Fosfatni minerali u urinarnom traktu ljudskog tijela

Zimprich, Emma

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:217:536095

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

FOSFATNI MINERALI U URINARNOM TRAKTU LJUDSKOG TIJELA

DIPLOMSKI RAD

Emma Zimprich

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

GEOLOŠKI ODSJEK

EMMA ZIMPRICH

FOSFATNI MINERALI U URINARNOM TRAKTU LJUDSKOG TIJELA

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 bih htjela zahvaliti svom mentoru prof.dr.sc. Vladimiru Bermancu na strpljenju, pomoći, vodstvu i suradnji tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i dr.sc. Vesni Babić-Ivančić sa instituta Ruđer Bošković na bezrezervnoj pomoći i pruženom znanju i stručnim savjetima koji su mi uvelike olakšali pisanje ovog rada, gospodinu Marinu na strpljenju i pomoći sa snimanjem slika na elektronskom mikroskopu i asistentici Andrei Čobić na pruženoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog djela rada.

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji, sestrama, a posebno roditeljima koji su mi omogućili život i studiranje u drugom gradu i što su tijekom čitavog mog školovanja bili uz mene, pružajući mi bezuvjetnu podršku u svemu. Hvala Krešo što si bio uz mene.

Ovim putem želim također zahvaliti i svim svojim kolegama i prijateljima, što su svojim prisustvom uvelike uljepšali moje studentsko razdoblje provedeno na fakultetu.

Najviše od svega, hvala mojim curama Sandi i Sanji. Bez vas studiranje na ovom fakultetu ne bi bilo isto.

Emma

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA I LITERATURE 2

3. MEHANIZMI FORMIRANJA BUBREŽNIH KAMENACA 5

3.1. Nukleacija 5

3.2. Kristalizacija 6

3.3. Rast kristala 7

3.4. Agregacija kristala 8

4. INHIBITORI I PROMOTORI 9

5. EPIDEMIOLOŠKI FAKTORI RIZIKA 11

6. TIPOVI BUBREŽNIH KAMENACA 13

7. KALCIJSKI KAMENCI 14

7.1. Minerali grupe apatita 15

7.2. Brushit 15

7.3. Monetit 16

7.4. Whitlockit 16

8. MAGNEZIJSKI FOSFATI 18

8.1. Struvit 18

8.2. Newberyit 20

8.3. Hannayit 20

9. METODE ISTRAŽIVANJA 21

9.1. Promatranje kamenaca pod lupom 22

9.2. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) 23

9.3. Rentgenska difrakcija na prahu (XRD) 24

9.4. IR spektroskopija 25

10. REZULTATI 28

10. 1. Promatranje morfologije kamenaca pod lupom 28

10. 2. Rezultati pretražne elektronske mikroskopije 32
10. 3. Rezultati XRD analize 40
10. 4. Rezultati analize IR spektroskopijom 47
11. RASPRAVA 59
12. ZAKLJUČAK 65
13. POPIS LITERATURE 67
PRILOZI

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Diplomski rad

FOSFATNI MINERALI U URINARNOM TRAKTU LJUDSKOG TIJELA

EMMA ZIMPRICH

Rad je izrađen: Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

Sažetak: Bubrežni kamenci gotovo su najčešći uzrok oboljenju mokraćnog sustava. Većina kamenaca sastoji se od više kristalnih komponenti i više faza, što upućuje na različite fiziološke uvjete koje nastojimo što bolje objasniti kako bi mogli uspješnije odrediti medicinsko liječenje i izbjeći ponovo stvaranje kamenaca. Za analizu sastava i strukture bubrežnih kamenaca u ovom radu korištena je pretražna elektronska mikroskopija (SEM), rentgenska difrakcija na prahu (XRD) i infracrvena spektroskopija (FTIR). Analizirani su fosfatni minerali urinarnog trakta, od kojih su najčešći struvit, apatit (karbonatni apatit ili hidroksilapatit) i brushit. U većini uzoraka pomoću FTIR spektroskopije otkrivena je i mala količina kalcijevog oksalata. Znanje o bubrežnim kamencima važno je za razumijevanje patofiziologije, načina liječenja i prevencije ponovne pojave nefrolitijaze.

Ključne riječi: apatit, bubrežni kamenci, fosfati, IR, SEM, struvit, XRD

Rad sadrži: 70 stranica, 32 slike, 17 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u: Prirodoslovno-matematički fakultet, Središnja geološka knjižnica,

Horvatovac 102 a, 10 000 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

PHOSPHATE MINERALS IN HUMAN URINARY TRACT

EMMA ZIMPRICH

Thesis completed in: Faculty of Science, Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

Abstract: Kidney stones are most common cause of urinary system disorders. Most kidney stones are composed of several crystal components and phases, which leads to various physiological conditions during their formation. These conditions are being clarified in order to succesfully determine medical treatment and prevent kidney stone recurrance. Several methods were used in order to identify the composition and structure of kidney stones including scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (FTIR). Phosphate minerals in urinary tract were analyzed, of which the most common are: struvite, apatite (carbonate apatite or hydroxylapatite) and brushite. In most samples using FTIR spectroscopy small amount of calcium oxalate was found. Analysed data are very helpful for understanding the mechanisms of stone formation, medical treatment and frequent recurrence of kidney stones.

Keywords: apatite, IR, kidney stones, phosphates, SEM, struvite, XRD

Thesis contains: 70 pages, 32 figures, 17 tables, 38 references

Original in: croatian

Thesis deposited in: Faculty of Science, Central geological library, Horvatovac 102 a, 10 000 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.

1. UVOD

Bubrežni kamenci su gotovo najčešće oboljenje mokraćnog sustava koje većinom zahvaća dobnu skupinu od 20 do 40 godina u kojoj muškarci prednjače s četiri puta većom učestalošću. Uzroci stvaranja bubrežnih kamenaca višestruki su i do danas nisu sasvim ispitani i definirani, a ovise o različitim fizikalno-kemijskim i patofiziološkim procesima u organizmu. Najčešći tip bubrežnih kamenaca na koje otpada 80 do 90% su kalcijevi kamenci koji uglavnom čine mješavinu kamenaca od kalcijevih fosfata i oksalata.

Većina kamenaca sastoji se od više kristalnih komponenti, odnosno više faza. Prisutnost više faza upućuje na različite fiziološke uvjete koje nastojimo što bolje objasniti kako bi uspješnije odredili medicinsku terapiju i izbjegli ponovno stvaranje kamenaca.

Analizirano je sedam bubrežnih kamenaca bolesnika s područja sjeverozapadne Hrvatske (uzorci označeni slovom K) i Osijeka (uzorci označeni slovima OS), a za analizu njihovog sastava i određivanja strukture korištene su sljedeće metode: infracrvena spektroskopija (eng. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*-FTIR), rentgenska difrakcija na prahu (eng. *X-ray Diffraction*-XRD) i pretražni elektronski mikroskop (eng. *Scanning Electron Microscope*-SEM).

Cilj ovog rada je analiza sastava i određivanje strukture bubrežnih kamenaca s definiranjem kristalnih komponenti koje se nalaze u njihovom sastavu kako bismo što bolje shvatili mehanizme njihovog formiranja te na taj način dobili odgovor kako djelotvorno pratiti osobe koji obolijevaju od bubrežnih kamenaca, i značajno olakšali procjenu i tretman u takvim slučajevima. Pacijentima se na temelju analize pripisuju određeni lijekovi koji kontroliraju količinu kiseline ili lužine u mokraći, što je ključni litogeni faktor, dok se u slučajevima infektivnih kamenaca, liječenje odvija antibioticima.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA I LITERATURE

Znanje o bubrežnim kamencima važno je za razumijevanje patofiziologije, načina liječenja i prevencije ponovne pojave nefrolitijaze. Dostupne su mnoge analitičke tehnike za analizu sastava i određivanje strukture bubrežnih kamenaca, ali ni jedna od njih ne daje sve potrebne informacije. Trebalo bi koristiti više vrsta analiza rutinski, kako bi se što bolje shvatili mehanizmi uključeni u litogenezu bubrežnih kamenaca.

Prien i Frondel 1947. godine uveli su polarizacijsku mikroskopiju kao analitičku metodu za identifikaciju kristalnih komponenti bubrežnih kamenaca, mjerenjem indeksa refrakcije. Fazil Marickar i suradnici govore u prilog kombiniranom korištenju optičke mikroskopije i IR spektroskopije za analizu jezgre, poprečnog presjeka i površine bubrežnih kamenaca. Te dvije metode su pouzdane i točne za određivanje količine pojedinih komponenata u kamencima, identifikaciju strukture i analizu kristalnog sastava kamenca, a u usporedbi s drugim metodama dosta su ekonomične (Basiri *et al*., 2012).

Sposobnost identifikacije specifičnih minerala, sposobnost analize malih količina kamenaca, i brzina polarizacijske mikroskopije prednost su kombiniranog korištenja optičke mikroskopije i IR-a. Jhaumeer-Laullo i Subratty, koristili su mokre kemijske analize (eng. *wet chemistry*) i metode IR spektroskopije za analizu bubrežnih kamenaca. Njihovi rezultati pokazali su da te metode nisu precizne i mogu rezultirati značajnim pogreškama u dijagnozi i liječenju. Također se pokazalo da su spektroskopske metode primjenjive za manje količine uzorka i pomoću njih možemo odrediti različite sastojke bubrežnih kamenaca te u kombinaciji s metodom rentgenske difrakcija na prahu daju točne podatke o njihovu sastavu (Basiri *et al*., 2012).

Iako mokre kemijske analize imaju najširu upotrebu u rutinskoj analizi bubrežnih kamenaca u laboratorijima, pomoću njih se može utvrditi samo prisutnost pojedinih iona i radikala bez razlikovanja specifičnih spojeva u mnogim tipovima bubrežnih kamenaca i njihovim mješavinama (Basiri *et al*., 2012).

Još od 1970-tih, termogravimetrijska analiza često se koristi za analizu bubrežnih kamenaca. Termogravimetrija je brza i jednostavna analitička tehnika koja se temelji na

kontinuiranom snimanju temperature i gubitka težine uzorka tijekom progresivnog povećavanja temperature sve do 1000 ºC. Kako svaka supstanca ima specifični tip transformacije, početnu i završnu temperaturu transformacije, iznos izgubljene težine i entalpiju te se tako pomoću promjene težine dobivaju podaci o kakvim supstancama se radi. Nedostaci ove metode su sličnosti u početnim temperaturnim transformacijama i stupnju dezintegracije nekih sličnih spojeva što uvelike otežava njihovu identifikaciju. Primjerice, kalcijev fosfat i kalcijev pirofosfat pokazuju vrlo malu promjenu težine prilikom zagrijavanja, te se ovom metodom oni ne mogu međusobno razlikovati (Basiri *et al*., 2012).

Singh je radio analize bubrežnih kamenaca pomoću FTIR metode koja je učinkovita i precizna za analizu i određivanje sastava bubrežnih kamenaca. While Estepa i suradnici ukazuju na mogućnost krive identifikacije kod korištenja IR spektroskopije zbog nepotpunih referentnih podataka i znatne razlike između spektara prirodnih i sintetskih spojeva. Od 1970. godine fizikalno-kemijske metode imaju sve veće značenje i upotrebu u analizi bubrežnih kamenaca (Basiri *et al*., 2012).

