, te katalizira reakciju stvaranja amonijaka.

Hannayit

Hannayit, $Mg_3(NH_4)_2H_4(PO_4)_4 \cdot 8H_2O$ (Back & Mandarino, 2008), je triklinski mineral bijele boje (Gibson, 1974). Vezan je za neutralne do slabo kisele uvjete unutar urinarnog trakta, te ne spada u česte minerale bubrežnih kamenaca. U većini slučajeva tvori koricu oko kamenca, najčešće oko slabo povezanih kristaliničnih agregata.

5.3. Urična litijaza

Učestalost urične litijaze iznosi 5 do 10% sveukupne populacije (Kuzmanić, 1991). Faktori koji pogoduju nastanku uričnih kamenaca su: povećano izlučivanje mokraćne kiseline, stvaranje kiselog urina u kojem je topljivost mokraćne kiseline znatno smanjena, te manjak nekih makromolekulskih spojeva u mokraći koje utječu na topljivost mokraćne kiseline. S obzirom da takva mokraća predstavlja kiseli medij, jedina terapija oboljelih je alkalizacija mokraće.

5.3.1. Kamenci mokraćne kiseline

Kamenci mokraćne kiseline predstavljaju oko 13% sveukupnog broja bubrežnih kamenaca u svijetu (Grases *et al*., 2000). Međutim, oni nisu istraživani u istoj mjeri kao kalcijski oksalati i fosfati, a to je vjerojatno zbog relativno lake terapije, koja uključuje alkalizaciju urina i povećan unos tekućine, te se bolesnik vrlo brzo oporavlja.

Kamenci mokraćne kiseline precipitiraju iz vodene otopine, te se mogu javiti kao anhidrat ($C_5H_4N_4O_3$) ili dihidrat ($C_5H_4N_4O_3 \cdot 2H_2O$) mokraćne kiseline, ovisno o uvjetima u samom organizmu. Kamenac koji sadrži kristaliziranu mokraćnu kiselinu može sadržavati obje komponente, gdje će naposljetku dihidrat prijeći u bezvodni oblik, anhidrat mokraćne kiseline. Takvi kamenci su uglavnom javljaju kao sferulasti agregati, koji imaju glatku, ali ne ispoliranu površinu. Njihov presjek pokazuje koncentrične slojeve mikrokristalnog materijala koji se ističu u blizini jezgre kamenca. Jezgra kamenca je uglavnom sastavljena od pločastih, nasumično orijentiranih kristala mokraćne kiseline. U većini slučajeva se između kristala nalazi vlaknasti organski matriks. U nekim slučajevima nastanak kamenaca mokraćne kiseline može biti povezan s nekim bolestima kod kojih dolazi do razgradnje nukleinskih kiselina (npr. leukemija) (Sikirić, 1998).

Uricit

Uricit ($C_5H_4N_4O_3$) (Back & Mandarino, 2008) predstavlja bezvodni spoj, anhidrat mokraćne kiseline. On kristalizira u monoklinskom sustavu, te je puno učestaliji od dihidrata mokraćne kiseline (Sikirić, 1998). Dihidrat je znatno topljiviji od anhidrata, tako da se već kroz 24 sata može dogoditi transformacija dihidrata u anhidrat. Uricit također može nastati procesom nukleacije i kristalnim rastom, a ne samo faznom pretvorbom. Uglavnom se obje modifikacije javljaju u obliku pločastih kristala.

5.4. Cistinska litijaza

Razlog zbog kojeg nastaju cistinski kamenci je poremećaj u transportu diabazične aminokiseline, cistina. U takvim slučajevima mokraća je prezasićena cistinom, čija je topljivost u mokraći i inače mala, pa se ispunjavaju uvjeti za kristalizaciju i nastanak kamenaca (cistinurija). S obzirom da se cistinu povećava topljivost u pH sredini većoj od 8, terapija za oboljele je alkalizacija urina. Cistinski kamenci su relativno rijetki, javljaju se u samo 1 do 2% sveukupne populacije (Kuzmanić, 1991).

5.4.1. Cistinski kamenci

Cistinski kamenci ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$), promatrani golim okom imaju masni sjaj i uglavnom su žućkaste boje, a pomoću mikroskopa se mogu prepoznati po karakterističnim plosnatim heksagonskim kristalima cistina (Ahmed *et al*., 2006).

6. Materijali i metode istraživanja

Prilikom ovog istraživanja analizirano je sedam uzoraka prikupljenih od oboljelih ljudi s područja grada Zagreba i Osijeka. Uzorci koji su prikupljeni s područja grada Zagreba označeni su slovom K i pripadajućim brojem, a kamenci s područja grada Osijeka označeni su slovima Os, te njihovim pripadajućim brojem. Oni se makroskopski razlikuju po veličini, koja varira od nekoliko mm do 10-ak cm, boji (varijacije od bijele do tamnosmeđe), te strukturi i teksturi. U svrhu određivanja njihovog točnog faznog sastava napravljena je rentgenska difrakcija na prahu (XRD), a mikroskopske metode (pretražna elektronska mikroskopija i mikroskopija atomskih sila) korištene su za detaljniju analizu površine, odnosno za određivanje morfologije prisutnih kristala i matriksa, te same topografije površine kamenaca u vidu trodimenzionalnih slika.

Tablica 1. Popis uzoraka i njihove karakteristike

Uzorak	Boja	Morfološke karakteristike	Veličina prije fragmentacije (cm)
K5	smeđa, bijela	cjeloviti kamenac, smeđi bubrežasti agregat na kojem se nalazi bijela praškasta komponenta	≈0,4
K7	žuta	cjeloviti kamenac, na površini vidljivi razvijeni kristali	≈0,6
Os2	žuta	četiri fragmenta, praškasta površina, na unutarnjem dijelu vidljivi izduženi kristali	≈1,5
Os3	žućkasto-smeđa, bijela	cjeloviti kamenac, na žućkasto-smeđoj fazi vidljivi kristali, a bijela faza ima praškastu površinu	≈0,5
Os5	žuta	četiri fragmenta, kamenac je masivnog izgleda, kristalinična površina	≈1,5
Os7	svijetložuta	šest fragmenata, praškasta površina s nakupinama sferulita, vidljive lamine na rubovima fragmenata	≈1,5
Os11	bijela	uzorak se sastoji od dva dijela, veći dio je razgranat, a manji dio je kuglastog izgleda (sferulit)	≈10 (veći dio), ≈2 (manji dio)

6.1. Rentgenska difrakcija na prahu (X-Ray Diffraction, XRD)

Rentgenska difrakcija na prahu je brza analitička metoda koja se primarno koristi za identifikaciju kristalnih materijala, pa se tako u uzorku koji sadrži više kristalnih faza može otkriti njegov kompozitni kemijski sastav (Dutrow & Clark). Metoda je destruktivna, što znači da se uzorak mora usitniti u fini prah. XRD metoda uključuje interakciju rentgenskih zraka (valne duljine λ) s elektronima u atomu uzorka. Na mrežnim ravninama analiziranog kristala, koje su razmaknute međumrežnim razmakom (d), može doći do njihove difrakcije pod određenim kutem (θ) ako je zadovoljen Braggov zakon, koji glasi $n\lambda = 2d \sin\theta$. Tijekom eksperimenta okretanje nosača s uzorkom omogućuje difrakciju većeg broja 2θ kuteva zbog nasumične orjentacije usitnjenog materijala. Difraktirane zrake se tada detektiraju i procesuiraju u računalu. Rezultati istraživanja se prikazuju u vidu difraktograma koji sadrže difrakcijske maksimume (intenzitete) karakteristične za pojedine minerale. Dobiveni intenziteti na difraktogramu uvrste se u bazu podataka na računalu, na temelju kojih se sazna konačan rezultat istraživanja.

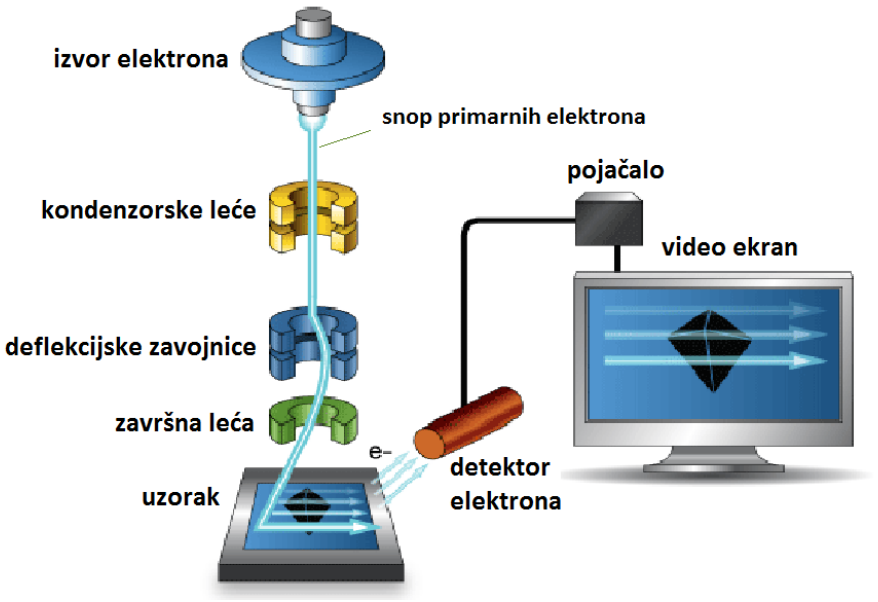
XRD je najprihvaćenija metoda u analizi bubrežnih kamenaca (bez obzira što je destruktivna) jer se jednim eksperimentom mogu identificirati svi različiti minerali u jednom bubrežnom kamencu. Prednost XRD metode je mogućnost analiziranja kamenaca koji prethodno nisu morali biti kirurški odstranjeni iz tijela, već se razbijaju izvantjelesnom litotripsijom udarnim valovima, te se fragmentirani kamenac može sakupiti iz mokraće za daljnju analizu (Giannossi & Summa, 2012).

Uzorci su analizirani na Mineraloško-petrografskom zavodu Geološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Korišten je uređaj Phillips X'Pert Pro za rentgensku difrakciju na prahu, upotrebljavajući bakrenu anodu (Cu $K\alpha$ (λ = 1.54178 Å)) pri naponu od 40 kV i jakosti struje od 40 mA.

6.2. Pretražna elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) je vrlo često korištena metoda kada je u pitanju ispitivanje detaljne morfologije određenog materijala zbog mogućeg uvećanja od 10, pa do preko 500 000 puta. Osim proučavanja morfologije materijala, pomoću SEM-a može se saznati i njegov opći kemijski sastav (Plodinec, 2014).

U SEM eksperimentu važno je da se kolona mikroskopa nalazi pod vakuumom kako bi elektroni imali istu energiju i putanju. Elektroni se pomoću termionske emisije izbacuju iz elektronskog topa (izvora elektrona) koji sadrži katodu od volframa. Naime, volfram ima najveću točku tališta od svih metala pa se može zagrijati na temperaturu pri kojoj će emitirati elektrone. Formirani snop primarnih elektrona se pomoću kondenzorskih leća fokusira u malu točku promjera 0,4-5 nm. Takav fokusirani snop elektrona prolazi kroz parove deflekcijskih zavojnica koje otklanjaju snop u x i y smjeru od osi, u svrhu skeniranja kvadratnog područja uzorka (slika 1). Skeniranje uzorka događa se prelaskom uskog snopa primarnih elektrona preko površine uzorka. Prilikom međudjelovanja elektrona iz snopa i molekula (atoma) uzorka stvara se signal koji se detektira. Signal stvara sliku na video ekranu, a oštrina slike ovisi o jačini signala s uzorka.



Slika 1. Prikaz sheme rada SEM instrumenta (preuzeto sa: MyScope (AMMRF), http://www.ammrf.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php)

Prilikom interakcije elektrona iz snopa i atoma uzorka dolazi do izbijanja elektrona iz elektronskog omotača atoma u uzorku. Izbijene elektrone nazivamo sekundarnim elektronima (SE), koji najčešće imaju energiju manju od 50 keV. Zbog svoje brojnosti i male energije, sekundarne elektrone najlakše je detektirati. SE detektor prikazuje površinu uzorka u visokoj rezoluciji, te se pomoću njega proučava morfologija uzorka.

U slučaju sudara elektrona s atomskom jezgrom atoma koji grade uzorak, elektron iz snopa može se elastično odbiti natrag. Takvi elektroni se nazivaju elektroni povratnog raspršenja ili BSE (Back Scatter Electrons), te se detektiraju pomoću BSE detektora. BSE detektor koristi se za proučavanje razlike u kemijskom sastavu materijala, tako da se uzorak prikazuje u nijansama sive boje koje odgovaraju atomskoj težini atoma uzorka. Kemijski elementi različitih atomskih brojeva uzrokovat će različiti kontrast na detektoru, te tako omogućiti daljnju kemijsku analizu uzorka.

Izbijanjem elektrona iz elektronskog omotača otvara se prazno mjesto, koje se popunjuje elektronom iz druge elektronske ljuske više energije. Prilikom tog skoka elektrona, atom emitira rentgensku zraku koja je karakteristična za svaki element. Rentgenske zrake detektiraju se pomoću detektora EDXS (energijski disperzivni rentgenski spektrometar, eng. Energy Dispersive X-ray Spectrometer), koji služi za obavljanje kemijske analize na temelju rentgenskog zračenja atoma određenog elementa.

Neki uzorci prilikom bombardiranja snopom elektrona mogu absorbirati elektrone ili ih akumulirati na samoj površini koji odbija elektronski snop, pa će i snimanje biti otežano. Priprema takvih, nevodljivih uzoraka uključuje presvlačenje uzorka nanometarskim filmom metala ili ugljika koji neće odbiti elektronski snop (Mukhopadhyay, 2003).

Uzorci su analizirani na Geološko-paleontološkom zavodu Geološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

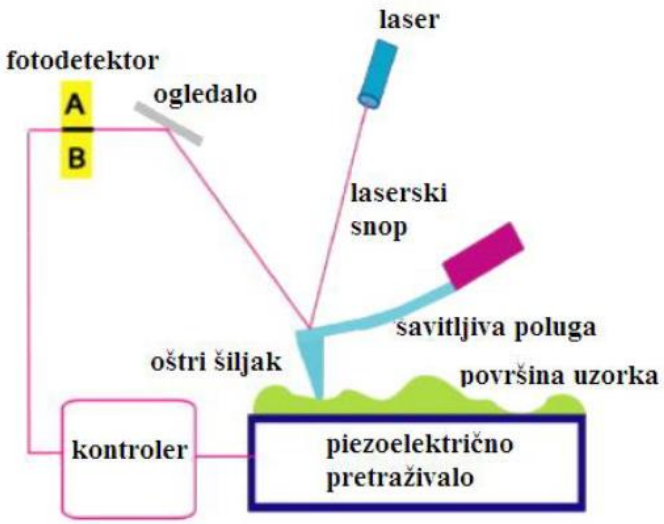
6.3. Mikroskopija atomskih sila (Atomic Force Microscopy, AFM)

AFM uređaj pripada mikroskopima s pretražnom probom (eng. Scanning Probe Microscopy, SPM) (Pletikapić, 2013). AFM se razlikuje od standardnih mikroskopa po tome što može dati prikaz površine uzorka u tri dimenzije, za razliku od svjetlosnog ili elektronskog mikroskopa. Tradicionalni mikroskopi stvaraju 2D sliku pa ne mogu dati informaciju o visini površine, te se zbog toga uzorak mora okretati ako se želi dobiti bolji prikaz razlike u visini. Za razliku od svjetlosnog i elektronskog mikroskopa koji moraju fokusirati svijetlo ili snop elektrona na površinu uzorka, AFM funkcionira tako da pretražuje površinu uzorka pomoću pretražne probe.

Pretražna proba sastoji se od savitljive poluge na kojoj se nalazi oštri šiljak, a uz probu uređaj sadrži i piezoelektrično pretraživalo na koje se stavlja uzorak, te se može pomicati u x, y i z smjeru. AFM-ov optički sustav za detekciju otklona poluge uključuje laser i fotodetektor (fotodiodu) (slika 2). Šiljak je pozicioniran na kraju savitljive poluge, dužine od 100 do 200 mikrona, te je najčešće piramidalnog ili koničnog oblika visine oko 4-5 mikrona (Eaton & West, 2010).