Mnogi laboratoriji koriste rentgensku difrakciju na prahu i IR spektroskopiju kao glavne metode za analizu bubrežnih kamenaca. Napravljene su mnoge studije koje uspoređuju kvalitetu te dvije metode. Rebentisch je predstavio rezultate vanjske procjene 40 laboratorija iz 23 zemlje koji su koristili šest različitih kvantitativnih i kvalitativnih analitičkih tehnika u razdoblju od 1983. do 1988. godine. Najboljim metodama pokazale su se redom: XRD metoda, IR spektroskopija i polarizacijski mikroskop. Prema rezultatima, XRD difrakcija i IR spektroskopija daju usporedive i vrlo prihvatljive analitičke rezultate i mogu se klasificirati kao referentne metode za analizu bubrežnih kamenaca. Internacionalni testovi koji pokazuju kvalitetu metoda za analizu bubrežnih kamenaca pokazuju da je rentgenska difrakcija na prahu preciznija od IR spektroskopije. U vanjskoj procjeni kvalitete analize bubrežnih kamenaca, koja je započela 1991., predloženo je da korištenje kemijskih metoda treba prekinuti, jer su neprihvatljive kvalitete u otprilike 40% laboratorija (Basiri *et al.*, 2012).

Smith i suradnici (Basiri *et al*., 2012) 1995. godine prvi puta spominju korištenje kompjuterizirane tomografije ili CT-a za identifikaciju nefrolitijaze, a danas je ta metoda

postala standardni dijagnostički alat. Studije koje uključuju korištenje CT tehnologije pokazale su da se mogu prikupiti određene informacije o sastavu kamenaca, omogućivši na taj način razlikovanje kamenaca od mokraćne kiseline i kalcijskih kamenaca, na osnovi njihovih različitih prigušenja, s time da kamenci od mokraćne kiseline imaju niže prigušenje od kalcijskih kamenaca. Poteškoće koje se javljaju prilikom ove analize su značajno preklapanje vrijednosti prigušenja, što sprječava visoke razine specifičnosti. Dvojnom energijom CT-a, tj. niskim i visokim energetskim skeniranjem, mogu se razlikovati različiti materijali sa sličnim gustoćama elektrona, ali različitom apsorpcijom fotona. Na taj način, ova metoda ne pridonosi samo identifikaciji, već i kemijskoj karakterizaciji kamenaca u urinarnom traktu koja može biti od velike pomoći prilikom donošenja odluke o operativnom zahvatu ili liječenju. Hidas i suradnici su uspoređivali CT i XRD analizu na bubrežnim kamencima i došli do zaključka da je CT metodom analize, sastav bubrežnih kamenaca određen s točnošću od 82%. Međutim, ova metoda nije adekvatna za analizu bubrežnih kamenaca od struvita, jer dolazi do preklapanja s nekim omjerima kalcificiranih kamenaca, pa se sastav ne može pouzdano procjeniti. Kombinacijom XRD analize i morfološkog prikaza, mikro CT analiza može identificirati finu strukturu kamenca i njegov mineralni sastav, a posebno je učinkovita kod kamenaca od apatita. Kontoyannis i suradnici analizirali su slojeve koji tvore bubrežne kamence pomoću tri spektroskopske metode: Ramanovom spektroskopijom, FTIR spektroskopijom i XRD metodom. Ramanovom spektroskopijom mogu se analizirati razni slojevi minerala u bubrežnim kamencima, za razliku od FTIR spektroskopije gdje dolazi do preklapanja vrpca, dok XRD metoda ne može precizno analizirati mineralni sastav kamenaca ukoliko su određene mineralne komponente u uzorcima zastupljene s manje od 5% (Basiri *et al*., 2012). Prema gore navedenim studijama, postoji mnogo različitih metoda koje se koriste za analizu bubrežnih kamenaca, ali ne postoji jedinstvena metoda koja bi bila dovoljna za pružanje svih potrebnih informacija o strukturi i mineralnom sastavu kamenaca. Upravo zbog toga, preporučuje se kombinacija tih analitičkih metoda.

3. MEHANIZMI FORMIRANJA BUBREŽNIH KAMENACA

Mnogim teorijama pokušalo se objasniti mehanizme formiranja bubrežnih kamenaca, od kojih je najprihvaćenija ona koja objašnjava mehanizme nastanka u četiri koraka koji uključuju: nukleaciju, kristalizaciju, rast i agregaciju kristala. Mehanizam formiranja kamenaca je kompleksni fizičko-kemijski proces koji je posljedica disbalansa između faktora koji pospješuju odnosno inhibiraju kristalizaciju. Proces započinje kada kalcijeve soli počinju precipitirati iz otopine formirajući kristale (nukleacija) u prezasićenom urinu (kristalizacija), nakon čega slijedi rast i agregacija kristala. Prezasićenost urina je ključni faktor koji dovodi do precipitacije, kristalizacije i konačnog formiranja kamenaca (Basavaraj *et al*., 2007).

3.1. Nukleacija

Nukleacija je formiranje nukleusa (jezgre) čvrste kristalne faze u otopini i predstavlja prvi korak u formiranju bubrežnih kamenaca. Tijekom ove faze dolazi do formiranja kristala iz urina koji je prezasićen kalcijevim oksalatima ili kalcijevim fosfatima. Nukleacija može biti homogena i heterogena. Proces nukleacije u čistim otopinama iz prezasićenog urina naziva se homogenom nukleacijom. Za pokretanje homogene nukleacije potrebna je veća prezasićenost otopine nego što je to slučaj za heterogenu nukleaciju. Kod homogene nukleacije kristali se počinju formirati spontano. Do heterogene nukleacije dolazi pri metastabilnoj fazi urina gdje se određene makromolekule ili drugi kristali mogu ponašati kao jezgre potrebna za daljnju kristalizaciju (Shafiee, 2010).

U sekundarnoj nukleaciji događa se tzv. masovna produkcija kristala. Ta dva procesa usko su vezana uz heterogenu nukleaciju, pošto urin nije čista otopina i nukleacija u urinu često se pojavljuje na već postojećim površinama ili na nekoj alternativnoj strukturi. Heterogena nukleacija urina može uključivati epitelne stanice, crvena krvna zrnca, druge kristale ili bakterije (Basavaraj *et al*., 2007).

Ioni se gibaju u urinu slučajnim putanjama i ako se nađu blizu jedan drugome mogu stupiti u međusobne odnose koji ovise o njihovom obliku, veličini i naboju. Ako ima dovoljno iona u otopini, koji stvaraju neki kristal, da drugi ion odmah može nadomjestiti onaj izgubljen i tako izjednačiti ionske gubitke kristala, ukupna masa kristala će ostati jednaka. Pri zasićenju ispod produkta topljivosti nemoguć je nastanak kristala u bilo kojim uvjetima. Područje zasićenja u kojemu se kristali ne stvaraju, ali je ono dovoljno za rast postojećih kristala naziva se metastabilnim područjem prezasićenja. Gornja granica metastabilnog područja kod koje ioni nukleiraju, spontano prelaze u nukleaciju, tj. krutu fazu, naziva se točkom nestabilnog prezasićenja ili produktom nastajanja. U toj točki počinje se zbivati nukleacija, tj. početna faza kristalizacije (Milošević & Batinić, 2002).

3.2. Kristalizacija

Kristalizacija predstavlja prvu fazu stvaranja kamenaca. Kamenci su zapravo rezultat izmjene faze u kojoj se otopljene soli kondenziraju, nastaju krutine i te transformacije utječu na prezasićenost otopine (Basavaraj *et al*., 2007).

Bubrežni kamenci nastaju kristalizacijom potencijalno netopljivih sastojaka iz urina. Osnovni preduvjet za početak kristalizacije je prezasićenje mokraće nekim drugim sastojkom. Potencijalno kalkulogeno djelovanje imati će nepovoljna pH vrijednost urina, mali volumen mokraće što vodi prezasićenju, uroinfekcija i pomanjkanje prirodnih inhibitora kristalizacije (Milošević & Batinić, 2002).

3.3. Rast kristala

Nakon nukleacije, rast kristala je drugi korak u procesu formiranja kamenaca. Pokretačka snaga za kristalizaciju je smanjenje potencijalne energije atoma ili molekula prilikom njihovog vezivanja. Proces rasta kristala počinje stvaranjem nukleacijske faze odnosno stvaranjem jezgre. Tijekom ove faze postoji period kada početno formirani kristali rastu i stvaraju agregate koji tvore veće čestice (Basavaraj *et al.*, 2007).

Nekoliko atoma ili molekula u prezasićenoj tekućini počinju formirati klastere. Rast kristala određuje se prema veličini i obliku molekula, fizikalnim svojstvima materijala, razini prezasićenosti, pH vrijednosti i prema defektima koji se mogu formirati u kristalnoj strukturi, a to je ujedno i jedan od preduvjeta za formiranje čestica (Basavaraj *et al*., 2007).

Jedan od faktora rasta kristala je epitaksija. To je proces kojim se materijal jednog kristalnog tipa precipitira (taloži) na površinu drugog čije su dimenzije kristalne rešetke gotovo identične. Kamenci se često sastoje od više faza. Različiti slojevi sadrže različite komponente, odnosno imaju drugačiji sastav i strukturu, međutim svaki od tih slojeva ujedno ima i homogeni kristalni sastav. Iako mehanizmi rasta u višekomponentnim kamencima nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da upravo epitaksija tu igra veliku ulogu. Tijekom procesa formiranja višekomponentnih kamenaca, molekule na površini jednog sloja vežu se na molekule drugog sloja. Te dvije različite komponente moraju biti kemijski kompatibilne (Lonsdale, 1968).

3.4. Agregacija kristala

U procesu agregacije kristali u otopini se drže zajedno i oblikuju veće čestice, tzv. agregate. U ovoj fazi čestice postaju dovoljno velike i postoji mogućnost da zaglave u suženom dijelu bubrega (bubrežnim tubulima), gdje bi služile kao jezgra oko koje bi dalje rasli kristali i na taj način formirali kamence. Osim toga može se neki kristalić „prikačiti“ na stijenku bubrega ili na mokraćne puteve pa i na taj način kamenac može dalje rasti. Agregacija čestica u otopini određena je balansom sila od kojih jedne imaju agregacijske efekte, a druge disagregacijske. U raznim stadijima formiranja kamenaca agregacija kristala je važniji faktor od nukleacije i rasta kristala, jer agregacija nastupa unutar samo nekoliko sekundi (Basavaraj *et al*., 2007).

4. INHIBITORI I PROMOTORI

Inhibitori su molekule koje smanjuju stupanj zasićenja urina koji je potreban za pokretanje nukleacije, smanjuju kristalni rast i agregaciju i inhibiraju sekundarnu nukleaciju. Za razliku od inhibitora, promotori dovode do povećanja koncentracije produkata koji dovode do prezasićenosti otopine. Abnormalna funkcija ili koncentracija tih spojeva u urinu može promjeniti fiziklano-kemijske uvjete koji su bitni za stvaranje kamenaca (Basavaraj *et al*., 2007).

Gubitak ravnoteže između urinarnih promotora i inhibitora dovodi do povećanog rizika od formiranja kamenaca. Među inhibitore spadaju mnoge organske i anorganske tvari kao što su citrat, magnezij, pirofosfat, velike molekule, odnosno makromolekule kao što su npr. glikozaminoglikani i veliki volumen urina. Od organskih inhibitora najvažniji je citrat (Gupta *et al*., 2011).

Citrati su se na veliko istraživali upravo zbog njihove inhibitorske funkcije u urinu i utvrđeno je da su posebno učinkoviti protiv kamenaca od kalcijevih oksalata i kalcijevih fosfata. Citrati ili limunska kiselina često su prisutni u ljudskoj prehrani u obliku citričnog voća. Citrati se u urinu vežu s kalcijem, smanjujući na taj način količinu dostupnog kalcija koji sudjeluje u stvaranju kamenaca. Isto tako, citrati sprječavaju rast sitnih kristala i njihovu agregaciju. Za prevenciju kalcijskih kameneca i kamenaca mokraćne kiseline kao nadomjestak prehrani uzima se kalijev citrat (odobreno 1985. od strane FDA, eng. *US Food and Drug Administration*) (Basavaraj *et al*., 2007).

Magnezij je četvrti najobilniji element u ljudskom tijelu i u velikoj količini nalazimo ga u kostima. U prezasićenoj otopini kalcij oksalata, magnezij smanjuje kristalni rast za 50%. Magnezij, biokemijski parameter prisutan i u mokraći kao magnezijev ion, Mg^{2+}, koja je po sastavu kompleksna otopina, može tvoriti komplekse s oksalatima, na taj način smanjujući količinu dostupnog oksalata koji dovodi do prezasićenosti u kojoj može nastati kalcij oksalat (Gupta *et al*., 2011).

Urin sadrži tvari koje utječu na proces kristalizacije i na taj način reguliraju formiranje kamenaca, a nazivamo ih promotori. To su: mali volumen urina, niska pH vrijednost urina, natrij, vrlo često povišene koncentracije nekih iona u mokraći kao što su npr. ioni kalcija,

oksalata, fosfata i urata koji mogu promovirati rast kalcijskih, oksalatnih, fosfatnih i uratnih kamenaca (Gupta *et al*., 2011).

Visoka koncentracija kalcija u urinu može biti uzrokovana konzumacijom previše soli u prehrani. Sol uzrokuje izlučivanje veće količine kalcija i na taj način povećava njegovu razinu u urinu. Povećani unos vode može smanjiti relativnu koncentraciju kalcija u urinu i time smanjiti rizik od nastajanja bubrežnih kamenaca (Basavaraj *et al*., 2007).

5. EPIDEMIOLOŠKI FAKTORI RIZIKA

Geografski položaj

Sudeći prema nekim istraživanjima, postoji veza između pojave bubrežnih kamenaca i geografskog položaja. Napravljena je studija koja je obuhvatila preko milijun ispitanika na području Sjedinjenih Američkih Država te se pokazalo da je najveća koncentracija oboljelih na području jugoistočnog dijela. Primjerice, na Bliskom istoku, rizik od pojave bubrežnih kamenca veći je nego na ostalim dijelovima svijeta. U postocima, 10 do 15% populacije SAD-a ima dijagnosticiranu urolitijazu, dok je taj postotak na Bliskom istoku dosta veći, za čak 20 do 25%. Rizik od kalcijske urolitijaze veći je kod ljudi koji žive na području Arabije, zapadne Indije i Latinske Amerike, nego što je to slučaj kod Europljana (Shafiee, 2010).

Geografski položaj može direktno utjecati na pojavu bubrežnih kamenaca zbog visokih temperatura koje pospješuju znojenje i dehidraciju, što može rezultirati prezasićenim urinom i na kraju kirstalizacijom odnosno stvaranjem bubrežnih kamenaca.

Dob, rasa i spol

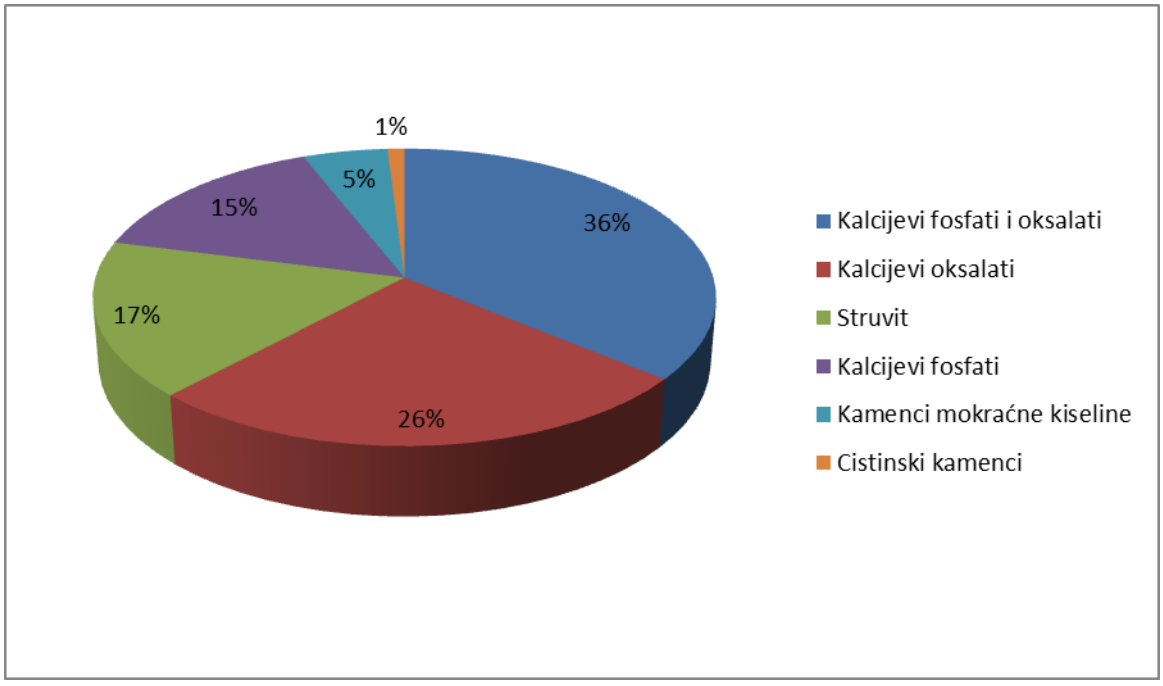
Muškarci u četerdesetim godinama života bijele rase imaju veći rizik oboljevanja od bubrežnih kamenaca od ostalih dobnih i rasnih skupina. Ukoliko postoji genetska predispozicija za pojavu bubrežnih kamenaca unutar obitelji, vjerojatnost od njihove pojave raste. Određene medicinske tegobe kao što su visoki krvni tlak, giht, infekcije urinarnog trakta mogu povećati rizik pojave bubrežnih kamenaca. Unos malih količina tekućine najčešći je uzrok njihovog stvaranja. Prehrana također igra važnu ulogu. Veliki unos proteina (pojačano izlučivanje fosfata i magnezija u urin), soli i hrana bogata oksalatima, kao što je čokolada ili tamno zeleno povrće, mogu povećati rizik stvaranja bubrežnih kamenaca kod nekih ljudi (Romero *et al*., 2010).

Žene afro-američke rase imaju manju vjerojatnost za stvaranje bubrežnih kamenaca od žena bijele rase. Malo toga se zna o rasnim razlikama u sastavu urina, pa se uspoređivala razlika na temelju pH vrijednosti urina, volumena urina, izlučivanja kalcija, oksalata, mokraćne kiseline, natrija, kalija, magnezija, fosfata, sulfata i kreatinina u urin kroz 24 sata. Dobiveni rezultati pokazali su da žene afro-američke rase imaju veću masu i gustoću kostiju, izlučuju manje kalcija u urin te imaju nešto višu pH vrijednost urina od žena bijele rase koje su sklonije stvaranju bubrežnih kamenaca i osteoporozi (Taylor & Curhan, 2006).

6. TIPOVI BUBREŽNIH KAMENACA

Postoji nekoliko tipova bubrežnih kamenaca koji se dijele ovisno o njihovom sastavu i tipu kristala. Najčešći tip bubrežnih kamenaca na koje otpada 80 do 90% su kalcijevi kamenci. Oni uglavnom čine mješavinu kamenaca od kalcijevih fosfata i kalcijevih oksalata. U većini kalcijevih kamenaca, kalcijev oksalat je glavni sastojak, dok udio kalcijskih fosfata iznosi od 1 do 10%.

Najveći postotak bubrežnih kamenaca, od 36%, čine kalcijevi fosfati i oksalati. Na kalcijeve oksalate otpada 26% kamenaca dok su kamenci od kalcijevog fosfata rjeđi i čine svega 15%, 17% otpada na kamence od struvita, 5% su kamenci mokraćne kiseline, a svega 1% čine cistinski kamenci (dijagram 1) (Shafiee, 2010).



Dijagram 1. Zastupljenost pojedinih tipova bubrežnih kamenaca (%)

Iako je prezasićenost soli koje tvore kamence u urinu ključna za njihovo nakupljanje, to neće uvijek rezultirati formiranjem kamenaca. Bubrežni kamenci uglavnom se sastoje od soli kalcija, mokraćne kiseline, magnezij-amonij fosfata ili cistina (Shafiee, 2010).

7. KALCIJSKI KAMENCI

Kalcijski kamenci mogu biti oksalatni ili fosfatni. Većina kalcijskih kamenaca sastoji se od 90% oksalata, ali može biti da u njihovom sastavu ima i fosfata u tragovima. U dosta slučajeva upravo kamenci od kalcij oksalata mogu služiti kao jezgra, odnosno centar taloženja naknadnih spojeva. Kalcij oksalatni kamenci najčešće se javljaju kao kalcij oksalat monohidrat (CaC_2O_4 x H_2O, WE, whewellit) koji je stabilni termodinamički oblik kalcij oksalata, te kalcij oksalat dihidrat (CaC_2O_4 x $2H_2O$, WD, weddellit) koji je nestabilan te transformira često u kalcij oksalat monohidrat. Kristalići vidljivi pod mikroskopom u urinu su bipiramide kalcij oksalata dihidrata (WD-a). Postoji i kalcij oksalat trihidrat, CaC_2O_4 x $3H_2O$, nastaje u određenim uvjetima ali se uglavnom ne pojavljuje u kamencima (Grases, 1998).

Mlijeko i mliječni proizvodi glavni su izvor kalcija u prehrani. Pored toga, apsorpcija kalcija iz mlijeka i mliječnih proizvoda bolja je nego iz drugih vrsta hrane. Uz kalcij i vitamin D, također sadrže i elemente u tragovima, među kojima je i cink koji je važan za zdravlje kostiju. Dugo vremena mislilo se da visok unos kalcija hranom uzrokuje nastanak bubrežnih kamenaca. Novija istraživanja pokazuju upravo suprotno–nizak unos kalcija povećava opasnost pojavljivanja kamenaca od kalcij oksalata. Pretpostavlja se da manjak kalcija pospješuje apsorpciju oksalata iz crijeva i s tim njegovo izlučivanje u urin. Oksalat prisutan u urinu bitniji je (važniji) za tvorbu bubrežnih kamenaca nago sam kalcij (Rogelj, 1998). Kalcij fosfatni kamenci su minerali iz grupe apatita, brushit, monetit i whitlockit.