Savitljive poluge građene su najčešće od silicija ili silicijevog nitrida, a razlika među njima odnosi se na konstantu pojedine poluge (ovisno o tvrdoći uzorka), te na različite radijuse zakrivljenosti vrha šiljka. Radijus zakrivljenosti šiljka utječe na rezoluciju slike, a konstanta poluge određuje silu primijenjenu na uzorak (Pletikapić, 2013).

Intermolekularne interakcije između atoma uzorka i atoma šiljka uzrokuju odbijanje ili privlačenje šiljka i površine uzorka, što rezultira savijanjem poluge na kojoj se nalazi šiljak. Otklon poluge proporcionalan je sili između atoma šiljka i atoma na površini uzorka. Sustav detekcije otklona poluge mjeri magnitudu pomaka, tako da detektira lasersku zraku koja se pod kosim kutem reflektira od kraja poluge do optičkog sustava smještenog u glavi uređaja (fotodioda). Povratna sprega ostvaruje se preko baze uređaja, te omogućuje pozicioniranje uzorka s preciznošću od nekoliko Angstrema (Å). Ovisno o režimu rada može se namjestiti da piezoelektrično pretraživalo primjenjuje konstantnu silu ili konstantni otklon (deflekcija) između šiljka i površine uzorka, a pomoću računala se povratni signal Z prevodi u topografsku sliku površine (3D slika).



Slika 2. Shematski prikaz rada AFM instrumenta (preuzeto od Pletikapić, 2013)

U oslikavajuće režime rada ubrajamo kontaktni režim rada (eng. contact mode) i tapkajući režim rada (eng. tapping mode), te se pomoću njih prikazuje topografija i morfologija uzorka. Kontaktni režim rada uključuje stalni dodir šiljka i površine uzorka, te se koristi za oslikavanje tvrdih, najčešće kristalnih uzoraka, dok se tapkajući režim rada koristi za oslikavanje mekanih bioloških uzoraka.

AFM u kontaktnom režimu koristi povratnu vezu između piezoelektričnog pretraživala i fotodiode, te održava konstantan otklon poluge (deflekciju) tako da prilagođava visinu probe u svakoj točki mjerenja. S obzirom da je šiljak u stalnom dodiru s površinom uzorka dolazi do stvaranja jakih lateralnih sila koje mogu uzrokovati deformaciju mekših uzoraka. U tapkajućem režimu rada poluga se ponaša poput oscilatora (amplituda osciliranja je manja od 100 nm) kada prelazi preko površine uzorka, te tek povremeno dodiruje uzorak. Prilikom ovog istraživanja korišten je kontaktni režim rada na AFM-u.

Priprema uzoraka je vrlo jednostavna jer se uzorci prije eksperimenta ne trebaju bojiti ili prevlačiti slojem metala i sl. Najbitnije je da se uzorak čvrsto pričvrsti na atomski ravnu podlogu. Kao podloga se može koristiti tinjac, staklo, pirolitički grafit ili različite vrste membranskih filtera određene veličine pora.

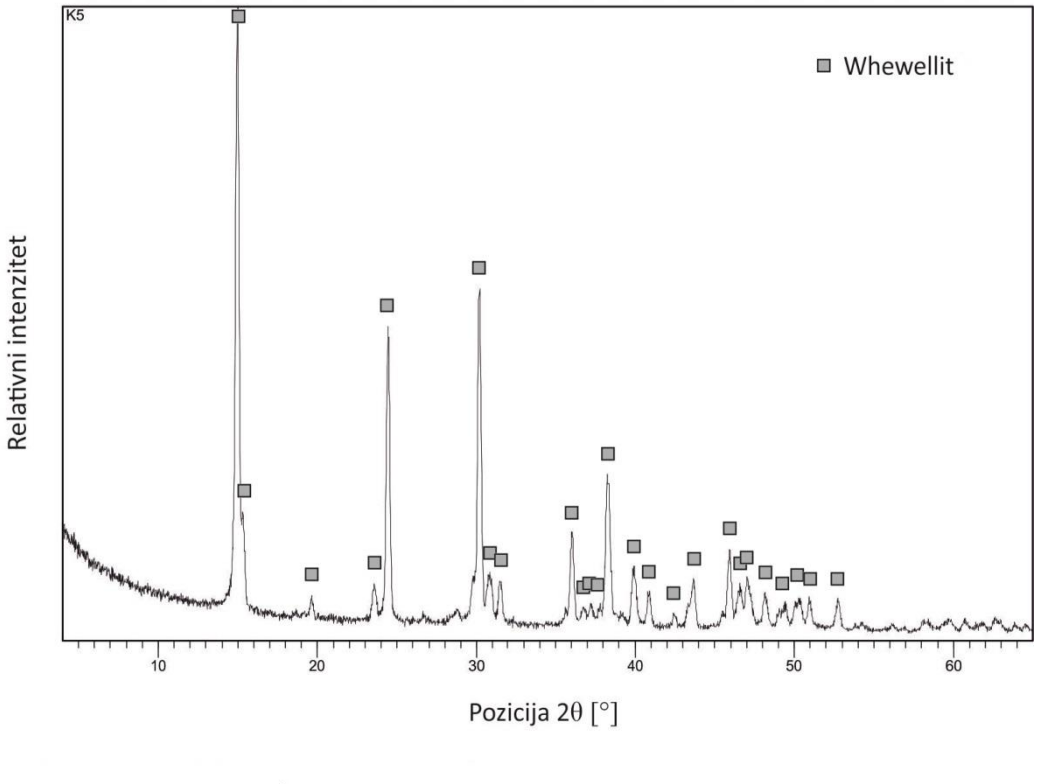
Uzorci su analizirani AFM uređajem (Multimode AFM, Nanoscope IIIa controller (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA), vertical engagement (JV) 125 mm scanner) na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Rezultati analize obrađeni su u WSxM programu za obradu AFM slika. Prilikom analiza neobrađenih AFM slika u WSxM programu (Horracas *et al.*, 2007) dobivaju se po dvije dodatne slike na kojima je vidljiv detaljan 2D i 3D prikaz površine kamenca.

7. Rezultati

7.1. Rentgenska difrakcija na prahu

Rentgenskom analizom dobiveni su difraktogrami istraživanih uzoraka kamenaca (slike 3-9), te su uz njih priložene tablice koje pokazuju identifikacijski broj kartice i kemijsku formulu određenog minerala (tablice 2-8). Tablice njihovih difrakcijskih maksimuma (tablice I-VII) nalaze se u Prilogu I.

Uzorak K5

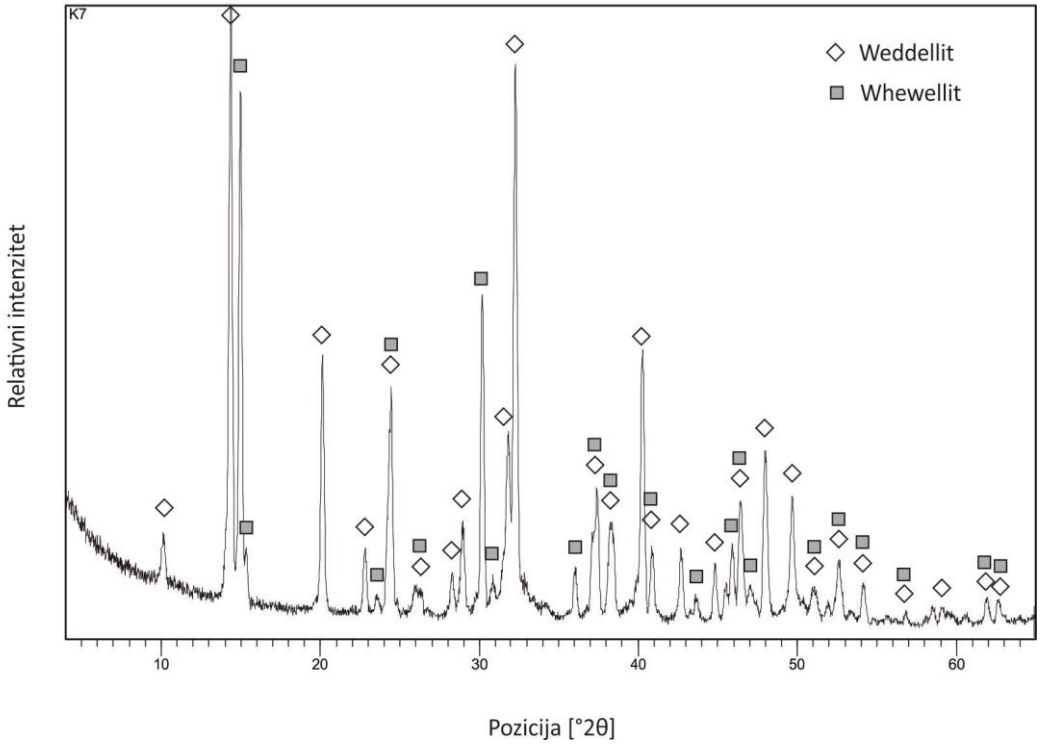


Slika 3. Difraktogram uzorka K5

Tablica 2. Broj kartice minerala whewellita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
00-020-0231	Whewellit	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$

Uzorak K7

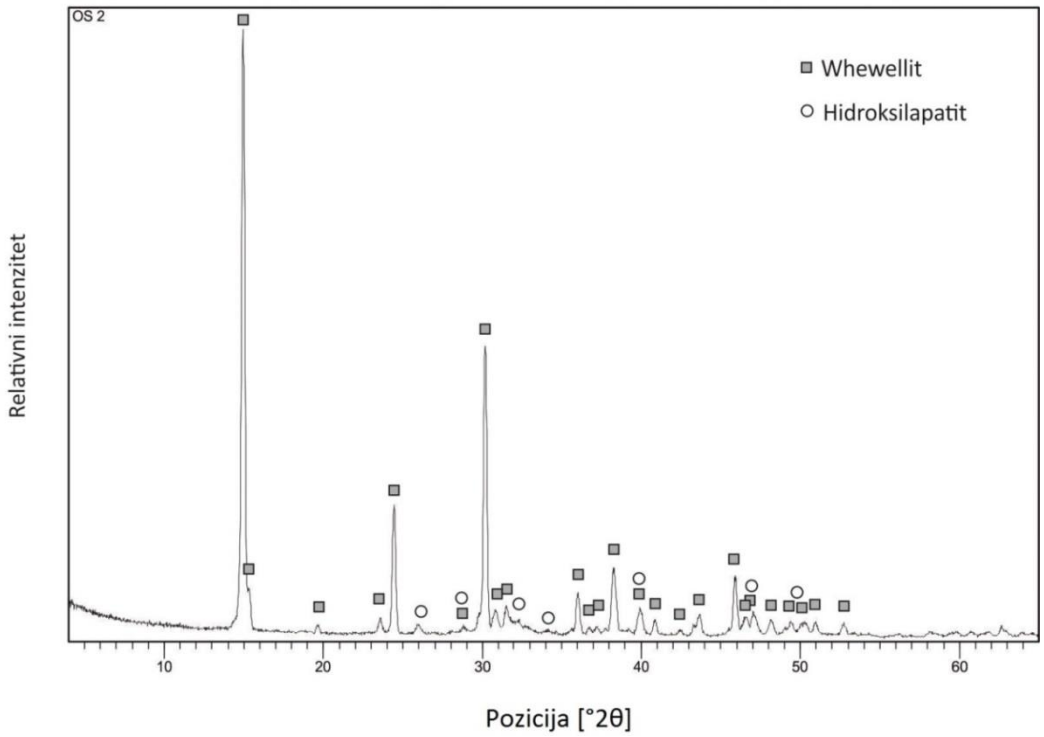


Slika 4. Difraktogram uzorka K7

Tablica 3. Broj kartica minerala weddellita i whewellita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
01-075-1314	Weddellit	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$
00-016-0379	Whewellit	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$

Uzorak Os2

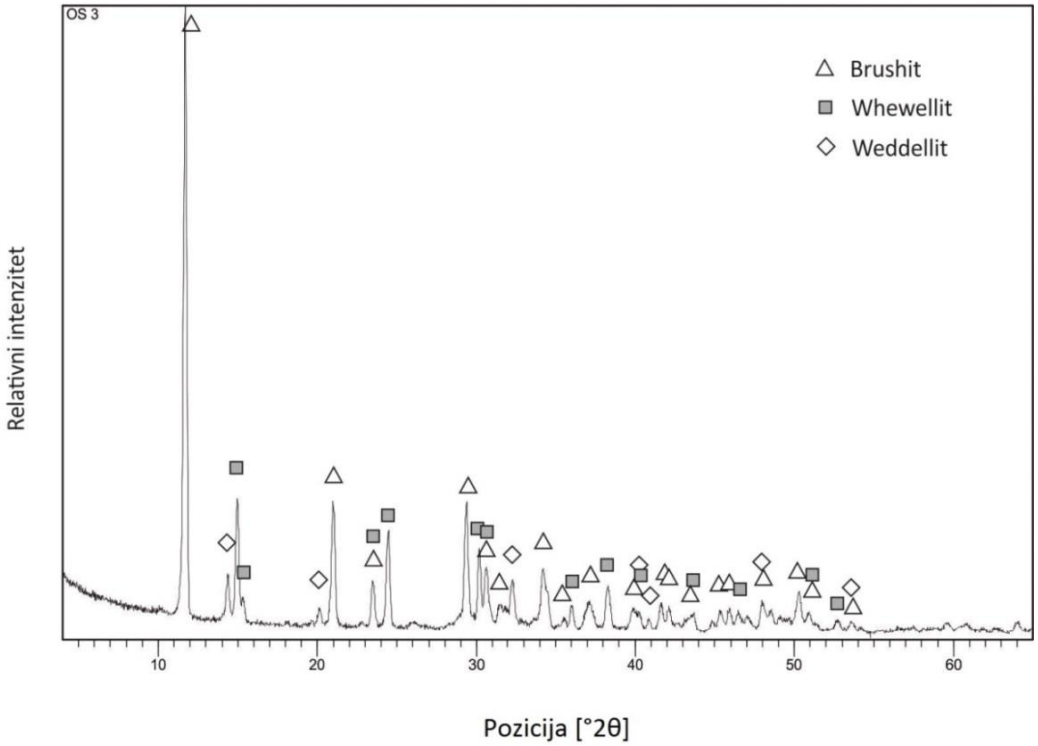


Slika 5. Difraktogram uzorka Os2

Tablica 4. Broj kartica minerala whewellita i hidroksilapatita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
00-016-0379	Whewellit	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$
00-001-1008	Hidroksilapatit	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

Uzorak Os3

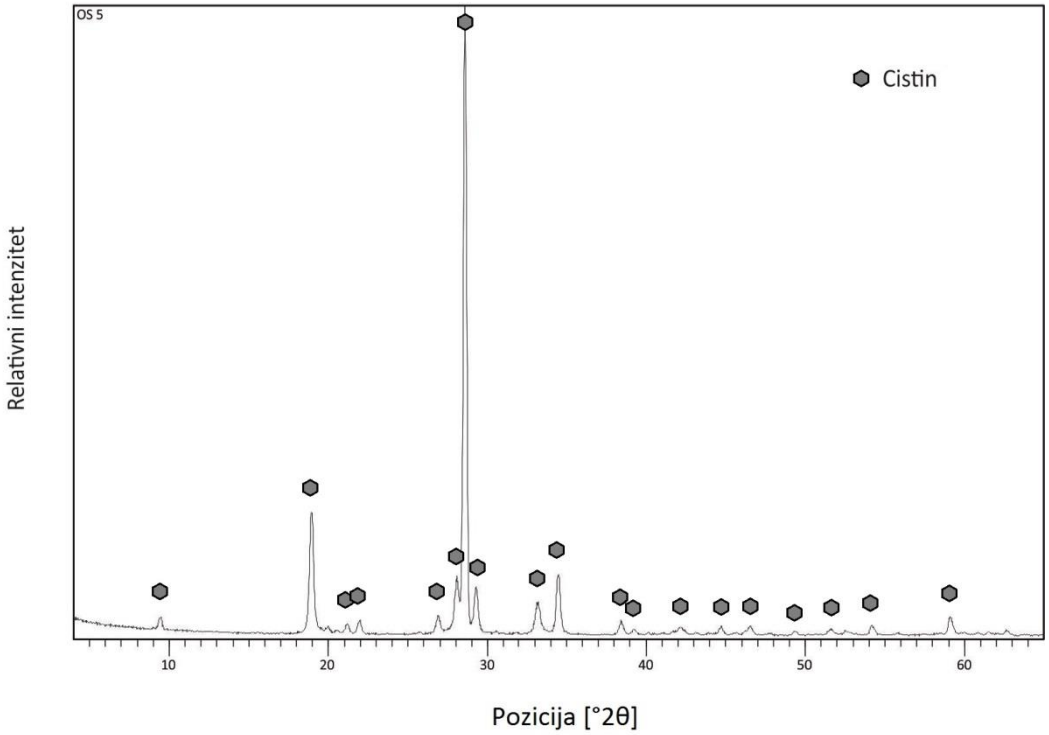


Slika 6. Difraktogram uzorka Os3

Tablica 5. Broj kartica minerala brushita, weddellita i whewellita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
00-009-0077	Brushit	$Ca(HPO_4) \cdot 2H_2O$
00-016-0379	Whewellit	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$
00-020-0233	Weddellit	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$