7.1. Minerali grupe apatita

Apatit je opći naziv koji se koristi za opisivanje kalcijevih fosfata sa pojednostavljenom formulom $Ca_5(PO_4)_3X$, (X=F,Cl,OH) (Back, Mandarino, 2008), a prvi ga je u mineraloško literaturu uveo Werner 1786. godine. Grupa apatita je grupa sličnih izomorfnih heksagonalnih fosfatnih minerala, čije je individualne članove često međusobno vrlo teško razlikovati, budući da se mogu djelomično zamjenjivati. Fluorapatit je najčešća forma apatita, postoje još i klorapatit i hidroksilapatit (Pasero *et al.,* 2010).

Najvažniji mineral u ljudskom tijelu je apatit, glavni sastavni mineral kostiju i zubi. U urinarnim kamencima javlja se kao hidroksilapatit $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ i karbonatni apatit $Ca_5(PO_4, CO_3, OH)_3OH$, u kojem CO_3OH skupina zamjenjuje PO_4 (do 5% tež.). Apatit je najraširenij mineral u kamencima, a najčešće dolazi kao karbonatni apatit i kao hidroksilapatit. Povezan je s većinom drugih materijala koji sudjeluju u formiranju kamenaca, i često služi kao centar taloženja naknadnih spojeva. Postoje dva varijeteta. Apatit se javlja u obliku mekanog, sitnozrnatog, bijelog, žutog ili svijetlosmeđeg praha, a dolazi kao i masivan, staklast, žuto-smeđi ili crni materijal. Sve boje osim bijele rezultat su djelovanja organske tvari. Češće vrste apatitnih kamenaca pokazuju naizmjenično staklaste i prašinaste slojeve (Gibson, 1974).

7.2. Brushit

Brushit ($CaHPO_4 \times 2H_2O$) (Back, Mandarino, 2008), kristalizira u monoklinskom sustavu, ima istu strukturu kao i gips ($CaSO_4 \times 2H_2O$), javlja se redovito, ali u puno manjem broju od apatita u obliku bubrežnih kamenaca (u svega 10% slučajeva). Kristalizira samo pri niskim pH uvjetima (sintetiziran pri pH 6,3-6,0). Pojavljuje se u obliku tankih, oštrih, prozirnih, bijelih do žućkastih monoklinskih kristala, u obliku radijalnih agregata. Zabilježena je i djelomična pseudomorfna zamjena brushita s apatitom (Gibson, 1974) prikazana formulom: $5CaHPO_4 \times 2H_20 \rightarrow Ca_5(PO_4)_3OH + 2H_3PO_4 + 9H_20$

Brushit u prirodi nalazimo kao špiljski mineral u naslagama guana te u fosforitima koji su formirani pri niskim pH uvjetima reakcijama fosforom bogatih otopina s kalcitom i

glinama. Dolazi u asocijaciji s hidroksilapatitom. Pod određenim uvjetima kao što su smanjena vlažnost i povećana temparatura, procesom dehidratacije prelazi u monetit ($CaHPO_4$) (Giurgiu & Tamas, 2013). Istraživanja su pokazala da je brushit u bubrežnim kamencima biokompatibilan. To je jedinstvena prednost nad drugim mineralima kalcij fosfata, primjerice hidroksilapatita. Ta prednost leži u njegovoj sposobnosti da se resorbira pod fiziološkim uvjetima. Struktura brushita ima dvostruki sloj molekule vode u unutarnjem djelu rešetke. Hidrati su važni pri formiranju bioloških minerala jer smanjuju energetsku barijeru potrebnu za nukleaciju i rast iz vodenih otopina. 60% biogenih minerala su upravo hidrati. Istraživanja su pokazala da brushit, zajedno s drugim kalcijskim fosfatima, ima ključnu ulogu u prijelaznoj fazi kristalizacije u stabilniji hidroksilapatit.

7.3. Monetit

Monetit ($CaHPO_4$) (Back, Mandarino, 2008) kristalizira u triklinskom sustavu, bezvodan je i analogan brushitu. Prvi puta je u obliku bubrežnog kamenca zabilježen 1974. godine. Kristalizira pri vrlo niskim pH vrijednostima urina (4,13–5,08), koji je prirodno puferiran i ima visoku koncentraciju otopljenih tvari. Analizirani monetit u kamencima obično je laminirani, sivo smeđi, sitnozrnati materijal u asocijaciji sa oksalatima i apatitom. Može dolaziti i u asocijaciji s brushitom (Gibson, 1974).

7.4. Whitlockit

Whitlockit ($Ca_9Mg(PO_3OH)(PO_4)_6$) (Back, Mandarino, 2008) se najrjeđe nalazi u urinarnom traktu, a najčešće kao kamenac u prostati. Whitlockit je kalcijski fosfat s malim udjelom magnezija koji se najrjeđe od svih nalazi u bubrežnim kamencima. Kristalizira u kiseloj sredini, a javlja se u obliku malih kristala na površinama kamenaca od struvita i apatita. Whitlockit je nestabilan u urinarnom traktu i umjesto njega bi trebao precipitirati apatit. Međutim, whitlockit je u prirodi stabiliziran malim udjelom magnezija i cinka, što se

najvjerojatnije isto događa u ljudskom tijelu. Male količine whitlockita katkada se mogu naći u obliku korica na kamencima od struvita. Čisti whitlockit gotovo je jedini sastojak kamenaca koji se nalaze u prostati, gdje se ujedno i nalaze najviše koncentracije cinka u ljudskom tijelu. Whitlockit u kamencima često može imati PO_4 skupinu zamjenjenu sa CO_3OH, kao i kod apatita (Gibson, 1974).

8. MAGNEZIJSKI FOSFATI

Magnezijski fosfati su važni indikatori infekcija u urinarnom traktu. U mnogo slučajeva precipitacija minerala može biti ubrzana prisutstvom infektivnih organizama (Gibson, 1974).

8.1. Struvit

Struvitni kamenci sastoje se od mješavine magnezija, amonija i fosfata. Struvit (NH_4MgPO_4 x $6H_2O$) (Back, Mandarino, 2008) kristalizira u rompskom sustavu i ima prozirne piramidalne kristale obično veličine oko 1 mm. Takvi kristali mogu ispunjavati šupljine, pukotine i pore u kamencima koji se sastoje od prašinastog apatita koji precipitira zajedno s malim, bijelim, zaobljenim kristalima struvita. Ti kamenci često se razvijaju u obliku grančica koje dospjevaju unutar bubrega. Kristali dolaze u obliku zrnaca kave, i često manje mase sitnih kristala srastaju zajedno s apatitom, pa na taj način mogu ispuniti cijeli otvoreni prostor bubrega (Gibson, 1974).

Struvitni kamenci se povezuju sa kroničnim infekcijama urinarnog trakta. Nekoliko mikroorganizama je odgovorno za formaciju kamenaca od struvita uključujući *Proteus, Staphylococcus, Klebsiella* i *Pseudomonas* (McLean *et al.,* 1989). Takvi kamenci nastaju kao posljedica bakterijske infekcije mokraćnog sustava. Ključni faktori uključeni u stvaranje kamenaca su produkcija enzima ureaze i bakterijski egzopolisaharidi. Enzim ureaza hidrolizira ureu, pri čemu nastaje amonijak i ugljični dioksid. Tako stvoreni amonijak podiže pH vrijednost urina uslijed čega topivi ioni magnezija i kalcija precipitiraju te nastaju kamenci koji sadrže magnezij amonij fosfat (struvit) i kalcij fosfat (apatit). Bakterijski egzopolisaharidi doprinose stvaranju kamenaca ubrzavanjem supersaturacije i kristalizacije iona kalcija i magnezija elektrostatskim interakcijama te vezivanjem tih iona za anionske grupe na njihovoj površini. Uzročnik koji se najčešće povezuje s nastankom stuvitnih kamenaca je bakterija *Proteus mirabilis*. Pretpostavljalo se da u procesu nukleacije kristala i nastanka kamenaca ključnu ulogu ima sposobnost bakterija da stvaraju biofilm, pri čemu bi izvanstanični polisaharidni matriks biofilma promovirao

vezivanje kristala (Vraneš & Leskovar, 2009). Kao treća mineralna komponenta infektivnih kamenaca javlja se newberyit (McLean *et al.,* 1989).

Prema istraživanju morfologije i precipitacije struvita u vodenim otopinama pri 25 ˚C i 37 ˚C i početnim pH vrijednostima između 5,0 i 9,0 potvrđeno je da struvit prevladava pri pH vrijednosti od 7,4, za razliku od newberyita koji je dobiven samo pri pH vrijednosti manjoj od 6,5 (Kontrec *et al*., 2005).

Struvit precipitira u alkalnoj sredini zbog prisustva amonijaka te zbog slabog vezivanja s oksalatima i kiselim kalcijskim fosfatima koji su stabilniji pri kiselijim uvjetima i sterilnom urinu (Gibson, 1974).

Staghorn kamenci

Staghorn kamenci su razgranati kamenci koji zauzimaju veliki dio mokraćnog sustava. Oni mogu ispunjavati cijeli unutarnji otvoreni prostor bubrega. Takvi kamenci najčešće se sastoje od smjese magnezij amonij fosfata ili struvita i/ili karbonatnog apatita, a nazivaju se i infektivni kamenci zbog njihove povezanosti s infekcijama mokraćnog sustava koje su uzrokovane specifičnim organizmima. Djelovanje tih organizama rezultira alkalnim urinom i visokom koncentracijom amonijaka, zajedno s velikom količinom fosfata i magnezija u urinu, koji potiču kristalizaciju struvita, što pak dovodi do stvaranja velikih, razgranatih kamenaca. Kulture infektivnih kamenaca dobivene iz površine i unutrašnjosti kamenaca su pokazale da bakterije borave u samom kamencu, što uzrokuje njegovu infekciju, za razliku od kamenaca koji su kristalizirali iz drugačijih otopina čija je unutrašnjost sterilna. Jednom kada je infektivni kamenac prisutan, infekcije imaju tendenciju ponavljanja (Preminger *et al*., 2005).

8.2. Newberyit

Newberyit je kiseli fosfat ($MgHPO_4$ x $3H_2O$) (Back, Mandarino, 2008), kristalizira u rompskom sustavu, a često dolazi u asocijaciji sa struvitom. Povezuje se s infekcijama pomoću bakterije *Proteus mirabilis*, koja je poznata po oslobađanju NH_3 povećavajući na taj način pH urina. Newberyit se najčešće pojavljuje u obliku blijedo zelenih do bijelih sferula na površini i u prostoru pora apatitno struvitnih kamenaca. Mnogi kamenci koji sadrže ovaj tip newberyita lako se mrve, a na slomljenim unutarnjim površinama pojavljuju se sferule koje mogu biti velike do 2,5 mm u promjeru, a može se pojavljivati i u obliku rozeta. Newberyit se može javiti i u obliku staklastih, zelenkastih, rompskih kristala u obliku dijamanta. Takvi kristali su manji od 0,5 mm i nalaze se na površinama kamenaca od apatita i struvita. Newberyit precipitira kao stabilni magnezijski fosfat u kiselim uvjetima urinarnog trakta (Gibson, 1974).

8.3. Hannayit

Hannayit, $(NH_4)_2Mg_3H_4(PO_4)_4$ x $8H_2O$ (Back, Mandarino, 2008), kristalizira u triklinskom sustavu i pojavljuje se u obliku mekanih bijelih korica na kamencima u rastresitim agregatima. Dolazi u asocijaciji s apatitom i struvitom. Formula i razne asocijacije hannayita predstavljaju odgovor na uvjete u urinarnom traktu koji su blizu neutralne vrijednosti. Molekularni omjeri, ali i magnezij upućuju na to da bi malo kiseliji uvjeti bolje odgovarali kristalizaciji. On se jako rijetko pojavljuje upravo zbog toga što je vrlo teško održati pH ravnotežu u čovjekovom tijelu kroz duži vremenski period (Gibson, 1974).

9. METODE ISTRAŽIVANJA

Dostupne su mnoge analitičke tehnike za analizu sastava i strukture bubrežnih kamenaca, ali ni jedna od njih ne daje sve potrebne informacije. Svi uzorci najprije su promatrani pod lupom, zatim su snimljeni uzorci kamenaca i na pretražnom elektronskom mikroskopu. Za analizu kamenaca u ovom diplomskom radu koristile su se i difrakcija X-zraka na prahu (XRD) te IR-spektroskopija. XRD difrakcija i IR spektroskopija daju prihvatljive rezultate koji se vrlo lako mogu uspoređivati, a danas se upravo one smatraju referentnim analitičkim metodama za analizu bubrežnih kamenaca. Svi uzorci najprije su promatrani pod lupom kako bi se utvrdile vanjske karakteristike promatranih bubrežnih kamenaca.

9.1. Promatranje kamenaca pod lupom

Svi uzorci najprije su promatrani na lupi, pod reflektiranim svjetlom, kako bi se dobilo što više informacija o morfologiji, strukturnim obilježjima, laminaciji, radijalnoj strukturi i odnosima pojedinih mineralnih faza kamenaca (tablica 9.1.1.).

Tablica 9.1.1. Popis uzoraka i njihove karakteristike

Oznaka uzorka	**Mineralni sastav**	**Boja**	**Veličina (cm)**	**Morfološke karakteristike**
K 1	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat	Bijela do žućkasto smeđa	≈5 cm	Cjeloviti kamenac, *Staghorn* oblik, na površini vidljivi razvijeni kristali, porozan, šupljine u unutrašnjem djelu kamenca
OS 1	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat	Bijela do žućkasto smeđa	Tri fragmenta od ≈0,5 cm	Na površini i u unutrašnjosti vidljivi razvijeni kristali, porozan, trusi se
OS 6	Struvit, brushit, karbonatni apatit, kalcij oksalat	Žućkasto bijela	Dva fragmenta od ≈0,5 cm, jedan od ≈1 cm	U unutašnjem dijelu kamenca vidljivi kristali struvita, porozan
OS 12	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat	Žuto-smeđa	≈ 4 cm	Cjeloviti kamenac, *Staghorn* oblik, na površini vidljivi razvijeni kristali struvita, porozan
K 6	Hidroksilapatit, karbonatni apatit	Žuto-smeđa, ponegdje bijela	Tri fragmenta od ≈0,5 cm	Šuplja unutrašnjost s organskom tvari, laminacija unutar kamenca ali i na njegovoj površini
OS 8	Brushit, kalcij hidrogen fosfat hidrat, kalcijev oksalat	Bijela	Jedan fragment od ≈0,6 cm, dva od ≈0,4 cm, šest od ≈0,2 cm	Šuplja unutrašnjost s radijalno raspoređenim prozirnim kristalima brushita
OS 10	Hidroksilapatit, struvit, karbonatni apatit	Bijela	Tri fragmenta od ≈0,3 cm, jedan od ≈0,4 cm, dva od ≈0,2 cm	Šupljine u unutrašnjem djelu kamenca u kojima su vidljivi lijepo razvijeni kristali struvita

9.2. Pretražni elektronski mikroskop (SEM)

Osnove rada pretražnog elektronskog mikroskopa sastoje se od skeniranja površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Uzorak se nalazi na nosaču u komori mikroskopa, a izvor elektrona je katoda smještena u emisijskoj komori. SEM (pretražni elektronski mikroskop, eng. *Scanning Electron Microscope*) skenira površinu preparata i prilikom udarca elektrona o površinu uzorka, događaju se razni efekti koji se koriste za dobivanje slike i provođenje analiza u SEM-u, dok se promatranjem tih struktura stječe dojam dubine. Pomoću njega moguće je odrediti morfologiju, prostorni raspored pojedinih faza i komponenta u bubržnim kamencima te odrediti sastav uzorka. Takvi uređaji rade na uvećanjima od 10 do preko 500 000 puta.

Izvor elektrona je katoda smještena u emisijskoj komori na vrhu kolone. Elektroni se ubrzavaju na putu između katode i anode koje se nalaze pod visokim naponom, fokusiraju se i usmjeravaju pomoću magnetskih leća na površinu uzorka. Prilikom neelastičnog sudara elektrona iz snopa i uzorka dolazi do izbijanja elektrona iz elektronskog omotača atoma uzorka. Ti izbijeni elektroni nazivaju se sekundarni elektroni (SE) i najčešće imaju energiju manju od 50 keV. SEI detektor služi za prikaz površine uzorka u velikoj rezoluciji pa se najviše koristi upravo za proučavanje morfologije. Prilikom sudara s atomskom jezgrom atoma koji grade uzorak, elektron se može odbiti natrag. Takve elektrone nazivamo elektroni povratnog raspršenja ili BSE elektroni (eng. *Back Scatter Electrons*). Njih detektiramo pomoću BSE detektora povratnog raspršenja, koji uzorak prikazuje u nijansama sive boje koje odgovaraju gustoći elektrona u atomima koji izgrađuju uzorak. Kemijski elementi različitog atomskog broja uzrokuju različiti kontrast na detektoru omogućujući elementarnu kemijsku analizu materijala. BSE detektor također smanjuje efekte izazvane nakupljanjem elektrona na površini uzorka, tzv. nabijanje pa se mogu snimati i uzorci koji nisu električki vodljivi (Plodinec, 2014).

Priprema uzoraka:

Prije snimanja uzorka, potrebno ga je pripremiti. Uzorci se stave na ljepljivu električno vodljivu grafitnu traku, te se prema potrebi naparuju slojem ugljika ili nekog drugog metala da bi postali vodljivi i da bi se na taj način izbjeglo nakupljanje naboja na njegovoj

površini (nabijanje), a time i degradacija kvalitete slike. Pripremljeni uzorak se na posebnom nosaču stavlja u komoru mikroskopa. Kako se uzorci u mikroskopu nalaze pod vakuumom, postoji opasnost od eksplozije plinskih mjehurića, prema tome uzorci moraju biti stabilni u vakuumu te se materijali koji sadrže vodu ne mogu ispitivati, jer se na taj način mogu oštetiti i mikroskop i uzorci.

Prednosti ove metode pri karakterizaciji bubrežnih kamenaca su: minimalna priprema uzoraka za snimanje, brzi prihvat podataka i sposobnost snimanja vrlo malih detalja. Nedostaci ove metode su sljedeći: uzorci moraju biti čvrsti, stabilni i moraju stati u mikroskopsku komoru, zatim tekući uzorci i materijali koji sadrže vodu ne mogu se ispitivati konvencionalnim SEM-om, a materijali koji nisu vodljivi moraju se montirati na vodljivi nosač i napariti nanometarskim filmom metala ili ugljika.

Svi uzorci na elektronskom mikroskopu snimljeni su na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

9.3. Rentgenska difrakcija na prahu (XRD)

Rentgenska difrakcija na prahu (XRD) je jedna od najčešćih metoda koje se koriste u analizi bubrežnih kamenaca. Ta metoda koristi se za određivanje strukture materijala. Svaki materijal koji u svojoj osnovi ima kristalnu strukturu, ima točno određene elemente simetrije te strukture. To je kristalografska metoda primjenjena za kvalitativnu faznu analizu uzoraka. Za analizu je korišten *Phillips X'Pert PRO* rentgenski uređaj. Snimano je pri naponu od 40 kV i jakosti struje 40 mA. Korištena je bakrena anoda.

Uzorke se usitni u prah u ahatnom tarioniku i stavi na nosač. Prolaskom rentgenskih zraka kroz uzorak na nosaču, dolazi do interakcije između elektrona u atomima i rentgenskih zraka te do njihove difrakcije s mrežnih ravnina. Do difrakcije rentgenskog zračenja valne duljine λ koje pada pod kutem θ na mrežne ravnine indeksa hkl, razmaknute za iznos međumrežnog razmaka dhkl, doći će ako je zadovoljen Braggov zakon koji glasi: $2d\sin\theta=n\lambda$. Tijekom analize mijenjan je kut pod kojim zrake padaju na pločasti uzorak, a

detektor je registrirao promjene intenziteta difraktiranog zračenja (Dutrow, B.L. & Clark, C.M.).

Kao rezultat analize dobiveni su difraktogrami s određenim difrakcijskim maksimumima, karakterističnima za pojedine minerale. Difrakcijski maksimumi računalno su obrađeni *X'Pert High Score Plus* programom i uspoređeni s podacima u bazi podataka računala za standardne uzorke.

9.4. IR spektroskopija

Infracrveni spektri u analizi bubrežnih kamenaca imaju veliki značaj jer omogućavaju detekciju funkcionalnih grupa i identifikaciju pojedinih spojeva. Identifikacija nepoznatog spoja bazira se na postojanju u spektru područja "otiska prsta"(eng.*"finger print region"*), koje se uspoređuje sa spektrom poznate molekule. Svaki organski spoj ima karakterističan spektar u oblasti otiska prsta koji ne pokazuje ni jedna druga supstanca. Apsorpcija elektromagnetnih zračenja različitih valnih dužina izaziva jače vibriranje molekula, tj. njihovo pobuđivanje. Postavi li se uzorak u infracrveni spektrofotometar i izloži kontinuiranoj promjeni valnih duljina infracrvenog zračenja, on će apsorbirati svjetlo kad upadno zračenje bude odgovaralo energiji neke molekulske vibracije. Tipični infracrveni spektrofotometri bilježe područja koja odgovaraju vibracijama istezanja i savijanja u molekuli. Bilježi se apsorpcija zračenja i tako dobivamo infracrveni spektar uzorka. Svaka veza u molekuli ima svoju frekvenciju vibracije. Apsorpcijom zračenja iste frekvencije povećava se amplituda te vibracije. Infracrveni spektar ovisi o frekvenciji vibracije i intenzitetu propuštene svjetlosti, dok apsorbirana energija infracrvenog zračenja određene frekvencije ovisi o strukturi i koncentraciji spoja. Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje valnih duljina od 0,7 do 500 μm. Područje infracrvenog zračenja podijeljeno je na tri dijela: blisko, srednje i daleko (tablica 9.4.1.) (Popović, 1999).

Tablica 9.4.1. Područje infracrvenog zračenja

(I) blisko	0,7 μm – 2,8 μm	14000 cm^{-1} – 3600 cm^{-1}
(II) srednje	2,8 μm – 50 μm	3600 cm^{-1} – 200 cm^{-1}
(III) daleko	50 μm – 500 μm	200 cm^{-1} – 20 cm^{-1}

U području bliskog infracrvenog zračenja (I) događaju se elektronski prijelazi nižih energija kao i neke promjene u vibracijskim, odnosno rotacijskim razinama molekula. Srednje područje infracrvenog zračenja (II) je ono u kojem se uglavnom nalaze vibracijsko-rotacijske promjene većine molekula, pa je to područje od posebne važnosti. U području dalekog infracrvenog zračenja (III) opažaju se mnoge čiste promjene u rotacijskim razinama u molekuli, za razliku od bliskog i srednjeg, gdje se promjene vibracijskih razina superponiraju s promjenama u rotacijskim razinama. Uobičajeni dio spektra za IR analizu je od 4000 do 400 cm^{-1} (Popović, 1999).