Uzorak Os5

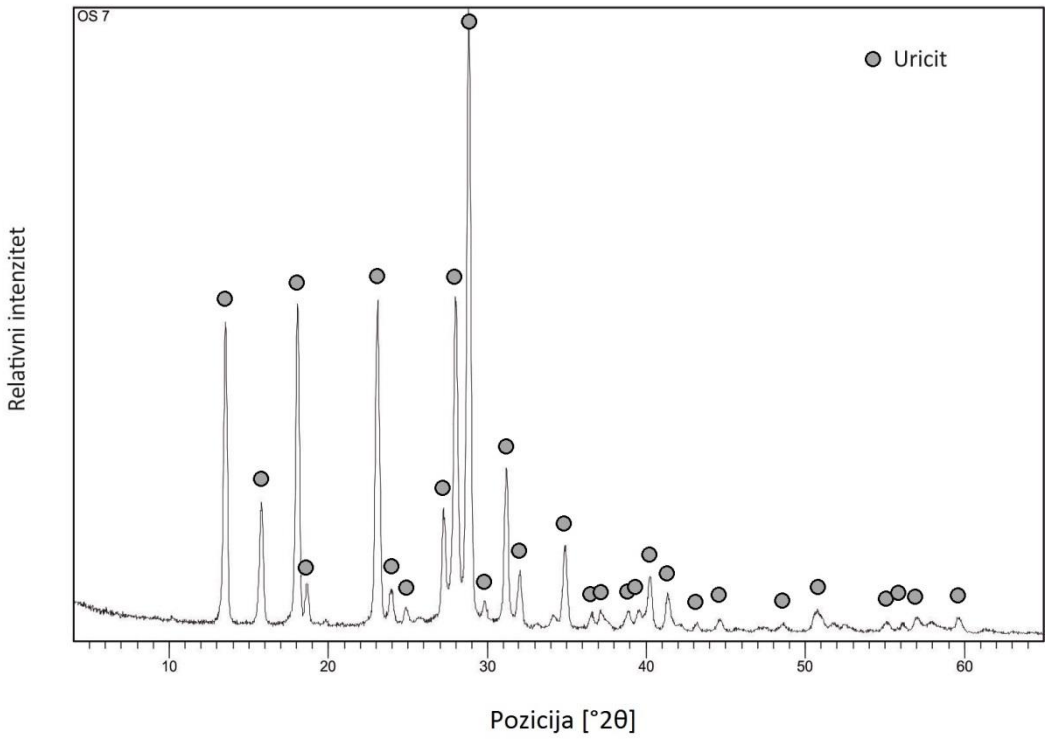


Slika 7. Difraktogram uzorka Os5

Tablica 6. Broj kartice minerala cistina

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
00-037-1802	Cistin	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$

Uzorak Os7

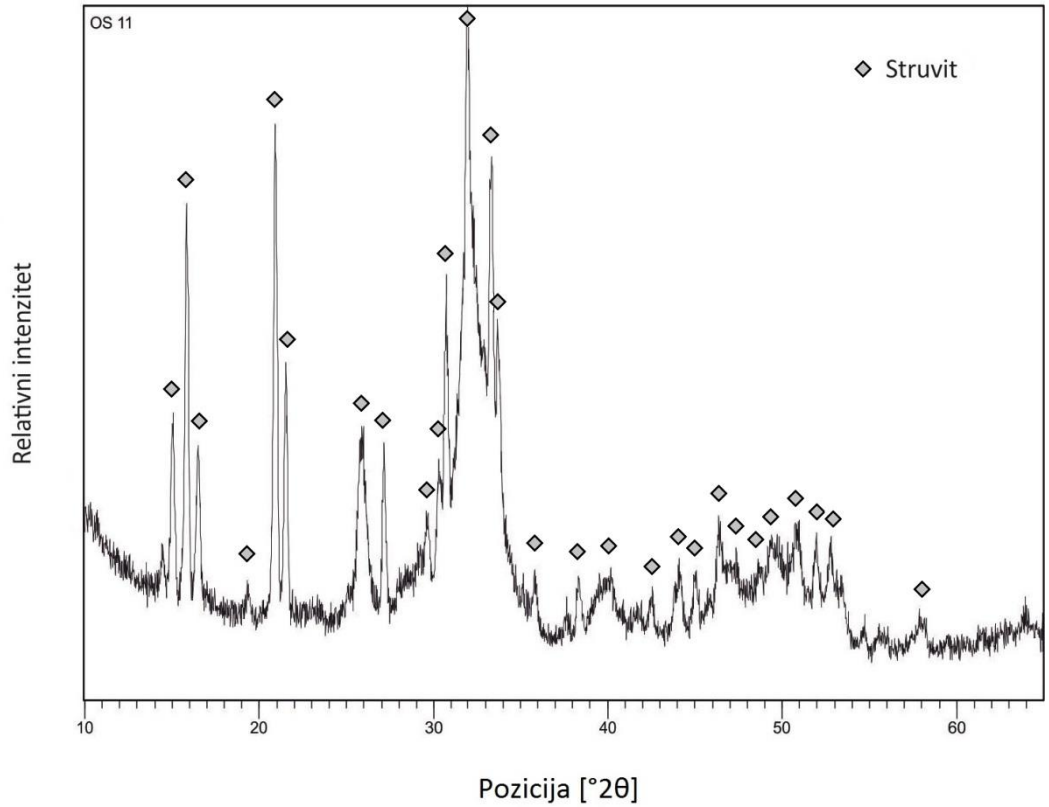


Slika 8. Difraktogram uzorka Os7

Tablica 7. Broj kartice minerala uricita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
00-028-2016	Uricit	$C_5H_4N_4O_3$

Uzorak Os11



Slika 9. Difraktogram uzorka Os11

Tablica 8. Broj kartice minerala struvita

Broj kartice	Naziv minerala	Kemijska formula
01-071-2089	Struvit	$MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$

7.2. Mikroskopske analize

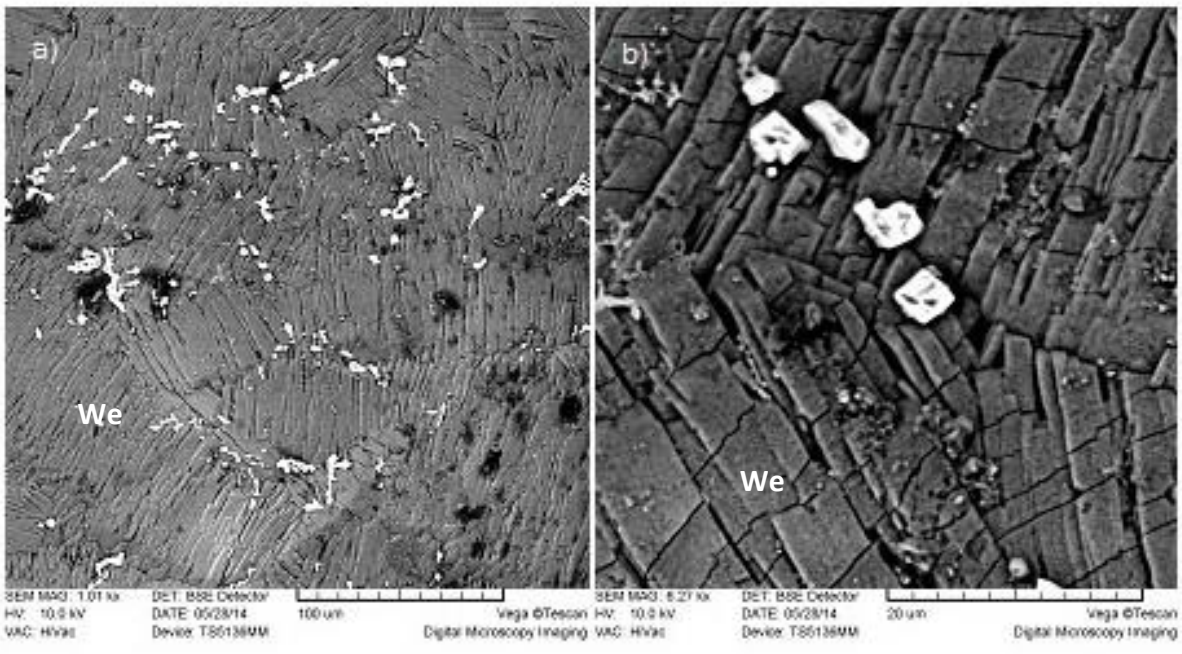
Uzorci su najprije promatrani svjetlosnim mikroskopom, pod reflektirajućim svijetlom. Analiziranje kamenaca svjetlosnim mikroskopom može dati podatke o morfologiji i određenim karakteristikama uzoraka na koje se kasnije treba usredotočiti prilikom detaljnijih analiza površine SEM i AFM metodama, s obzirom da se pomoću njih uzorak promatra pod velikim uvećanjem. Rezultati svih spomenutih mikroskopskih analiza prikazani su u nizu slika, od slike 10 do slike 36.

Kamence promatrane pod lupom pokazuju slike: 10 (K5), 15 (K7), 18 (Os2), 22 (Os3), 25 (Os5), 28 i 29 (Os7), te 33 (Os11). Dobivene slike SEM analizom za sve uzorke pokazane su na slikama redoslijedom: 11 i 12 (K5), 16 (K7), 19 i 20 (Os2), 23 (Os3), 26 (Os5), 30 i 31 (Os7), te 35 i 36 (Os11). AFM analiza uzoraka kamenaca promatranih i analiziranih u ovom radu pokazana je na slikama: 13 i 14 (K5), 17 (K7), 21 (Os2), 24 (Os3), 27 (Os5), 32 (Os7), te 35 i 36 (Os11).

Uzorak K5 (whewellit)



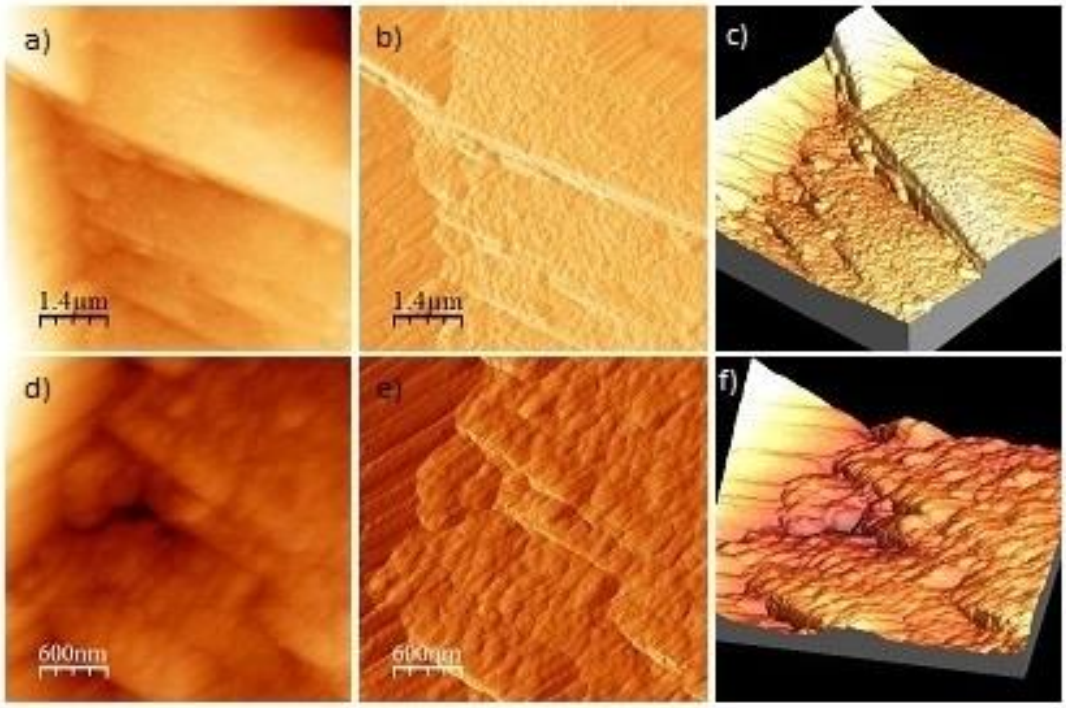
Slika 10. Na uzorku K5 vidljive su dvije kristalne faze koje se razlikuju po boji i teksturi, smeđa faza je dominantna te sadrži sferulite, dok se bijela faza javlja kao sitni prah koji prati linije spajanja sferula



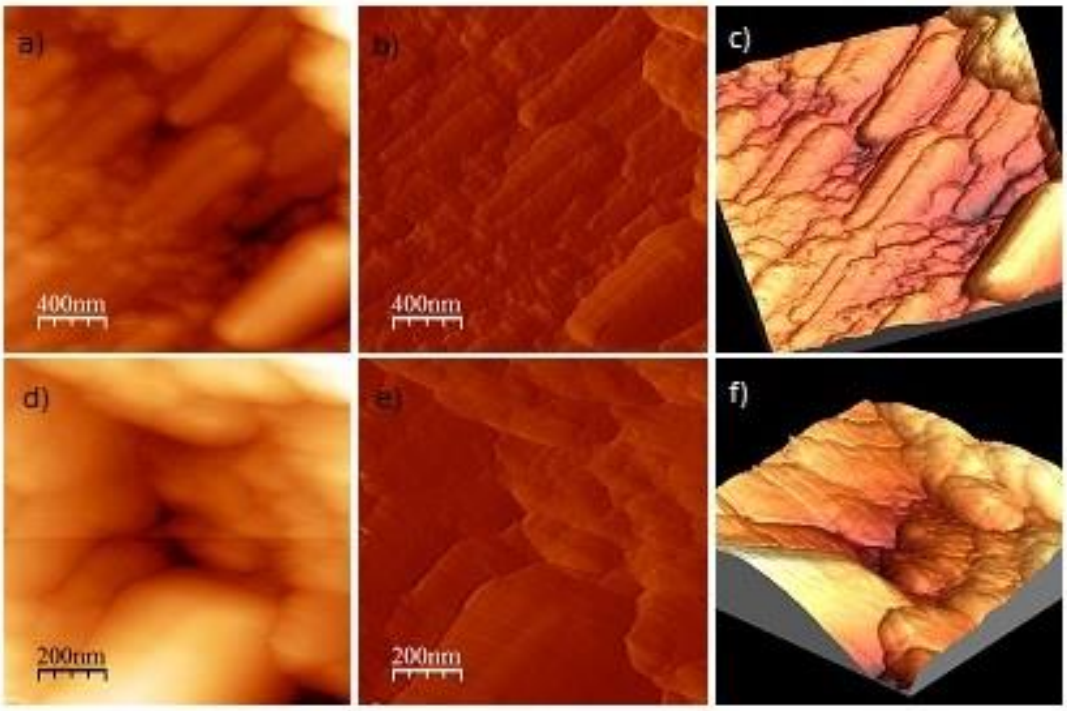
Slika 11. a) površina whewellitnog (We) kamenca snimana SEM instrumentom, minerali u kamencu pokazuju određenu orijentaciju i pravilno slaganje, veličine 10-ak µm; **b)** uvećani prikaz minerala i teških elemenata (bijele kockice)



Slika 12. SEM prikaz bijele faze na whewellitnom kamencu, hidroksilapatitne sferule (Hap) veličine od 5-10 µm



Slika 13. **a)** i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** morfološki prikaz površine kamenca, odnosno tamnosmeđe faze kristalne kamenca (whewellit) gdje je vidljiva stepeničasta struktura građena od čestica koje su manje od 1 mikrona (jezgre kristalizacije), te se njen topografski (3D) prikaz može vidjeti na slici **c)**; **e)** uvećani prikaz morfologije kamenca, te se njen topografski prikaz nalazi na slici **f)**

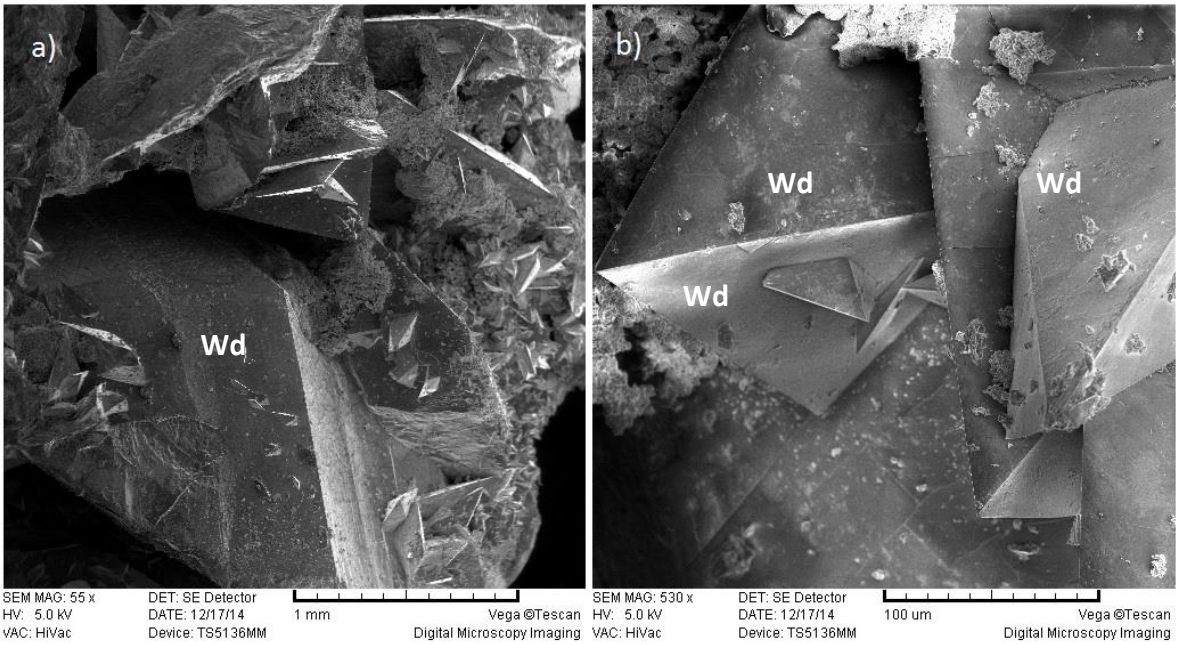


Slika 14. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** jasno vidljive orijentirane jezgre kristalizacije minerala whewellita, širine oko 200 nm, i manje, a njihov 3D prikaz nalazi se na slici **c)**; **e)** uvećani prikaz jezgara kristalizacije, njihov 3D prikaz nalazi se na slici **f)**

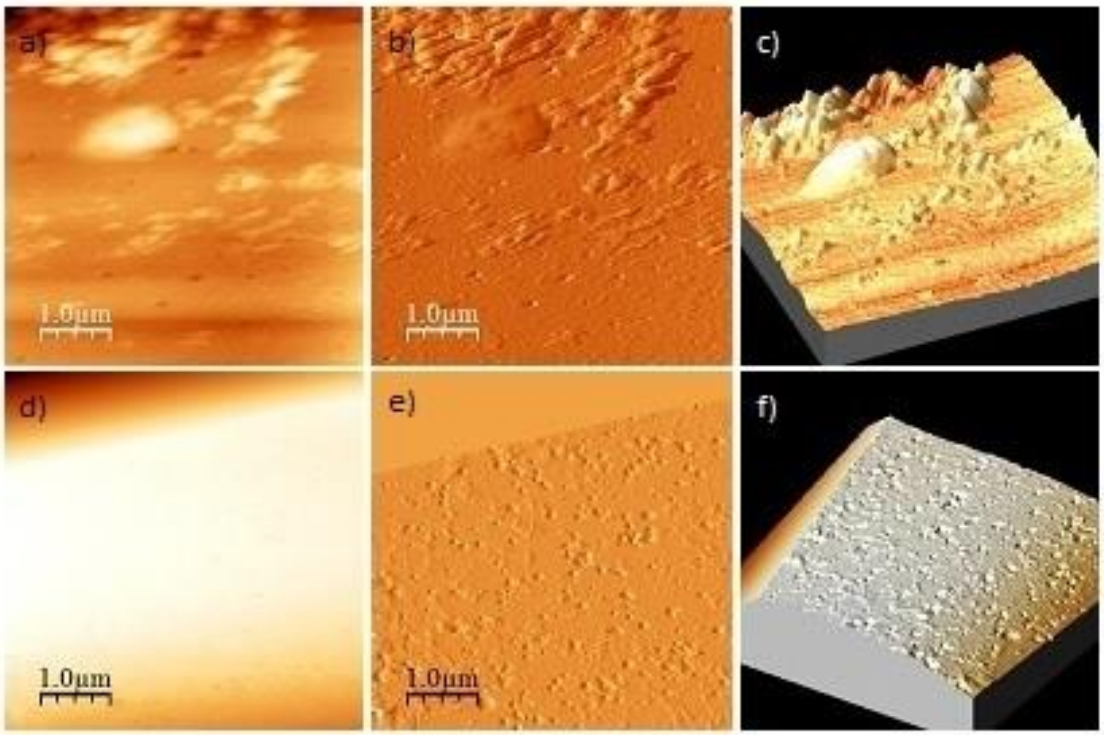
Uzorak K7 (weddellit, whewellit)



Slika 15. Na uzorku K7 vidljiva dominantna kristalna faza minerala weddellita, prepoznatljivi su po dipiramidalnoj formi kristala



Slika 16. Uzorak K7 sniman SEM instrumentom; **a)** weddellitni kristali (Wd) veći od 1mm sa sraslacima, okruženi su sitnozrnatom komponentom; **b)** uvećani prikaz sraslaca minerala weddellita, veličine kristala sraslaca variraju od 40-200 µm

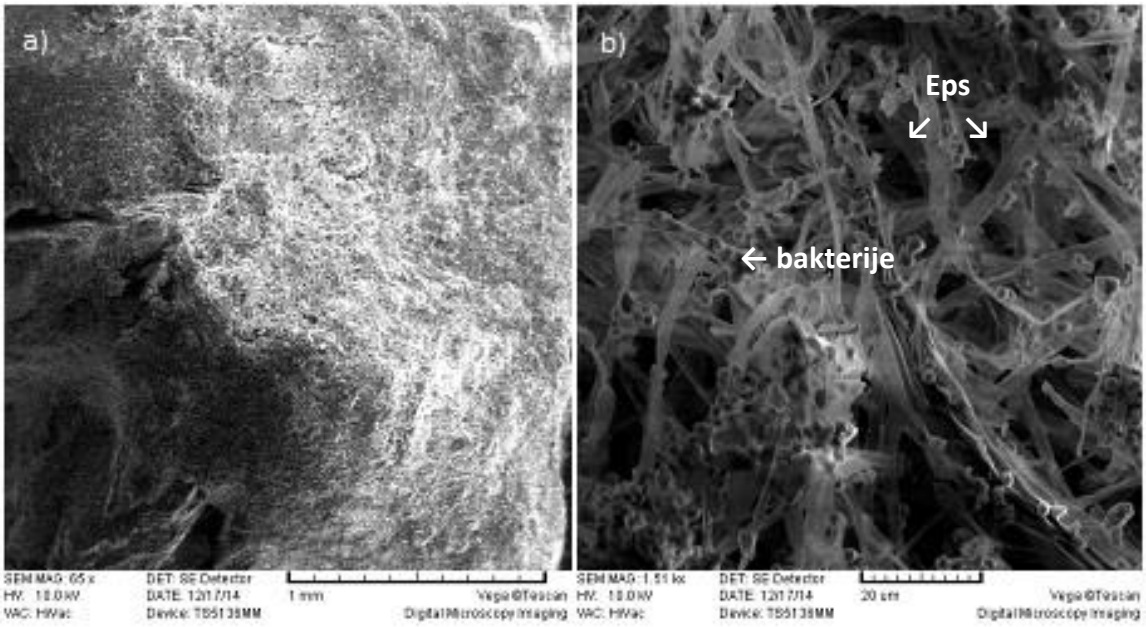


Slika 17. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** ploha minerala weddellita na kojoj se nalaze čestice građene od minerala whewellita ili nekih organskih tvari, njen topografski prikaz se nalazi na slici **c)**; **e)** jasan uvid u tragove rasta kristala koji su vidljivi kao izjedine, odnosno rupice, topografski prikaz plohe weddellita nalazi se na slici **f)**

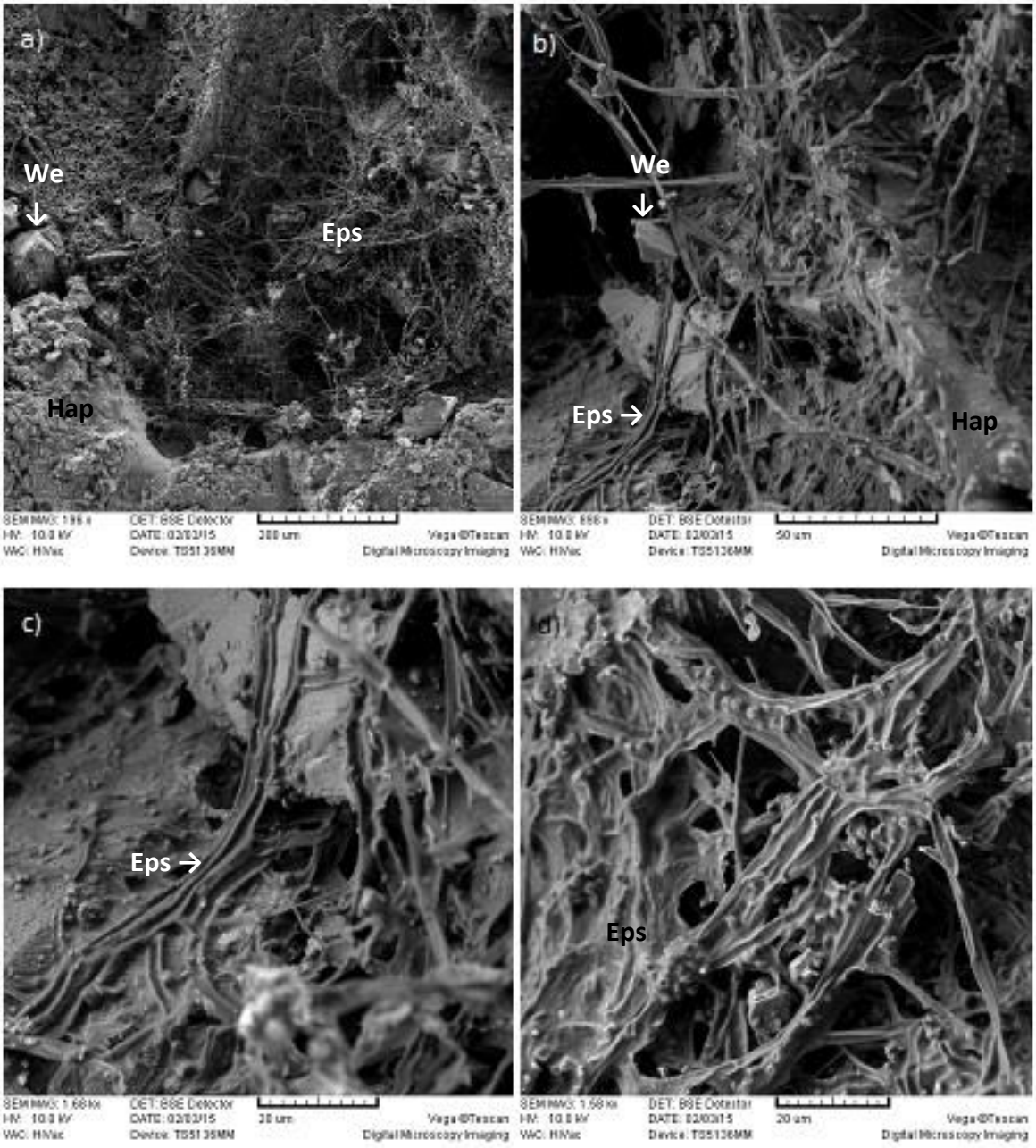
Uzorak Os2 (whewellit, hidroksilapatit)



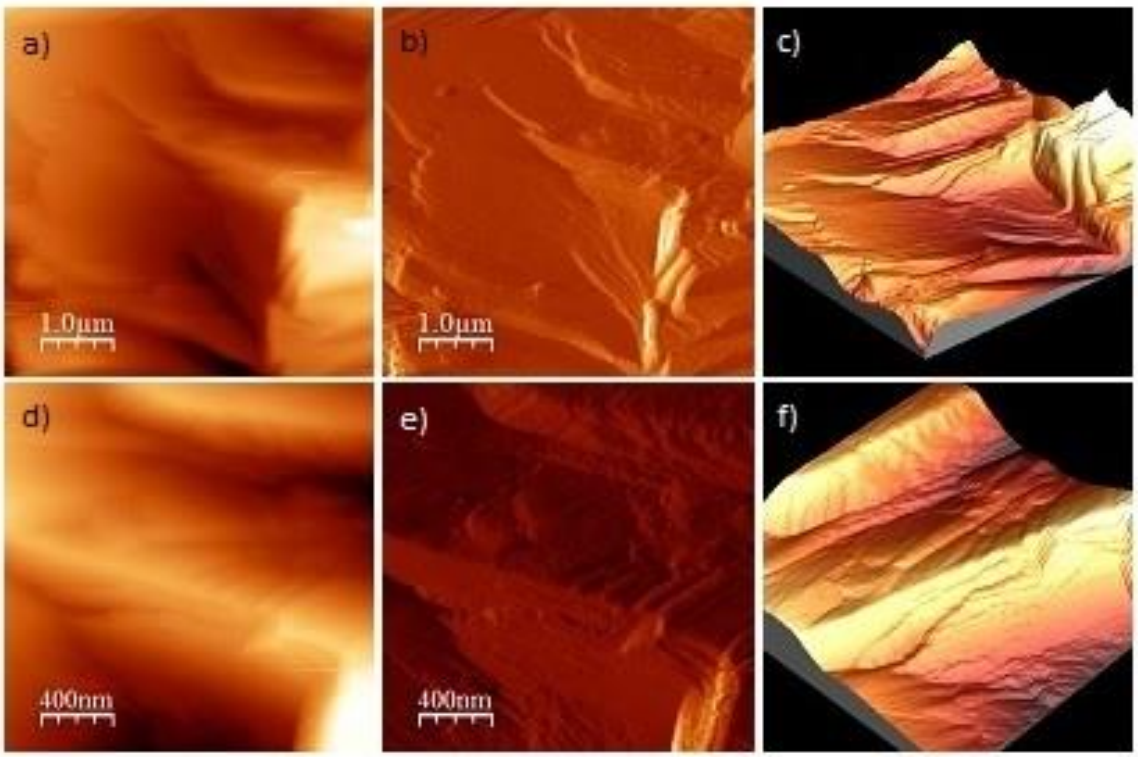
Slika 18. Uzorak Os2 sastoji se od četiri fragmenata jednog kamenca, vanjska površina se razlikuje od unutrašnjosti, s unutrašnje strane vidljivi pločasti kristali



Slika 19. Uzorak Os2 sniman SEM instrumentom; **a)** krupni plan površine kamenca whewellitnog i hidroksilapatitnog sastava (SEM); **b)** uvećani prikaz hidroksilapatitne površine, vidljiv biofilm na površini kamenca (ekstracelularni polisaharidi (Eps) + bakterije)



Slika 20. Uzorak Os2 sniman SEM instrumentom (presvučen slojem ugljika); **a)** ekstracelularni polisaharidi prekrivaju većinu površine, vidljiva je mineralna podloga, minerali hidroksilapatit (Hap) i whewellit (We); **b)** ekstracelularni polisaharidi pod većim uvećanjem; **c)** uvećani prikaz ekstracelularnih polisaharida kako prianjaju uz mineralnu podlogu; **d)** ekstracelularni polisaharidi na kojima se vidi prisutnost bakterija u nakupinama