Kod FTIR-a pomoću kompjutorskog programa daje se naredba za snimanje spektra. Upadno se zračenje usmjerava se dijelom prema fiksnom, a dijelom prema pomičnom zrcalu. Potom se oba snopa reflektiraju, sjedinjuju te usmjeravaju prema uzorku, a zatim na detektor. Pomicanje pokretnog zrcala uzrokuje razliku optičkog puta između dvije zrake koje interferiraju te se ponovno spajaju u jednu IR zraku. Ovako rekombinirana IR zraka prolazi kroz ispitivni uzorak i konačno dolazi u detektor. Položaj i pomicanje pokretnog ogledala kontrolira se s He-Ne laserom čime se postiže velika točnost frekvencija (Dragčević, 2010).

Upadno zračenje, koje po energiji odgovara molekulskim vibracijama, apsorbira se u uzorku. Tako dobiveni spektar u vremenskoj domeni (interferogram) primjenom matematičkog postupka Fourierove transformacije pretvara se u spektar u frekvencijskoj domeni. Spektar se obrađuje navođenjem valnog broja položaja apsorpcije karakterističnih funkcionalnih skupina i navođenjem inteziteta apsorpcijskih maksimuma. Položaj apsorpcijske vrpce u infracrvenom spektru neke molekule ovisi o više čimbenika.

To su: relativne mase atoma, polarnost same molekule, jakost veze među atomima i dr., a moguće su i dodatne interakcije između vibracija unutar iste molekule (Popović, 1999).

U radu, kod analize nekih uzoraka kombinirane su obje spektroskopske metode, KBr pastile i ATR ili prigušene totalne refleksije, no za prikaz rezultata korišteni su podaci dobiveni ATR metodom. FTIR spektri su dobiveni na *Bruker Tensor 27, platinum ATR* spektrometru, u rasponu od 4000 – 370 cm^{-1} (24 skenova, rezolucija 4 cm^{-1}).

Priprema KBr pastile je najjednostavnija tehnika pripreme krutog uzorka za snimanje spektra. Uzorak (najčešće kristalan) se dobro usitni u ahatnom tarioniku, pomiješa sa suhim kalijevim bromidom u homogenu smjesu (cca. 1%-tna) i preša u hidrauličkoj preši u oblik pastile. Preporučljivo je uzeti oko 1 mg uzorka na 100 mg KBr-a za supstance molekulske težine do 200. S porastom molekulske težine količina se proporcionalno povećava. Važno je supstancu fino usitniti kako ne bi došlo do prevelikog rasipanja zračenja. Pastila se stavi u odgovarajući nosač spektrofotometra te potom snimi spektar. Dobiveni spektar u pravilu mora odgovarati analiziranoj supstanci. Ako ne odgovara u potpunosti, to može biti posljedica polimorfije ili promjene supstance uslijed velikog pritiska, odnosno reakcije s kalijevim bromidom prilikom prešanja.

ATR (eng. *Attenuated Total Reflectance*) ili prigušena totalna refleksija je spektroskopska metoda koja se koristi za analizu površine materijala. Prednost ove metode je u tome što nije potrebna posebna priprema uzorka. ATR metoda je pogodna za ispitivanje i čvrstih i tekućih uzoraka. Ovom metodom se mjere promjene koje nastaju kod totalne unutarnje refleksije IR zrake kad zraka ulazi u kontakt s uzorkom. IR zraka je usmjerena na optički gust kristal visokog indeksa refrakcije pod određenim kutem. Identifikacija je vrlo jednostavna, za obje metode, ako referentni spektar odgovara nepoznatom materijalu koji je pronađen. Kada točna referenca spektra nije pronađena, da bi se odredio sastav kamenca potrebno je određivati jednu po jednu apsorpcijsku vrpcu (Stuart, 2004).

10. REZULTATI

10. 1. Promatranje morfologije kamenaca pod lupom

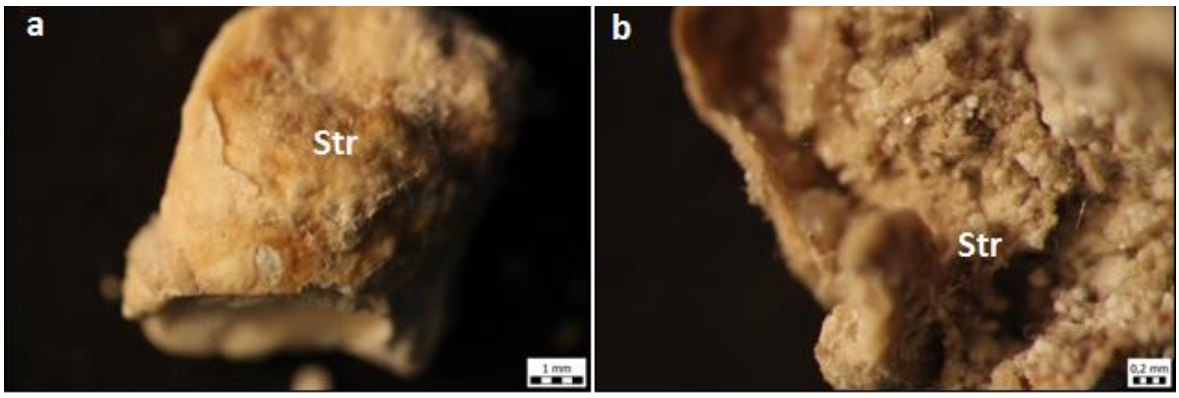
Bubrežni kamenac K 1 (struvit)



Slika 10.1.1.a) Struvitni kamenac (Str) promatran pod lupom; b) uvećan detalj s površine kamenca

Na slici 10.1.1.a vidljiv je karakterističan oblik, veličina i porozna unutrašnjost bubrežnog kamenca od struvita. Također su vidljivi prozirni kristali struvita pri većem povećanju na površini kamenca (slika 10.1.1.b).

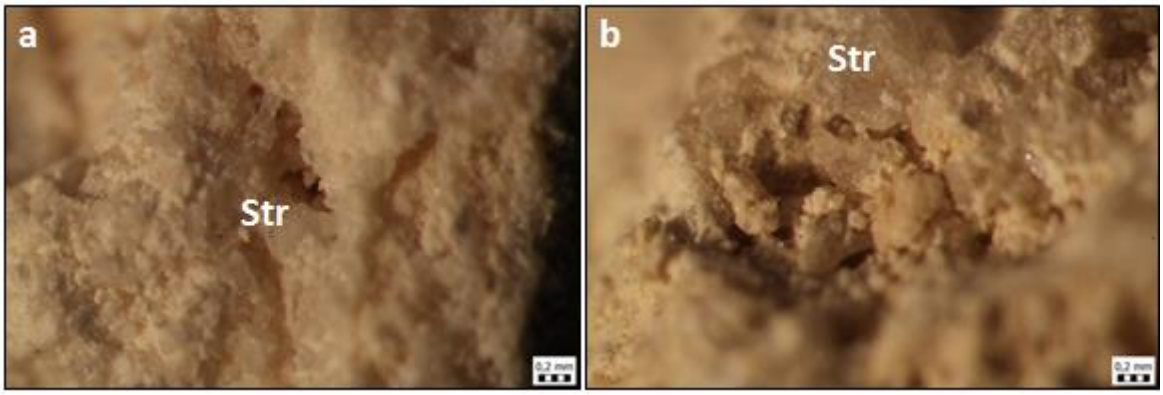
Bubrežni kamenac OS 1 (struvit)



Slika 10.1.2.a) i b) Prikaz površine i unutrašnjosti kamenca od struvita (Str) promatranog pod lupom

Bubrežni kamenci prikazani na slici 10.1.2.a i b su karakteristično bijelo do žuto-smeđe boje, a u unutrašnjosti su dosta porozni i truse se.

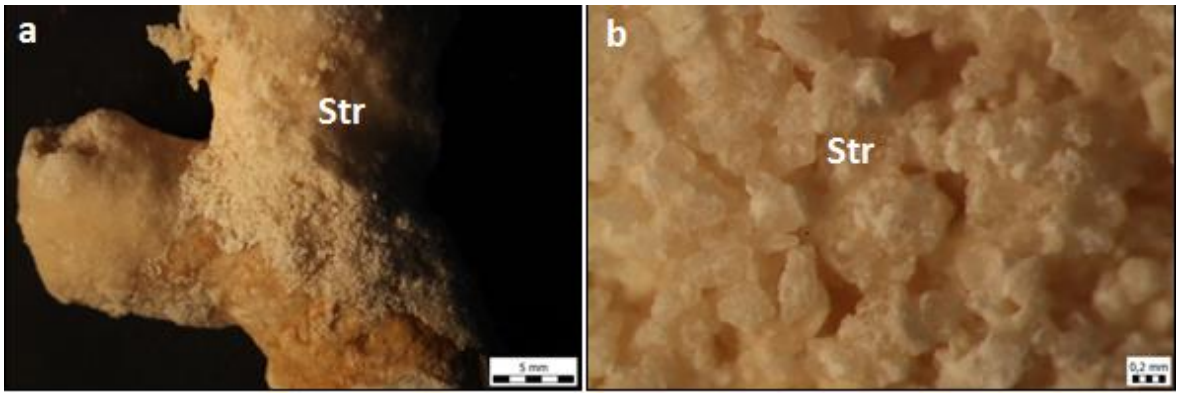
Bubrežni kamenac Os 6 (struvit)



Slika 10.1.3.a) i b) Unutrašnjost bubrežnog kamenca od struvita promatranog pod lupom

Karakteristične bijele do žućkaste boje, unutrašnjost kamenca nije kompaktna, već je porozna i trusi se (slika 10.1.3.a i b).

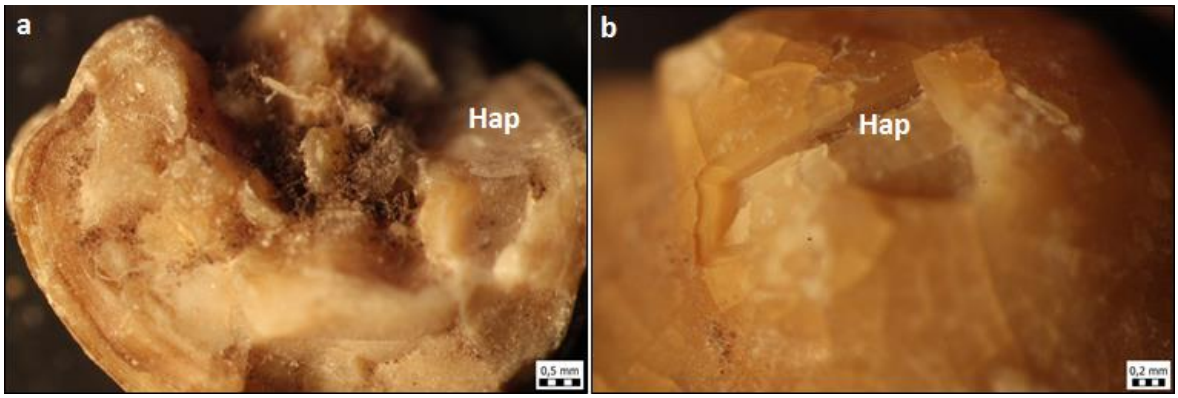
Bubrežni kamenac Os 12 (struvit)



Slika 10.1.4.a) Kamenac od struvita (Str) promatran pod lupom; b) kristali struvita na površini kamenca

Razgranat oblik (slika 10.1.4.a) karakterističan je za infektivne struvitne kamence, ima poroznu unutrašnjost i trusi se. Na površini kamenca pri većem povećanju mogu se vidjeti veći kristali struvita s bijelom fazom na njihovoj površini koja vjerojatno odgovara apatitu (slika 10.1.4.b).

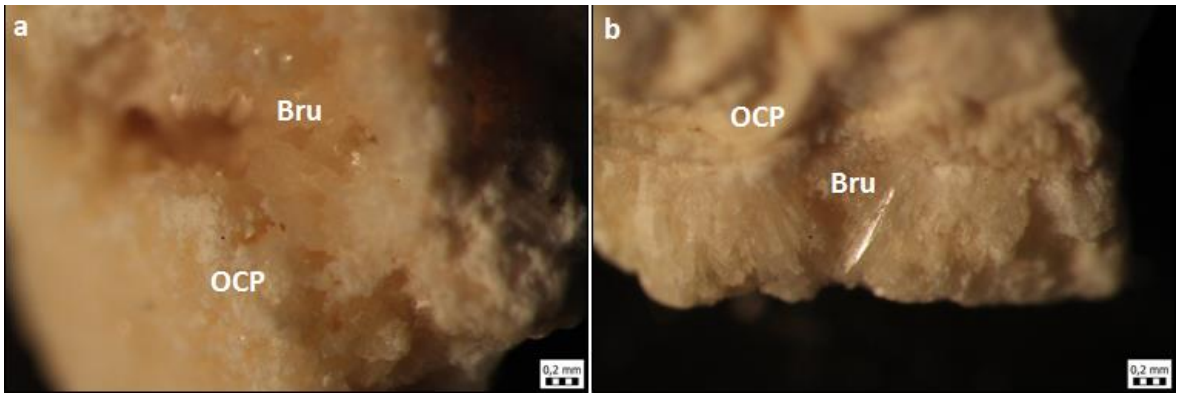
Bubrežni kamenac K 6 (hidroksilapatit)



Slika 10.1.5.a) Kamenac od hidroksilapatita (Hap) promatran pod lupom; b) uvećan prikaz površine kamenca s vidljivom laminacijom

Na slici 10.1.5.a vidljiva je laminarna građa karakteristična za aptitne bubrežne kamence i organska tvar prisutna u unutrašnjosti kamenca. Apatit se u bubrežnim kamencima može javiti i kao staklasti žuto-smeđi materijal sa koncentričnim laminacijama (slika 10.1.5.b).

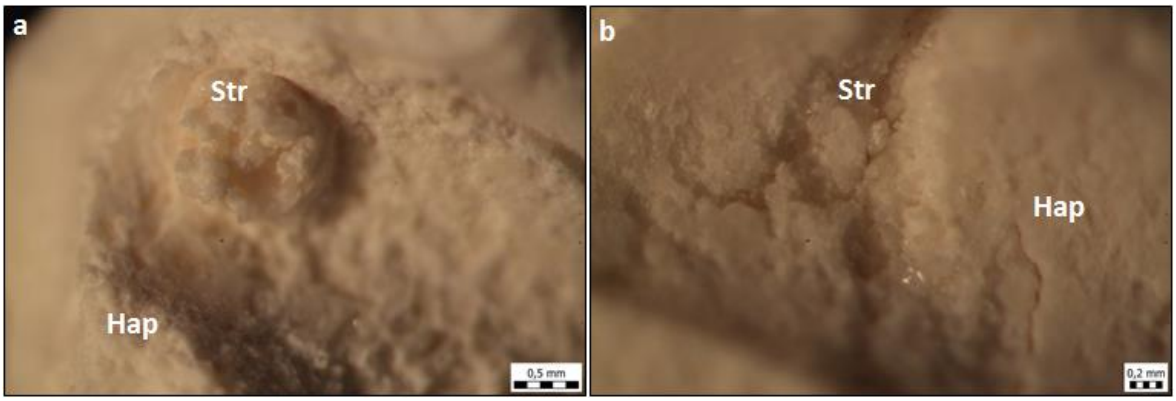
Bubrežni kamenac OS 8 (brushit, kalcij hidrogenfosfat hidrat (OCP, oktakalcij fosfat))



Slika 10.1.6.a) Prikaz prozirnih kristala brushita (Bru) u unutrašnjem dijelu kamenca i uz vanjski rub; b) bijeli agregati kalcij hidrogenfosfat hidrata (OCP)

Na ovom uzorku vidljivi su i radijalno raspoređeni kristali brushita u unutrašnjosti (slika 10.1.6.a) i uz vanjski rub samog kamenca (slika 10.1.6.b) te bijeli praškasti agregati oktakalcij fosfata.

Bubrežni kamenac Os 10 (hidroksilapatit, struvit)

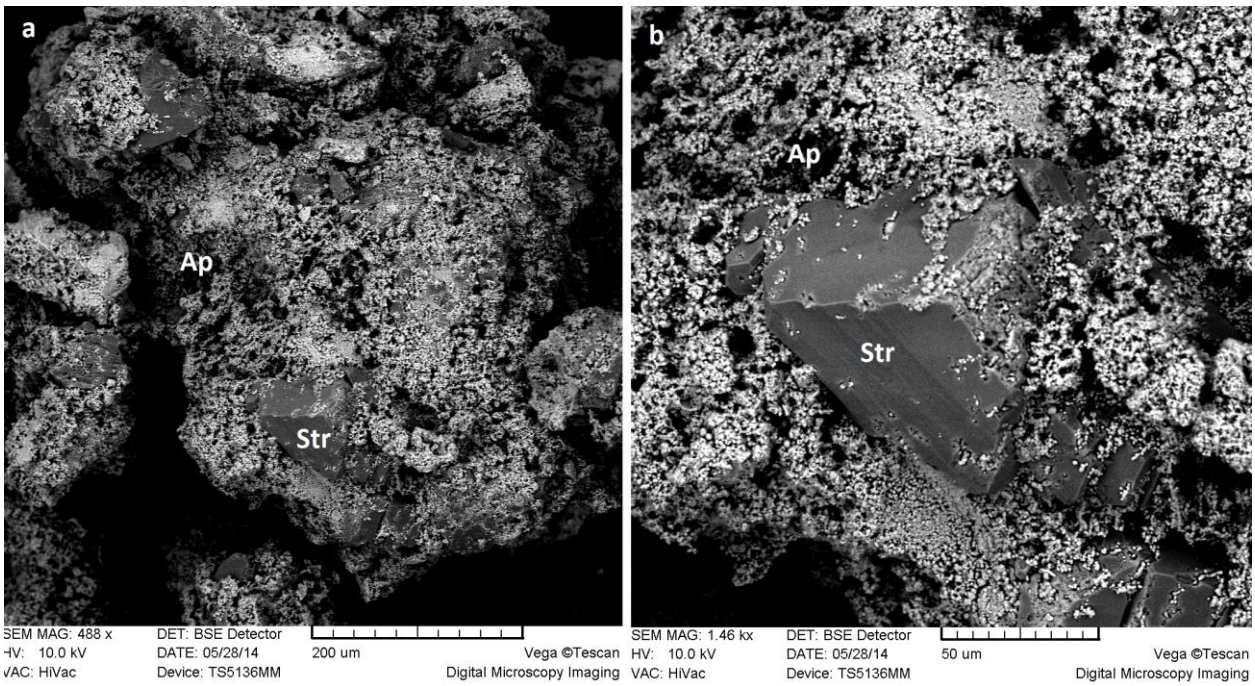


Slika 10.1.7.a) i b) Kamenac od hidroksilapatita (Hap) i struvita (Str) promatran pod lupom

Korištenjem većeg povećanja na lupi vidljivi su prozirni kristali struvita u obliku sitnih tankih štapića u pukotini (slika 10.1.7.b) kamenca i bijeli praškasti agregati hidroksilapatita (slika 10.1.7.a i b).

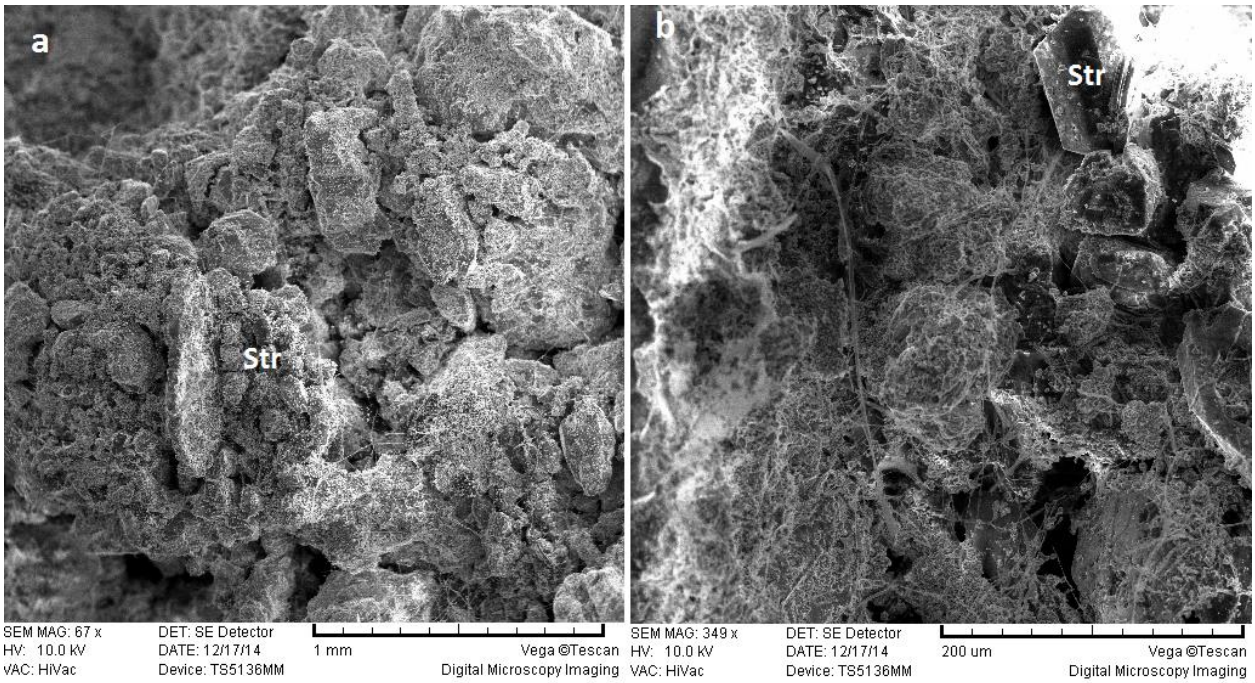
10. 2. Rezultati pretražne elektronske mikroskopije