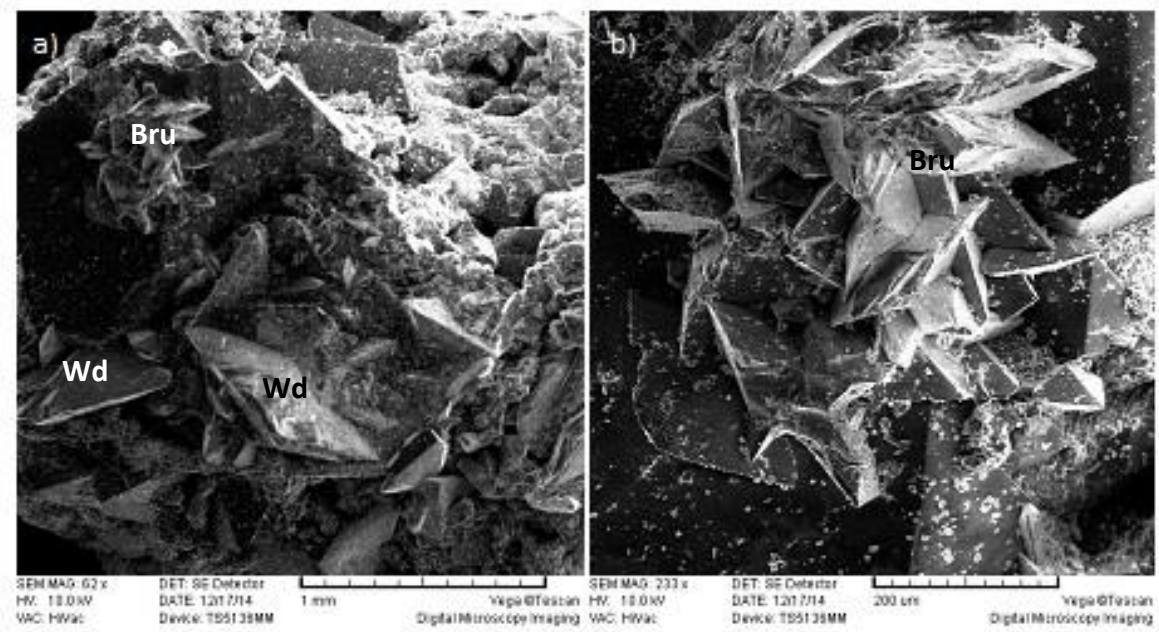


Slika 21. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** mikrometarski prikaz površine kamenca, vidljiva neravna stepeničasta struktura površine, topografski prikaz površine nalazi se na slici **c)**; **e)** uvećani prikaz površine pokazuje prorastanje dviju faza u kamencu (tanka izdužena izbočenja predstavljaju manje zastupljenu fazu u kamencu, hidroksilapatit), njen topografski prikaz nalazi se na slici **f)**

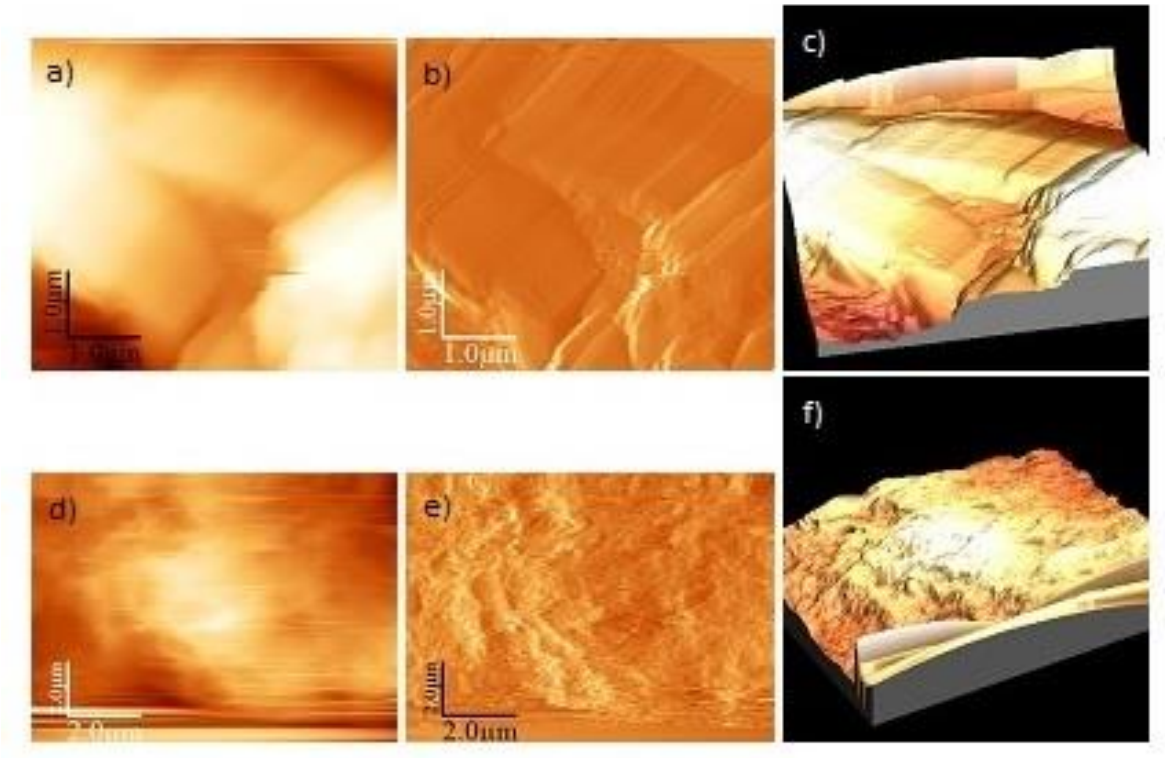
Uzorak Os3 (brushit, weddellit, whewellit)



Slika 22. Uzorak Os3 pokazuje različite mineralne faze (razlika u boji), praškasta površina



Slika 23. Uzorak Os3 sniman SEM instrumentom; **a)** kristali minerala brushita (Bru) i weddellita (Wd) koje okružuju sitnozrnate čestice; **b)** uvećani prikaz sraslaca minerala brushita

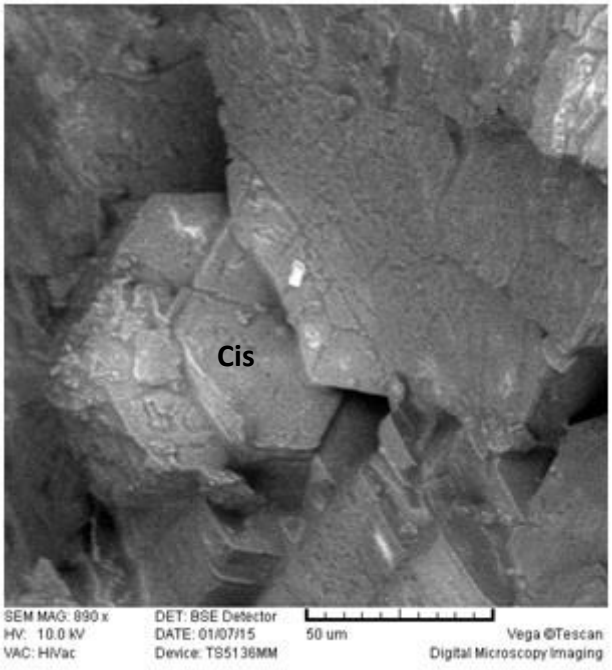


Slika 24. a) i **d)** neobrađene AFM slike (zbog greške instrumenta slike nemaju istu vertikalnu i horizontalnu dužinu); **b)** dva pločasta kristala slične orijentacije, na njihovoj površini vidljiva prutanja okomita na dužinu kristala (tragovi rasta), topografski prikaz kristala nalazi se na slici **c)**; **e)** umanjeni prikaz površine, hrapava tekstura ukazuje na prisutnost vrlo malih čestica na površini, njen topografski prikaz nalazi se na slici **f)**

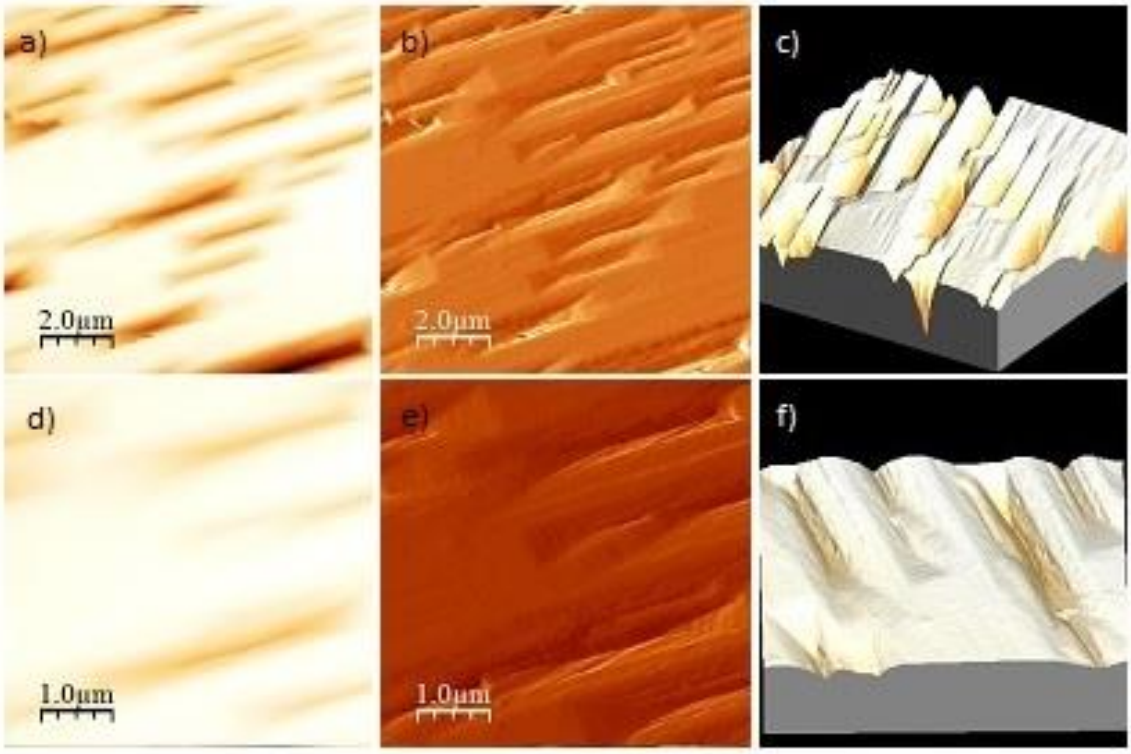
Uzorak Os5 (cistin)



Slika 25. Uzorak Os5 fragmentiran na četiri dijela, masivni izgled



Slika 26. SEM analizom snimljene heksagonske pločice, karakteristično pojavljivanje kristaliničnog cistina (Cis)



Slika 27. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** vidljiva kristalna ploha cistina sa jasnim tragovima rasta (žljebovi), njen topografski prikaz nalazi se na slici **c)**; **e)** uvećani prikaz kristalne plohe, te njena topografija (**f)**)

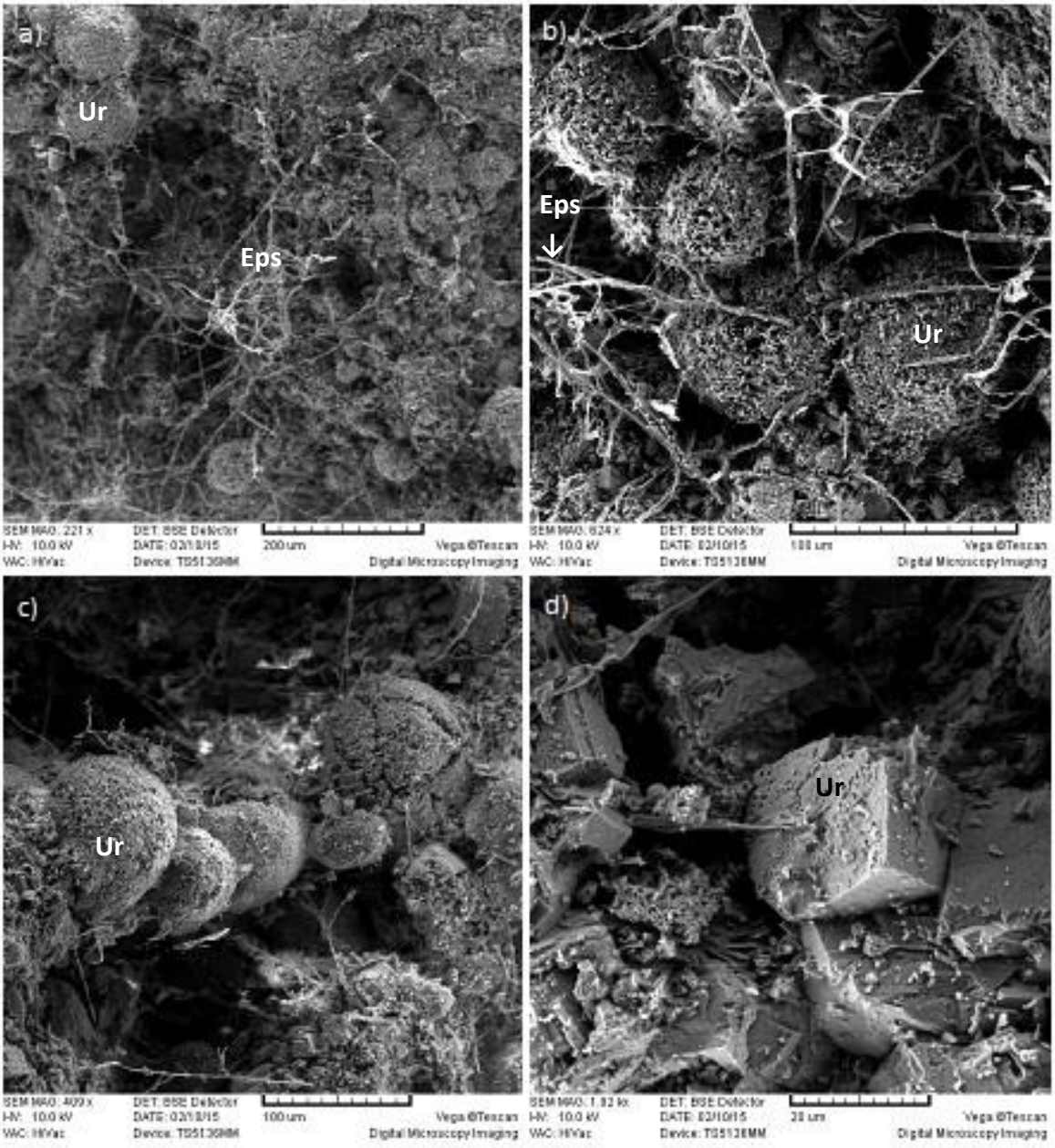
Uzorak Os7 (uricit)



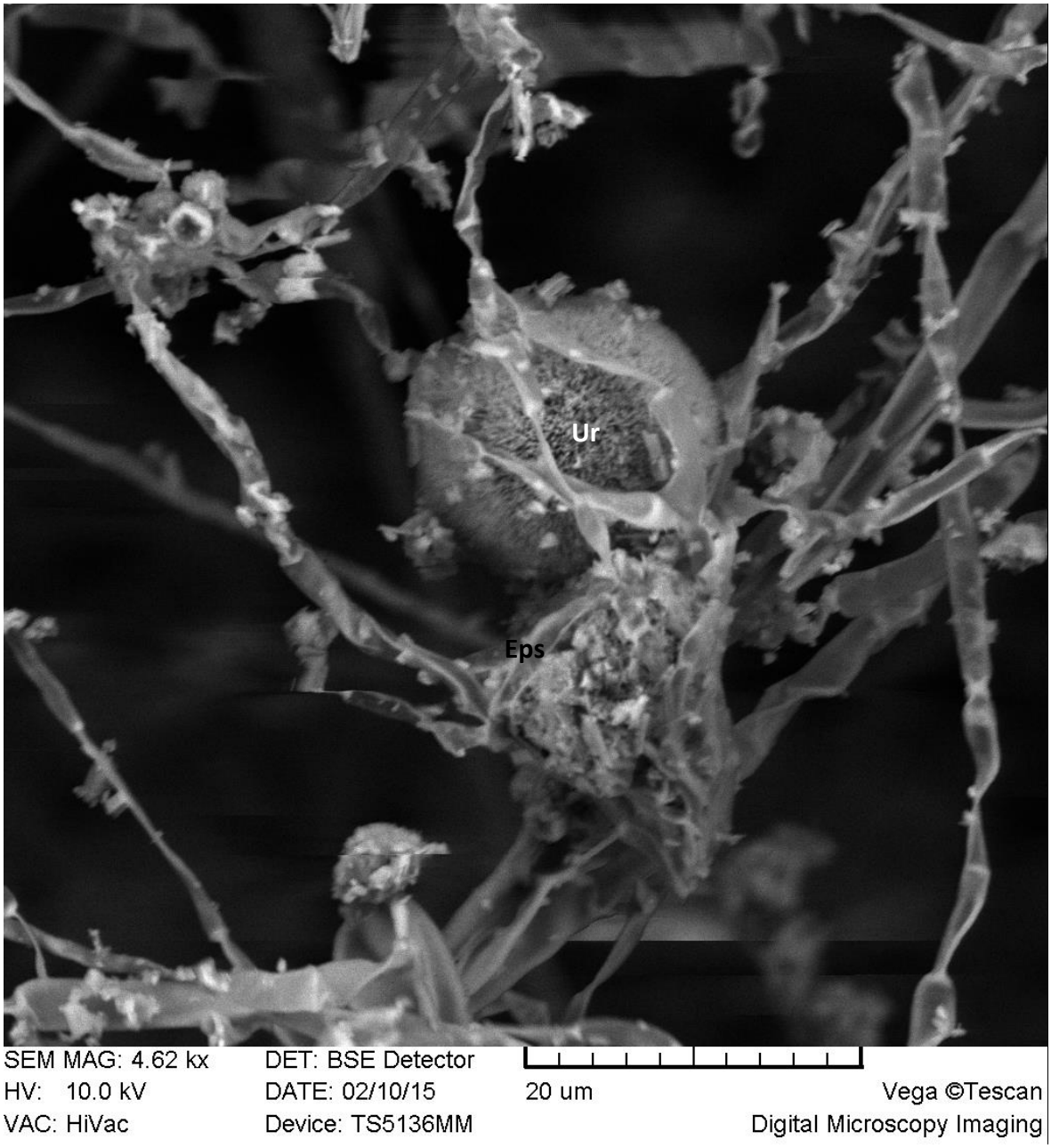
Slika 28. Fragmentirani uzorak Os7, na rubnim dijelovima kamenca vidljiva laminacija što ukazuje da je kamenac nastao taloženjem mikrokristalastog minerala uricita



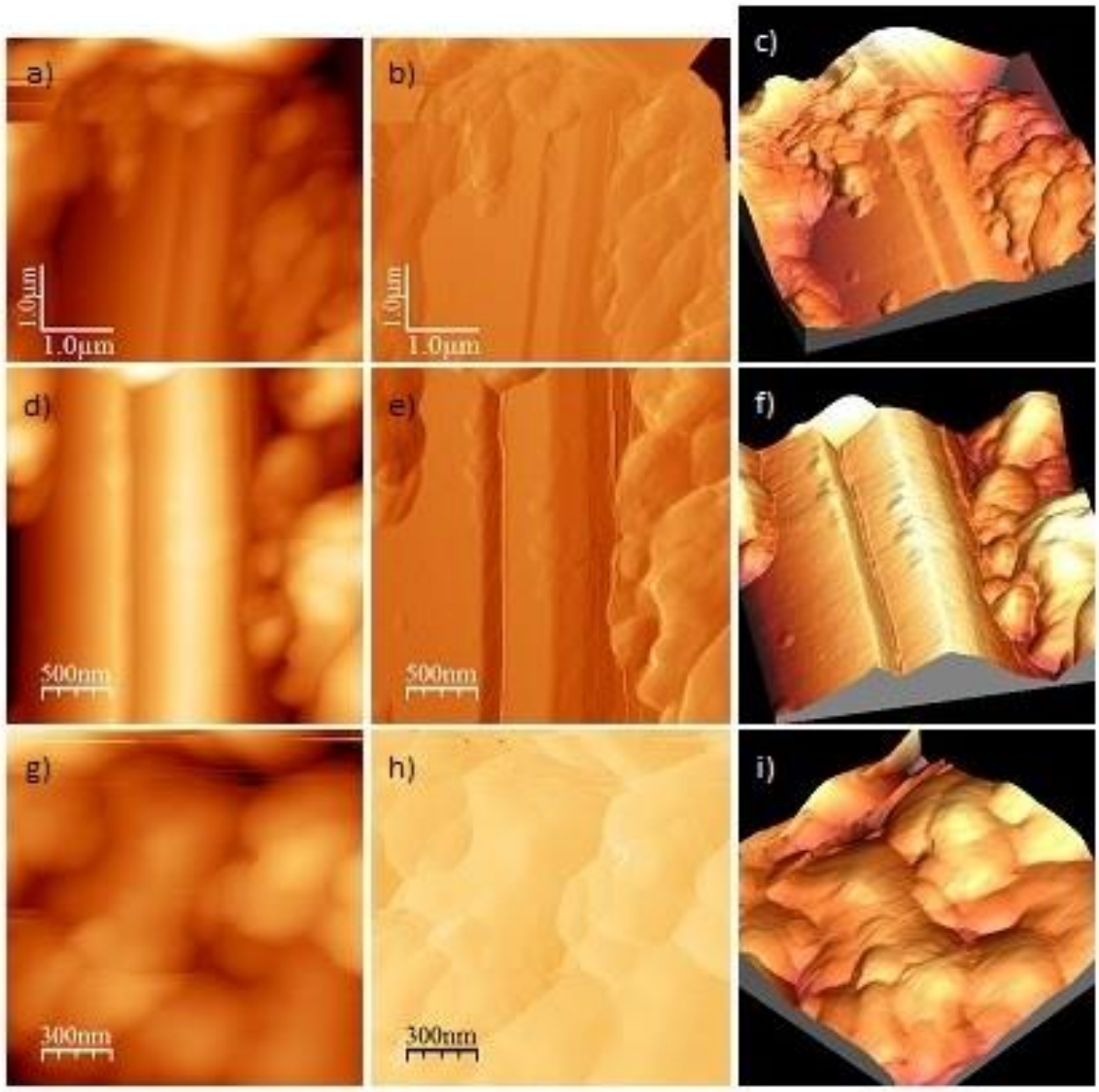
Slika 29. Uvećani prikaz lamina, te prikaz sitnih sferulita na unutrašnjem dijelu kamenca (uricit)



Slika 30. Uzorak Os7 sniman SEM instrumentom; **a)** prikaz sferulita uricita (Ur) različitih dimenzija, variraju od 20-100 µm, okruženi ekstracelularnim polisaharidima (Eps); **b)** uvećani prikaz sferulita i ekstracelularnih polisaharida; **c)** sferuliti uricita veličine od 50-100 µm; **d)** kristali uricita veličine oko 20 mikrona

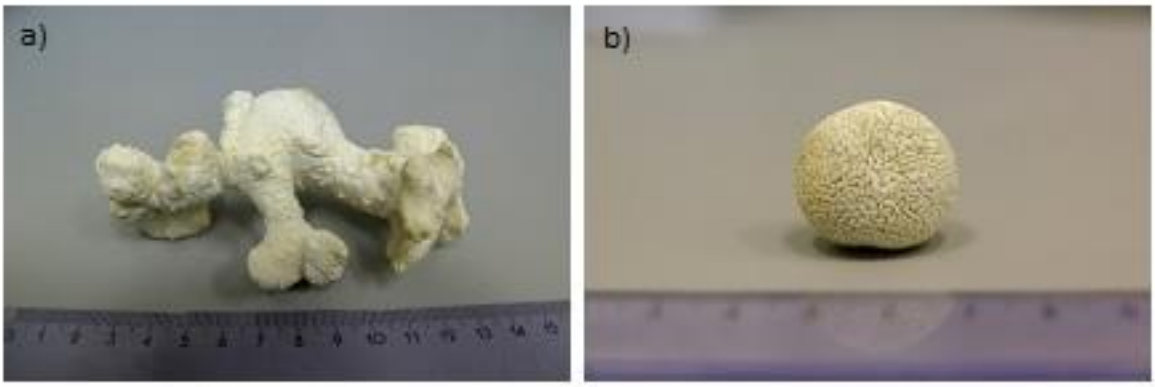


Slika 31. Izdvojeni sferulit uricita (Ur) obavijen ekstracelularnim polisaharidima (Eps)

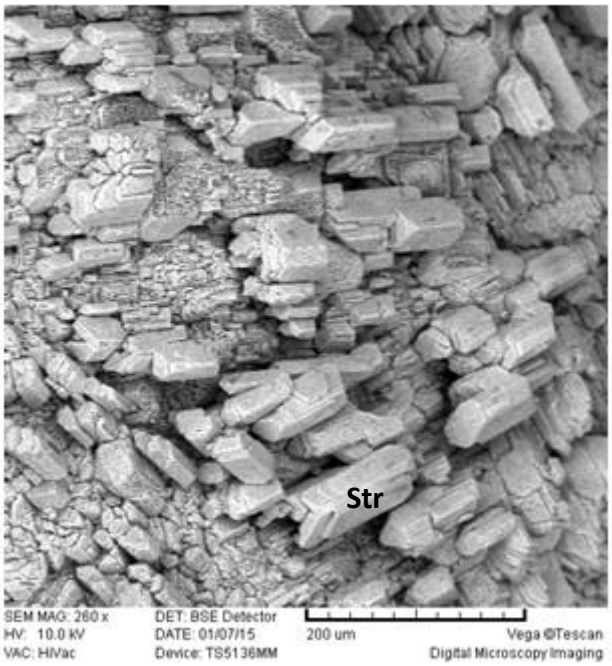


Slika 32. a), **d)** i **g)** prikaz neobrađenih AFM slika; **b)** kristali uricita okruženi sitnozrnatim česticama; **c)** topografija kristala uricita; **e)** uvećanjem se jasno vidi da se radi o dva kristala sraslaca, njihova topografija prikazana je na slici **f)**; **h)** uvećani prikaz površine sitnozrnatih čestica (jezgre kristalizacije), veličine oko 400 nm, njihov topografski prikaz nalazi se na slici **i)**

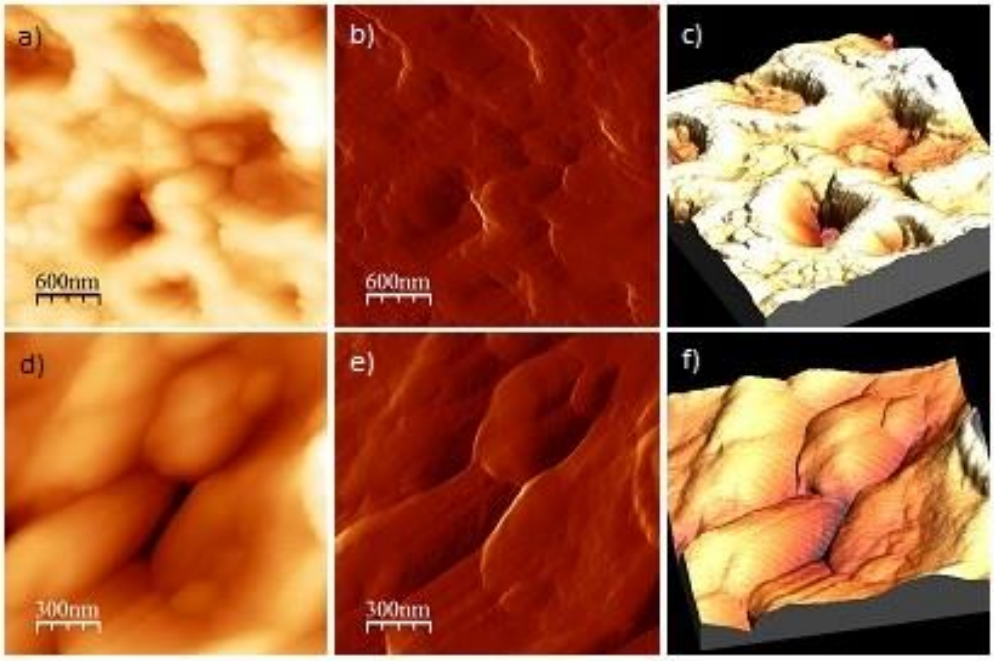
Uzorak Os11 (struvit)



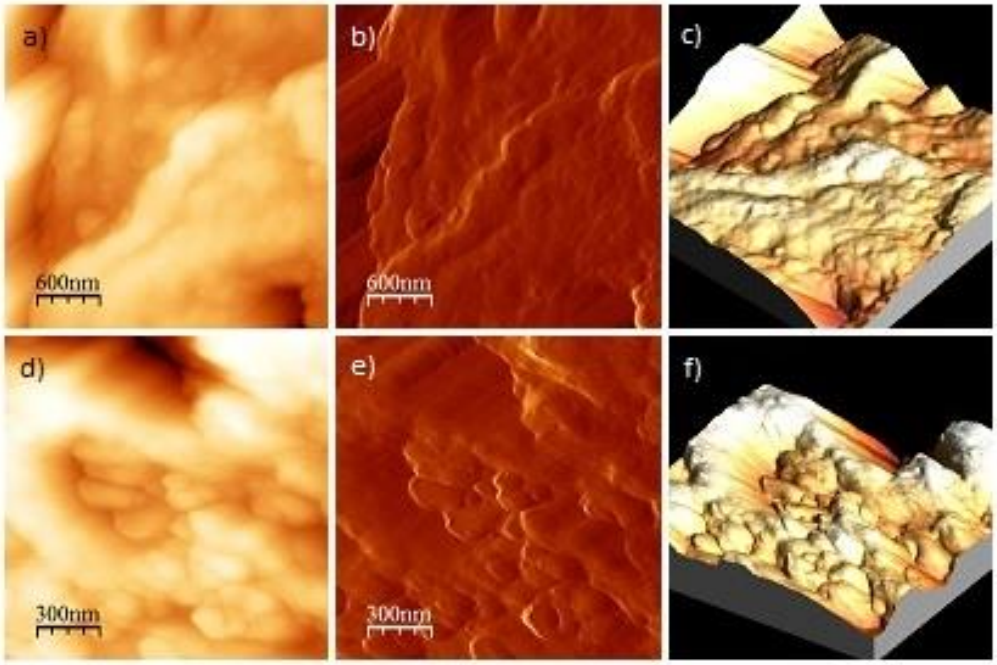
Slika 33. Uzorak Os11, kamenac se sastoji od dva dijela (bez prethodne fragmentacije); **a)** prikaz većeg dijela kamenca veličine oko 10 cm, koji je zapunjavao cijelu bubrežnu čašicu; **b)** slika prikazuje njegov manji dio, sferulit



Slika 34. SEM instrumentom snimljeni kristali minerala struvita (Str), pokazuju određenu orijentaciju i pravilno slaganje, veličina kristala varira od 10 µm do 100 µm



Slika 35. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** nanometarski prikaz površine kristala struvita, vidljive jezgre kristalizacije, njihov topografski prikaz nalazi se na slici **c)**; uvećani prikaz jezgara kristalizacije (**e)**), njihov topografski prikaz nalazi se na slici **f)**



Slika 36. a) i **d)** neobrađene AFM slike; **b)** sitne čestice minerala struvita (jezgre kristalizacije) okružuju veći kristal struvita na kojem su vidljiva prutanja, odnosno tragovi rasta kristala, njihov topografski prikaz nalazi se na slici **c)**; **e)** uvećani prikaz jezgara kristalizacije koje pokazuju određenu orijentaciju, te njihov topografski prikaz (**f)**)

Tablica 9. Popis uzoraka i rezultati XRD analize i mikroskopskih metoda

Uzorci	XRD	SEM	AFM
K5	whewellit	whewellit, hidroksilapatit	jezgre kristalizacije whewellita
K7	weddellit, whewellit	weddellit	tragovi rasta weddellitnih kristala (rupice), jezgre kristalizacije
Os2	whewellit, hidroksilapatit	ekstracelularni polimeri, bakterije, hidroksilapatit, whewellit	prorastanja dvije mineralne faze
Os3	brushit, whewellit, weddellit	brushit, weddellit, whewellit	tragovi rasta kristala (prutanja)
Os5	cistin	cistin	tragovi rasta cistinskog kristala (žljebovi)
Os7	uricit	uricit, ekstracelularni polimeri	sraslaci kristala uricita, jezgre kristalizacije
Os11	struvit	struvit	tragovi rasta kristala (udubljenja i prutanja), jezgre kristalizacije

Tablica 9 prikazuje sumarno rezultate svih analiza (XRD, SEM, AFM) za sve istraživane i analizirane uzorke u ovom radu (K5, K7, Os2, Os3, Os5, Os7 i Os11).

8. Rasprava

Bubrežni kamenci su u pravilu agregati kristala koje na okupu drži organski matriks (Sours & Swift, 2004). Oni se mogu sastojati od jedne mineralne komponente ili mogu sadržavati dvije ili više komponenata unutar jednog kamenca. U komponente koje se često javljaju ubrajamo kalcijske oksalate i fosfate, magnezijske fosfate, te urate i cistin. Ovisno o uvjetima unutar urinarnog trakta može doći do kristalizacije više od jedne komponente sličnog mineralnog sastava (npr. asocijacija oksalatnih minerala), ili može doći do pojave više komponenata različitog sastava unutar jednog kamenca (npr. asocijacija fosfatnih i oksalatnih minerala) (Gibson, 1974, Coe *et al*., 1992, Grases *et al*., 1998).

Prisutnost bakterija u urinarnom traktu će u velikim razmjerima pospješiti kristalizaciju fosfatnih kamenaca. Njihova prisutnost može biti važna i na samom početku stvaranja kamenca, gdje mogu poslužiti kao nukleus na kojem će rasti kamenac nekog drugog spoja i biti podloga za heterogenu nukleaciju (Basavaraj *et al*., 2007).

U ovom radu analizirano je sedam uzoraka bubrežnih kamenaca. Oni se makroskopski razlikuju po veličini, koja varira od nekoliko mm do 10-ak cm, boji, te strukturi i teksturi. Za analizu kemijskog sastava korištena je rentgenska difrakcija na prahu (XRD), a za proučavanje morfologije i topografije korištene su mikroskopske metode pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i mikroskopije atomskih sila (AFM). Rentgenska analiza je dobra metoda za određivanje faznog sastava cjelokupnog uzorka, ali ako postoji komponenta u uzorku koja ne sačinjava više od 5% cjelokupnog sastava rezultati rentgenske analize (difraktogrami) je neće sadržavati. Iz tog razloga se XRD najčešće kombinira s metodama mikroskopije. Mikroskopske analize mogu dati uvid o manje zastupljenim fazama u uzorku, jer će se interpretacija rezultata vršiti na temelju kristalne građe minerala, odnosno morfoloških značajki uzorka.

Prema rezultatima rentgenske analize može se vidjeti da svaki od analiziranih kamenaca pokazuje različiti mineralni sastav. Od sedam uzoraka, četiri su određena kao jednofazni kamenci (K5, Os5, Os7, Os11), dok ostala tri imaju mješovit mineralni sastav (K7, Os2, Os3) (tablica 9, slika 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Promatrajući uzorke pod lupom već je moguće reći da li određeni uzorak sadrži jednu, dvije ili više faza. Razlika u boji, strukturi i teksturi može dati informaciju o različitim komponentama. Uzorak K5 je veličinom najmanji, te makroskopski gledano sadrži dvije faze (slika 10). Smeđa faza predstavlja mineral whewellit, odnosno dominantnu fazu određenu rentgenskom analizom, dok bijela praškasta faza predstavlja manje zastupljenu fazu u uzorku. Whewellit se inače pojavljuje kao tamnije obojan mineral unutar urinarnog trakta zbog raznih organskih uklopaka (Gibson 1974, Coe *et al*., 1992). On inače dolazi u obliku grozdastih, sferičnih i zrakastih agregata, dok su zasebni kristali rijetko prisutni (Gibson, 1974). Na kristaliničnoj masi whewellitnog kamenaca vidljive su monoklinske forme, te je uočeno pravilno slaganje pločastih kristala u određenoj orijentaciji (slika 11a i 11b). Na samoj površini whewellita vidljivi su bijeli kristali manjih dimenzija koji nisu istog sastava kao whewellit (razlika u tonovima sive boje), te je pretpostavka da taj uzorak sadrži čestice teških elemenata. Za točne podatke o njihovom kemijskom sastavu trebala bi biti izvršena EDEX (SEM) analiza. Bijela praškasta faza je pomoću SEM analize određena kao hidroksilapatit, jer on dolazi u obliku šupljikavih sferula veličina manjih od 2 mikrometra (Grases *et al.*, 1998) (slika 12). Na bijeloj fazi se vide pukotine mikrometarske širine koje su mogle nastati naknadno, kada je kamenac izbačen iz tijela (zbog isušivanja).

Ostali uzorci ne pokazuju neke prevelike varijacije u boji, što ne mora značiti da ne sadrže više od jedne komponente. Kod uzorka K7 pod lupom se ističu pravilni kristali weddellita (slika 15). Weddellit se pojavljuje kao mineral koji je uglavnom žute boje, te se u pravilu uvijek javlja u obliku dobro razvijenih, pravilnih dipiramidalnih tetragonskih kristala (Gibson, 1974), što se vidi i na ovom uzorku (slika 15, 16a, 16b). Detaljnija analiza površine uzorka K7, SEM analizom, pokazuje pravilno razvijene kristale weddellita, na kojima su vidljivi sraslaci pod kutom od 90° (slika 16b). Na cjelokupnoj površini dominira mineral weddellit koji je okružen sitnozrnatom komponentom. Matriks se u bubrežnim kamencima sastoji od organskih tvari, odnosno makromolekula (proteina, lipida i sl.) koje se nalaze u urinu (Aggarwal *et al*., 2013). S obzirom da je na difraktogramu otkriven i mineral whewellit, on vjerojatno sačinjava samu jezgru uzorka, odnosno centralni dio. Za proučavanje centralnog djela kamenca, odnosno proučavanje odnosa tih dviju faza, trebalo bi uzorak prepiliti na pola i promatrati ga pod polarizirajućim mikroskopom.

Slična situacija može se vidjeti kod uzorka Os2, gdje su također određene dvije različite kristalne faze. S obzirom da je kamenac fragmentiran ovdje se može promatrati unutrašnji, odnosno centralni dio koji se razlikuje od praškaste vanjske površine. Pločasti kristali u centralnom dijelu predstavljaju dominantnu fazu, odnosno mineral whewellit (Gibson, 1974) (slika 18). Na difraktogramu su otkriveni minerali whewellit i hidroksilapatit, gdje su difrakcijski maksimumi hidroksilapatita manjeg intenziteta, što upućuje na to da on predstavlja manje zastupljenu fazu. SEM analizom vanjske površine tog kamenca mogu se prepoznati bakterijski biofilmovi po cijelom uzorku, što bi značilo da je cijela vanjska površina građena od hidroksilapatita na koji su se nasadile bakterije (bakterije su vezane za fosfatne kamence (Kuzmanić, 1991, Gibson, 1974, Grases *et al*., 1998)) (slika 19b). Na biofilmovima nastalim na površini uzorka uzrokovanim bakterijama vidljivi su ekstracelularni polisaharidi (duga vlakna) i bakterije koje na njima žive i hrane se. S obzirom da kamenci nisu prethodno tretirani s određenim otopinama za očuvanje bakterija, može se pretpostaviti da je riječ o bakterijama koje su otporne na isušivanje (Kramer *et al.*, 2006). Njihov oblik stanice je kuglasti, tako da sa sigurnošću možemo reći da se radi o kokima. Uzorak je SEM analizom proučavan dva puta, gdje je uzorak prije druge analize prethodno presvučen slojem ugljika da bi postao vodljiviji, u svrhu dobivanja slika u boljoj rezoluciji. Druga analiza rađena je otprilike mjesec dana nakon prve SEM analize. Na naknadno snimljenim slikama može se vidjeti da na ekstracelularnim polisaharidima bakterije više nisu toliko prisutne, te je na pojedinim mjestima vidljiva mineralna podloga (slika 20a, 20b, 20c, 20d).

Uzorak Os3 sadrži tri različite komponente, te se prema rezultatima difraktograma sastoji od minerala brushita, weddelita i whewelita. Na njegovoj površini mogu se vidjeti dvije različite faze prilikom analize svijetlosnim mikroskopom (slika 22). Na žućkasto-smeđoj fazi vide se sitni kristali koji kristaliziraju u tetragonskom sustavu (Gibson, 1974), te predstavljaju mineral weddellit, a bijela faza je identificirana SEM analizom, te određena kao mineral brushit. SEM analizom površine kamenca uočena su različita srastanja između određenih kristala, na temelju kojih su određeni. Mineral weddellit ima sraslace pod kutom od 90°, odnosno kristal sraslac je okomit na kristalnu plohu, dok mineral brushit ima sraslace pod kutom različitim od 90° (slika 23a i 23b) (Gibson, 1974).

S obzirom da mineral whewellit nije uočen SEM analizom, vjerojatno sačinjava centralni dio kamenca, što je uobičajeno kod kalcijskih oksalata (Gibson, 1974, Coe *et al*., 1992, Grases *et al*., 1998).

Cistinski kamenci, promatrani golim okom imaju masni sjaj i uglavnom su žućkaste boje, baš kao što izgleda uzorak Os5 (prema Ahmed *et al*., 2006) (slika 25). SEM analizom tog uzorka uočeni su plosnati heksagonski kristali (slika 26), što je karakteristično za mikroskristalasti cistin (Ahmed *et al*., 2006).

Rentgenska analiza uzorka Os7 upućuje na jednolični kamenac uricitnog sastava. S obzirom da je kamenac fragmentiran mogu se vidjeti lamine na njegovim rubnim dijelovima što ukazuje da je taj kamenac nastao taloženjem mikrokristalastog materijala iz otopine (Grases *et al*., 2000) (slika 28). Njegova površina na nekim dijelovima sadrži sferulite koji su također nastali taloženjem mikrokristalastog materijala (Grases *et al*., 1999) (slika 29). SEM analizom su snimljeni sferuliti, te se pri velikom povećanju mogu vidjeti i prisutni ekstracelularni polisaharidi (slika 30a, 30b, 30c, 31), što nije uobičajena pojava, s obzirom da nema podataka o tome da je kristalizacija uricita povezana s bakteriološkom aktivnošću. Na njegovoj površini, pri velikom povećanju, mogu se vidjeti i nasumično orijentirani monoklinski kristali mikrometarskih dimenzija koji predstavljaju mineral uricit (slika 30d).

Uzorak Os11 je došao u dva odvojena djela, te je najveći po veličini od istraživanih uzoraka. Njegov veći dio (slika 33a) predstavlja razgranati struvitni kamenac „staghorn“. „Staghorn“ kamenci su karakteristični po tome da se granaju unutar čašice bubrega, ponekad zapunjavajući i cijelu njezinu unutrašnjost (Preminger *et al*., 2005). Uzorak je XRD i SEM analizom identificiran kao čisti struvitni kamenac. Na slikama SEM analize vidljivi su rompski hemimorfni kristali (Gibson, 1974) koji pokazuju određenu orijentaciju i pravilan redoslijed slaganja (slika 34). Manji dio tog uzorka nije analiziran.

AFM analiza nije često korištena metoda za istraživanje bubrežnih kamenaca. Ona može biti učinkovita samo ako uzorak ne sadrži velike visinske razlike čestica na samoj površini, što će omogućavati pretražnoj probi instrumenta lakši prijelaz preko uzorka. Znanstvenici su radili istraživanja na bubrežnim kamencima iz kojih bi izolirali, ili umjetno napravili određeni kristal, koji se tada promatrao na AFM instrumentu u vodenoj otopini. Takve analize treba podržavati jer ostale tehnike proučavanja morfologije materijala, pod tolikim povećanjem, zahtijevaju da materijal bude stabilan u vakuumu, odnosno ograničavaju analizu materijala koji sadržava velike količine vode. S obzirom da AFM nije uređaj koji koristi vakuum, te nije zatvorenog tipa, uvjeti vodene otopine mogu se mijenjati tijekom eksperimenta. Može se regulirati temperatura otopine, pH, protok, i sl., te se tako omogućava promatranje promjena na kristalima (ili jezgrama kristalizacije), te njihove pseudoforme (odnosno tragovi rasta kristala) (De Yoreo *et al*., 2006).

U ovom radu nije korištena metoda izdvajanja kristala, već se analizirala cjelokupna površina kamenaca, te je analiza napravljena na svih sedam uzoraka. Površina svih uzoraka, kod kojih nisu snimljene plohe kristala, sadrži sitnozrnate čestice na površini (slike 13, 14, 24, 32, 35, 36) koje pokazuju određenu orijentaciju, te se one mogu prepoznati kao jezgre kristalizacije (Carreras, 2009). Na kristalnim jezgrama, isto kao i na kristalnim plohama mogu se uočiti karakteristični tragovi rasta kristala (slike 17, 21, 24, 27, 35, 36). Vidljivi tragovi rasta razlikuju se od rupičastih udubljenja, prutanja po plohama kristala, do udubljenja u obliku žljebova (usmeno priopćenje prof. dr. sc. Bermanca).

Na uzorcima K7 i Os5 snimljene su plohe kristala. Uzorak K7 sadrži weddellit, koji po plohama pokazuje tragove rasta u vidu sitnih rupica (slika 17d-f), dok se na kristalnoj plohi cistina (Os5) vide tragovi u obliku dužih žljebova (slika 27a-f). Uzorak Os3 ima relativno neravnu površinu, pa je AFM instrument imao poteškoća prilikom prelaska pretražne probe po površini, iz kojeg razloga slike nemaju istu vertikalnu i horizontalnu dužinu. Na uzorku Os3 vide se prutanja na kristalima okomita na izduženje kristala (slika 24a-c), dok se kod uzorka Os11, na kristalu koji je okružen jezgrama kristalizacije, vide prutanja paralelna s dužinom kristala (slika 36a-c).

Na uzorku Os2 mogu se razabrati dvije komponente, odnosno prorastanja dviju faza u kamencu (slika 21d-f). Manje zastupljena komponenta, prisutna samo na površini kamenca (hidroksilapatit) javlja se u obliku izduženih ispupčenja na dominantnoj kristalnoj komponenti (whewellit).

S obzirom da niti jedan uzorak nema isti mineralni sastav, rezultati AFM analize pokazuju različite tragove rasta, koji se razlikuju s obzirom na mineralni sastav kamenaca. Jezgre kristalizacije se kod različitih uzoraka ne razlikuju u većoj mjeri, osim što se na površini nekih kamenaca vidi njihova orijentacija i određeno slaganje.

9. Zaključak

Identifikacija bubrežnih kamenaca i razumijevanje njihovog nastanka je vrlo bitan faktor za prevenciju i liječenje nefrolitijaze, jer ako se zna točan sastav bubrežnog kamenca, liječnik može propisati odgovarajuću terapiju i na taj način doprinijeti sprečavanju ponovne pojave, recidiva kamenca, unutar organizma.

Kombinacijom rentgenske analize i mikroskopskih metoda izvršena je identifikacija sedam uzoraka bubrežnih kamenaca prikupljenih od oboljelih ljudi na području Zagreba i Osijeka. Rentgenska analiza dala je podatke o faznom sastavu kamenca, a mikroskopske metode su omogućile detaljnu analizu površine kamenaca. SEM metodom dobivene su slike u mikrometarskom mjerilu na kojima se jasno vidi razlika u komponentama određenog kamenca, struktura i tekstura kamenca, te habitus kristalnih faza, što je olakšalo determinaciju određenih komponenata. Rezultati mikroskopskih analiza, osim što su potvrdili rezultate rentgenske analize, otkrili su i neke druge komponente u uzorku, odnosno manje zastupljene faze unutar kamenca. Ako komponenta u uzorku ne sačinjava više od 5% cjelokupnog sastava, rezultati rentgenske analize (difraktogrami) je neće sadržavati. Prema tome se sa sigurnošću može reći da se uz metodu rentgenske difrakcije na prahu treba kombinirati još barem jedna pouzdana metoda identifikacije.

AFM metoda poslužila je za analiziranje površine kamenaca do nanometarskih veličina. Na slikama dobivenim AFM instrumentom mogu se promatrati površinske jezgre kristalizacije, njihovo slaganje, te tragovi rasta kristala, što može pomoći u identifikaciji određene komponente u uzorku. Metoda kojom su analizirani uzorci u ovom radu nije često korištena za analizu bubrežnih kamenaca zbog njihove neravne površine koja otežava prelazak pretražne probe instrumenta preko uzorka, već su rađena istraživanja u kojima se analiziraju samo pojedinačni kristali u vodenim otopinama. Takav način istraživanja daje puno bolje rezultate jer se tijekom takvog eksperimenta mogu mijenjati uvjeti vodene otopine u kojoj se kristali nalaze (npr. temperatura, pH i sl.), te se kristali tada mogu promatrati u kontroliranom okruženju.

10. Literatura

Aggarwal, K. P., Narula, S., Kakkar, M. & Tandon, C. (2013): Nephrolithiasis: Molecular Mechanism of Renal Stone Formation and the Critical Role Played by Modulator. BioMed Research International, 1-21.

Ahmed, K., Dasgupta, P. & Khan, M. S. (2006): Cystine calculi: challenging group of stones. Postgraduate Medical Journal, 82, 799-801.

Back, M. E. & Mandarino, J. A. (2008): Fleischer's Glossary of Mineral Species 2008. The Mineralogical Record Inc., XIV + 345, Tucson.

Basavaraj, D. R., Biyani, C. S., Browning A. J. & Cartledge J. J. (2007): The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones. European Association of Urology, 126-136.

Basiri, A., Taheri, M. & Taheri, F. (2012): Review, What is the State of the Stone Analysis Techniques in Urolithiasis. Urology Journal, 9,2, 445-454.

Carreras, E. B. (2009): Atomic force microscopy study of urolithiassis evolution in space crews during long-term missions. Master Thesis, Univerzitat politecnica de Catalunya, 1-49.

Christmas K. G., Gower, L. B., Khan, S. R. & El-Shall, H. (2002): Agregation and Dispersion Characteristics of Calcium Oxalate Monohydrate: Effects on Urinary Species. Journal of Colloid and Interface Science, 256, 168-174.

Coe, F. L. & Favus, M. J. (1991): Nephrolitiasis. In: Harrison's principles of internal medicine, Twelft edition (eds.: Wilson, J. D., Braunwald, E. Isselbacher, K. J., Petersdorf, R. G., Martin, J. B., Fauci, A. S. & Root, R. K.). 1202-1206.

Coe, F. L., Parks, J. H. & Asplin, J. R. (1992): Medical progress, The pathogenesis and treatment of kidney stones. The New England Journal of Medicine, 327, 16, 1141-1152.

Coe, F. L., Evan, A. & Worcester, E. (2005): Kidney stone disease. The Journal of Clinical Investigation, 115, 10, 2598-2608.

De Yoreo, J. J., Qiu, S. R. & Hoyer H. J. (2006): Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. American Journal of Physiology – Renal physiology, 291, 6, 1123-1132.

Eaton, P. & West, P. (2010): Atomic Force Microscopy. Oxford University Press Inc., New York, VIII + 247.

Echigo, T., Kimata, M., Kyono, A., Shimizu, M. & Hatta, T. (2005): Re-investigation of the crystal structure of whewellite [$Ca(C_2O_4)\cdot H_2O$] and the dehydration mechanism of caoxite [$Ca(C_2O_4)\cdot 3H_2O$]. Mineralogical Magazine, 69, 77-88.

Frost, R.L. (2004): Raman spectroscopy of natural oxalates. Analytica Chimica Acta, 517, 1-2, 207-214.

Giannossi, M. L. & Summa, V. (2012): A Review of Pathological Biomineral Analysis Techniques and Classification Schemes. In: An Introduction to the Study of Mineralogy (ed.: Aydinalp, C.). InTech, 123-146.

Gibson, R. I. (1974): Descriptive Human Pathological Mineralogy. American Mineralogist, 59, 1177-1182.

Grases, F., Millan, A. & Conte, A. (1990): Production of calcium oxalate monohydrate, dihydrate or trihydrate, A comparative study. Urological Resarch, 18, 17-20.

Grases, F., Costa – Bauzá, A. & García – Ferragut, L. (1998): Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. Advances of Colloid and Interface Science, 74, 169-194.

Grases, F., Villacampa, A. I., Costa – Bauza, A. & Sohnel, O. (1999): Uric acid calculi. Scanning Microscopy, 13, 2-3, 223-234, Chicago.

Grases, F., Villacampa, A. I., Costa – Bauza, A. & Sohnel, O. (2000): Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. Clinica Chimica Acta, 302, 89-104.

Katkova, V. I., Rakin, V. I. & Makeev, B. A. (2007): Pseudomorphism of Weddellite in Uroliths. Doklady Earth Sciences, 413A, 3, 339-342.

Kramer, A., Schwebke, I. & Kampf, G. (2006): How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases, BioMed Central, 1-8.

Kuzmanić, D. (1991): Nefrolitijaza. U: Interna medicina, 2. knjiga (eds.: Vrhovac, B., Bakran, I., Granić, M., Jakšić, B., Labar, B. & Vucelić, B.). 1229-1233, Izdavačka kuća „Naprijed“, Zagreb.

Mukhopadhyay, S. M. (2003): Sample preparation for microscopic and stereoscopic characterization of solid surfaces and films. In: Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry (ed.: Mitra, S.). Chapter 9, 377-411, John Wiley & Sons Inc.

Pletikapić, G. (2013): Nanomehanička svojstva površina stanica dijatomeja i izvanstaničnih polimera. Doktorski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, IX + 38.

Plodinec, M. (2014): Fizikalna i kemijska svojstva funkcionaliziranih titanatnih nanostruktura. Doktorski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, X + 178.

Preminger, G. M., Assimos, D. G., Lingeman, J. E., Nakada, S. Y., Pearle, M. S., Wolf, J. S. Jr. (2005): Guideline on the Management of Staghorn Calculi: Diagnosis and Treatment Recommendations. In: Report on the Management of Staghorn Calculi, 7-8.

Sikirić, M. (1998): Taloženje mineralnih soli mokraćnih kamenaca. Magistarski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, VII + 109.

Sours, R. E. & Swift, J. A. (2004): The relationship between uric acid crystals and kidney stone disease. American Crystallographic Association Transactions, 39, 83-89.

Tazzoli, V. & Domeneghetti C. (1980): The crystal structures of whewellite and weddellite: re-examination and comparison. American Mineralogist, 65, 327-334.

Internet izvori:

MyScope - ammrf (Australian Microscopy an Microanalysis Research Facility): http://www.ammrf.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php

Dutrow, B. L. & Clark, C. M.: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html

Horracas I., Fernandez, R., Gomez-Rodriguez, J.M., Colchero, J., Gomez-Herrero J. & Baro, A. M. (2007): Rev. Sci. Instrum. 78, 013705: www.wsxmsolutions.com

Prilog I.

Tablica I. Difrakcijski maksimumi uzoraka K5

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
14.9961	5.90792	100.00
15.3543	5.77087	14.71
19.6299	4.52252	3.24
23.5481	3.77812	5.47
24.4416	3.64199	47.85
28.7811	3.10198	2.20
29.7277	3.00534	6.99
30.1832	2.96101	56.19
30.7672	2.90613	7.53
31.5044	2.83978	6.95
36.0932	2.48857	13.99
36.7384	2.44634	2.47
37.2284	2.41526	3.04
38.2469	2.35325	23.14
39.8893	2.26007	8.78
40.8613	2.20852	5.16
42.4274	2.13056	2.20
43.6733	2.07262	7.77
45.9126	1.97662	11.52
46.6432	1.94734	5.86
47.0249	1.93242	7.34
48.1028	1.89161	4.29
49.4444	1.84338	3.28
50.3600	1.81200	4.19
50.9517	1.79233	4.11
52.7553	1.73523	4.87
54.2181	1.69182	0.88
56.1937	1.63694	0.97
58.0970	1.58776	1.46
59.7816	1.54698	1.53
60.6948	1.52588	1.25
62.5842	1.48428	1.68
63.8595	1.45648	0.88

Tablica II. Difrakcijski maksimumi uzoraka K7

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
10.1854	8.68492	7.42
14.3851	6.15744	100.00
15.0009	5.90604	84.00
20.1156	4.41440	41.29
22.7947	3.90126	10.19
23.5258	3.78166	2.61
24.4530	3.64032	37.47
25.9613	3.43215	4.31
26.3700	3.37987	3.56
28.2729	3.15657	6.92
28.9281	3.08656	14.51
30.1314	2.96352	50.98
30.2576	2.95879	37.32
30.8228	2.89860	5.02
31.7754	2.81385	26.38
32.2871	2.77042	92.00
36.0779	2.48754	7.23
37.0897	2.42197	11.89
37.4112	2.40189	20.83
37.5064	2.39601	17.00
38.2027	2.35392	13.91
38.4757	2.33785	12.20
40.2356	2.23956	43.30
40.3452	2.23928	40.05
40.9019	2.20460	10.59
42.6819	2.11669	11.47
43.6188	2.07337	3.22
44.8700	2.01842	9.02
45.5008	1.99189	4.89
45.9265	1.97441	11.68
46.4060	1.95512	18.56
47.0763	1.92884	4.62
47.9477	1.89580	25.87
49.6564	1.83449	19.23
51.0022	1.78920	3.90
51.9518	1.75870	1.77
52.6179	1.73800	8.76
54.1445	1.69254	5.75
56.7908	1.61979	1.76
58.4568	1.57754	2.84
59.0181	1.56386	2.28
61.8628	1.49860	3.51
62.5698	1.48336	3.24

Tablica III. Difrakcijski maksimumi uzoraka Os2

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
14.9266	5.93525	100.00
15.3903	5.75744	5.70
19.6350	4.52135	1.32
23.5712	3.77448	2.64
24.4264	3.64423	22.58
25.9434	3.43448	1.53
28.7712	3.10303	0.94
30.1770	2.96161	49.18
30.8175	2.90150	3.44
31.5372	2.83691	4.19
32.3005	2.77159	1.83
34.1632	2.62461	0.38
36.0401	2.49212	6.98
36.7272	2.44706	0.76
37.2186	2.41587	1.11
38.2174	2.35500	10.06
39.1972	2.29836	0.45
39.9568	2.25640	4.18
40.8677	2.20819	2.34
42.5151	2.12637	0.79
43.2840	2.09036	1.58
43.7051	2.07119	3.35
45.9456	1.97527	9.75
46.5627	1.95052	2.87
47.0228	1.93251	3.56
48.1930	1.88828	2.18
49.4237	1.84411	2.07
50.2515	1.81565	1.86
50.9285	1.79309	2.03
52.6956	1.73705	1.71
53.4700	1.71371	0.03
54.3028	1.68938	0.29
56.1791	1.63733	0.47
58.0892	1.58796	0.70
59.8024	1.54649	0.76
60.6452	1.52701	0.68
61.7341	1.50266	0.50
62.6089	1.48375	1.51
63.8382	1.45691	0.49

Tablica IV. Difrakcijski maksimumi uzoraka Os3

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
11.6778	7.57814	100.00
11.7939	7.50380	65.02
14.3739	6.16223	7.10
14.9670	5.91934	20.38
15.3564	5.77009	3.68
20.1592	4.40494	2.61
21.0281	4.22485	19.40
22.7488	3.90903	0.60
23.4522	3.79337	7.27
24.4803	3.63634	15.48
25.9253	3.43683	0.83
29.3691	3.04120	20.64
30.1084	2.96820	11.55
30.6537	2.91662	8.95
31.5688	2.83414	3.27
32.3139	2.77047	7.57
34.1919	2.62248	9.21
34.5238	2.59802	5.77
35.5806	2.52324	1.43
36.0200	2.49346	3.83
37.1667	2.41913	4.21
38.3722	2.34586	6.15
39.8168	2.26402	2.99
40.2951	2.23824	2.30
40.8558	2.20881	1.50
41.6899	2.16653	4.08
42.1271	2.14505	3.42
43.6986	2.07148	2.46
44.8184	2.02230	1.38
45.3396	2.00025	2.84
45.9014	1.97707	2.92
46.4496	1.95501	2.39
47.0064	1.93314	1.78
47.9385	1.89771	3.92
48.5352	1.87576	2.74
49.0233	1.85823	1.69
50.2861	1.81448	6.05
50.9289	1.79308	2.65
52.7887	1.73421	1.52
53.5511	1.71130	1.43
59.6101	1.55102	1.18
60.8258	1.52291	1.05
63.9999	1.45362	1.12

Tablica V. Difrakcijski maksimumi uzoraka Os5

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
9.5261	9.28450	1.59
18.9867	4.67425	18.03
19.9758	4.44496	1.20
20.5122	4.32994	0.36
21.1887	4.19320	1.50
21.9928	4.04166	2.14
26.9089	3.31340	2.84
28.0534	3.18077	8.46
28.5767	3.12371	100.00
29.2900	3.04924	6.92
30.5572	2.92562	0.29
33.1769	2.70035	4.69
34.5310	2.59750	9.05
38.4209	2.34300	1.96
39.2478	2.29552	0.65
40.1274	2.24721	0.31
41.0893	2.19680	0.20
41.6900	2.16652	0.62
42.1070	2.14603	1.14
43.1553	2.09630	0.25
43.9322	2.06101	0.28
44.7162	2.02668	1.29
45.6852	1.98592	0.29
46.5281	1.95189	1.32
47.8313	1.90171	0.27
49.3745	1.84583	0.65
51.6491	1.76976	0.70
52.4928	1.74328	0.55
54.1367	1.69417	1.39
55.8285	1.64677	0.33
57.4929	1.60300	0.09
59.0558	1.56425	2.60
59.9726	1.54251	0.27
60.7923	1.52366	0.20
61.4875	1.50809	0.32
62.0900	1.49490	0.22
62.6719	1.48119	0.66

Tablica VI. Difrakcijski maksimumi uzoraka Os7

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
13.5216	6.54863	48.90
15.8120	5.60485	19.79
18.0541	4.91353	51.94
18.1609	4.88487	35.20
18.6240	4.76444	6.49
19.8405	4.47498	0.68
23.0676	3.85572	49.65
23.9734	3.71206	4.94
24.8267	3.58638	2.19
27.2139	3.27696	17.91
27.9550	3.19174	49.53
28.8115	3.09878	100.00
29.8080	2.99742	3.13
31.1899	2.86770	24.77
32.0170	2.79316	8.31
32.1255	2.78629	7.93
34.1707	2.62406	1.87
34.9653	2.56622	12.34
36.5734	2.45700	2.33
37.1387	2.42089	2.80
38.8782	2.31648	2.69
39.5154	2.28059	2.78
40.2750	2.23931	8.11
41.3496	2.18357	5.82
43.2320	2.09275	1.17
44.5841	2.03238	1.65
47.3224	1.92097	0.53
48.6062	1.87319	1.09
50.5494	1.80565	2.52
51.7201	1.76750	1.06
52.4703	1.74398	0.97
55.0975	1.66688	1.23
56.1003	1.63944	0.85
56.9147	1.61790	1.67
57.8863	1.59304	1.14
59.5383	1.55272	2.04
61.3599	1.50967	0.46

Tablica VII. Difrakcijski maksimumi uzoraka Os11

Pozicija [°2θ]	Međumrežni razmak [d]	Relativni intenzitet
15.0292	5.89498	29.05
15.8083	5.60616	61.18
16.4984	5.37319	26.51
19.3263	4.59285	3.56
20.9073	4.24900	82.48
21.5073	4.13180	44.06
25.7400	3.46115	26.98
27.1248	3.28752	26.34
29.6075	3.01726	13.54
30.2514	2.95449	21.75
30.6934	2.91294	52.19
31.9685	2.79961	100.00
33.3460	2.68704	77.74
33.7052	2.65922	48.99
35.8423	2.50542	8.39
37.6468	2.38937	3.36
38.3303	2.34833	8.85
39.9096	2.25897	8.54
42.5664	2.12392	6.66
44.1458	2.05153	10.20
45.0378	2.01295	8.88
46.3085	1.96064	15.47
49.5069	1.84120	13.38
50.8771	1.79479	16.54
51.9478	1.76028	15.64
52.7490	1.73542	15.13
54.6751	1.67875	2.71
55.6577	1.65142	1.99
58.1571	1.58495	4.09