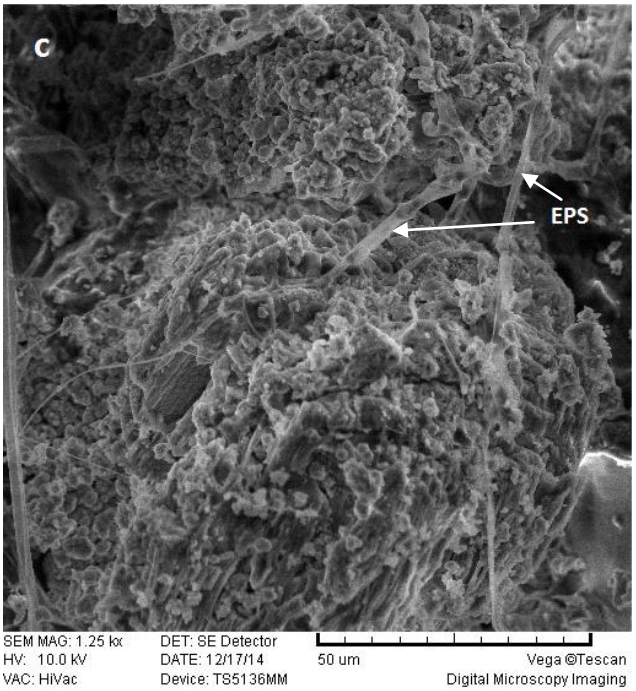
Svi uzorci na elektronskom mikroskopu snimljeni su na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



Slika 10.2.1.a) i b) Kristali struvita (Str) i apatita (Ap); uzorak K 1

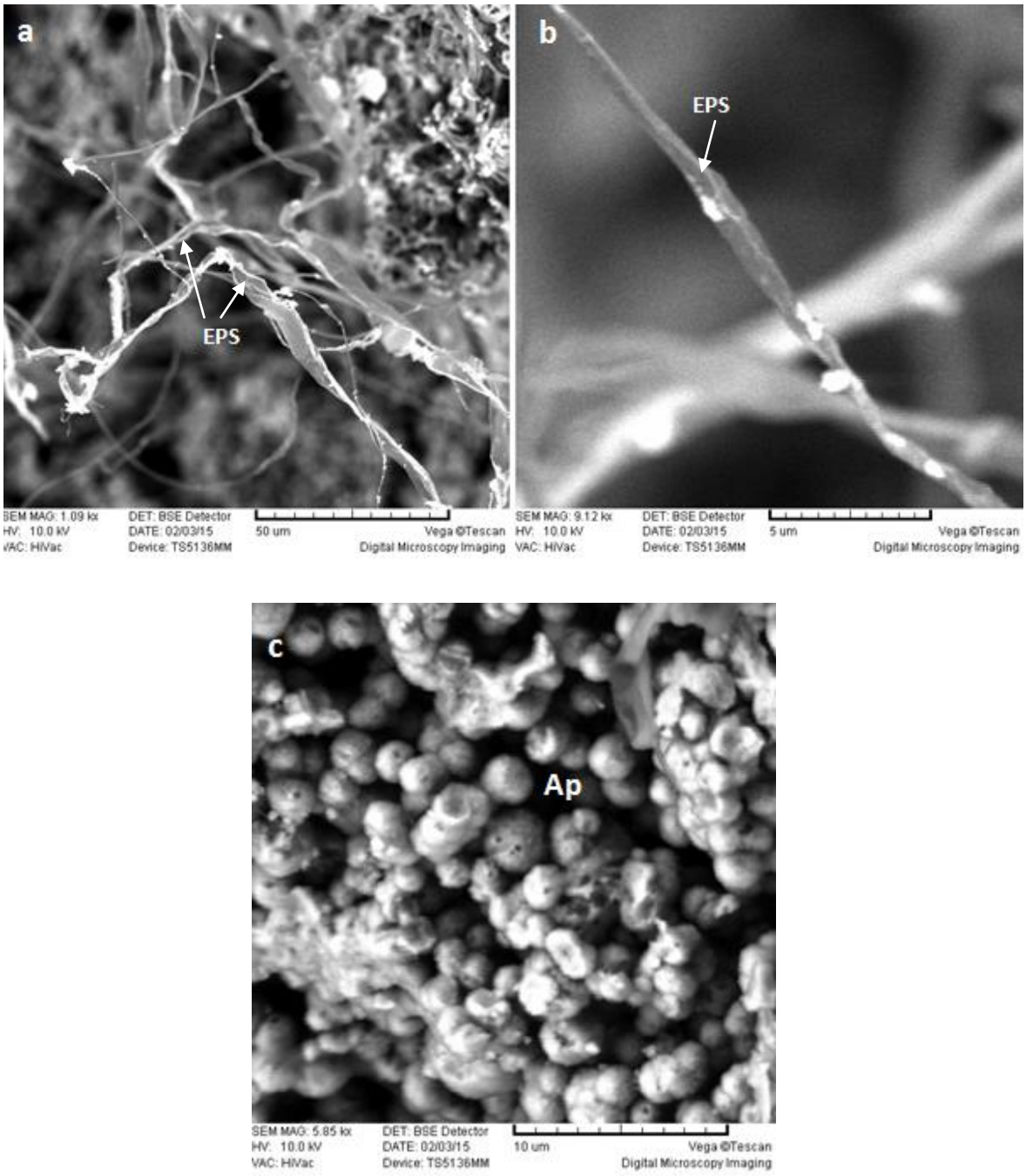
Na slici 10.2.1.a) vide se kristali struvita prepoznatljivog habitusa koji su okruženi sitnim sferulama apatita. Vidljiva poroznost na kristalima struvita može biti posljedica djelovanja mikroorganizama (slika 10.2.1.b). Kristali struvita su relativno veliki, oko 80 µm, u odnosu na apatitne sferule veličine 1,5-2 µm.





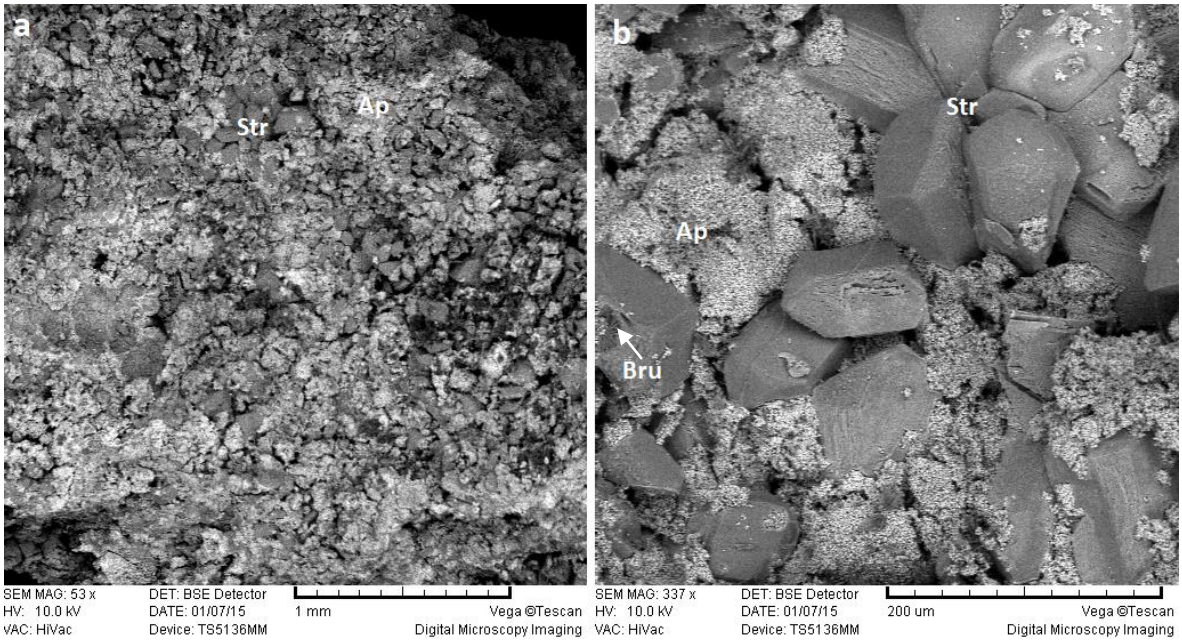
Slika 10.2.2.a) i b) Nakupine velikih kristala struvita (Str) u bakterijskom biofilmu; c) uvećan prikaz biofilma s ekstracelularnim polisaharidima (EPS); uzorak OS 1

Na slici 10.2.2.a i b vide se kristali struvita sa svojim karakterističnim formama, a na većem povećanju (slika 10.2.2.c) dobro su vidljivi bakterijski biofilmovi i ekstracelularni polisaharidi (EPS).



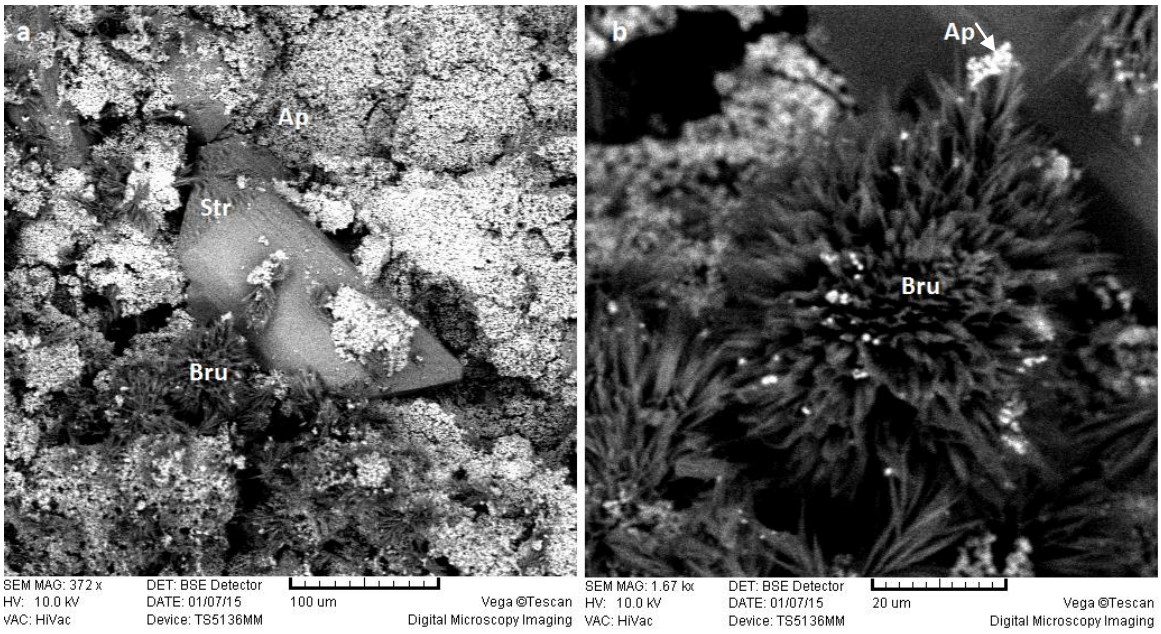
Slika 10.2.3.a) i b) Prikaz.ekstracelulernih polisaharida (EPS) u obliku nitastih cjevčica u biofilmu; c) prikaz apatitne faze (Ap) u obliku sitnih sferula; uzorak OS 1

Na slici 10.2.3.a i b vidljiv je uvećani dio biofilma koji predstavlja zajednicu mikroorganizama koji su ireverzibilno povezani sa površinom. Takav matriks može „zarobiti“ i druge mikrobe i ne-celularni materijal poput minerala, kristala. Na slici 10.2.3.b vidi se apatit u obliku sferula veličine 1-2 µm koji u takvom obliku često dolazi u asocijaciji sa struvitnim, tj.infektivnim kamencima.



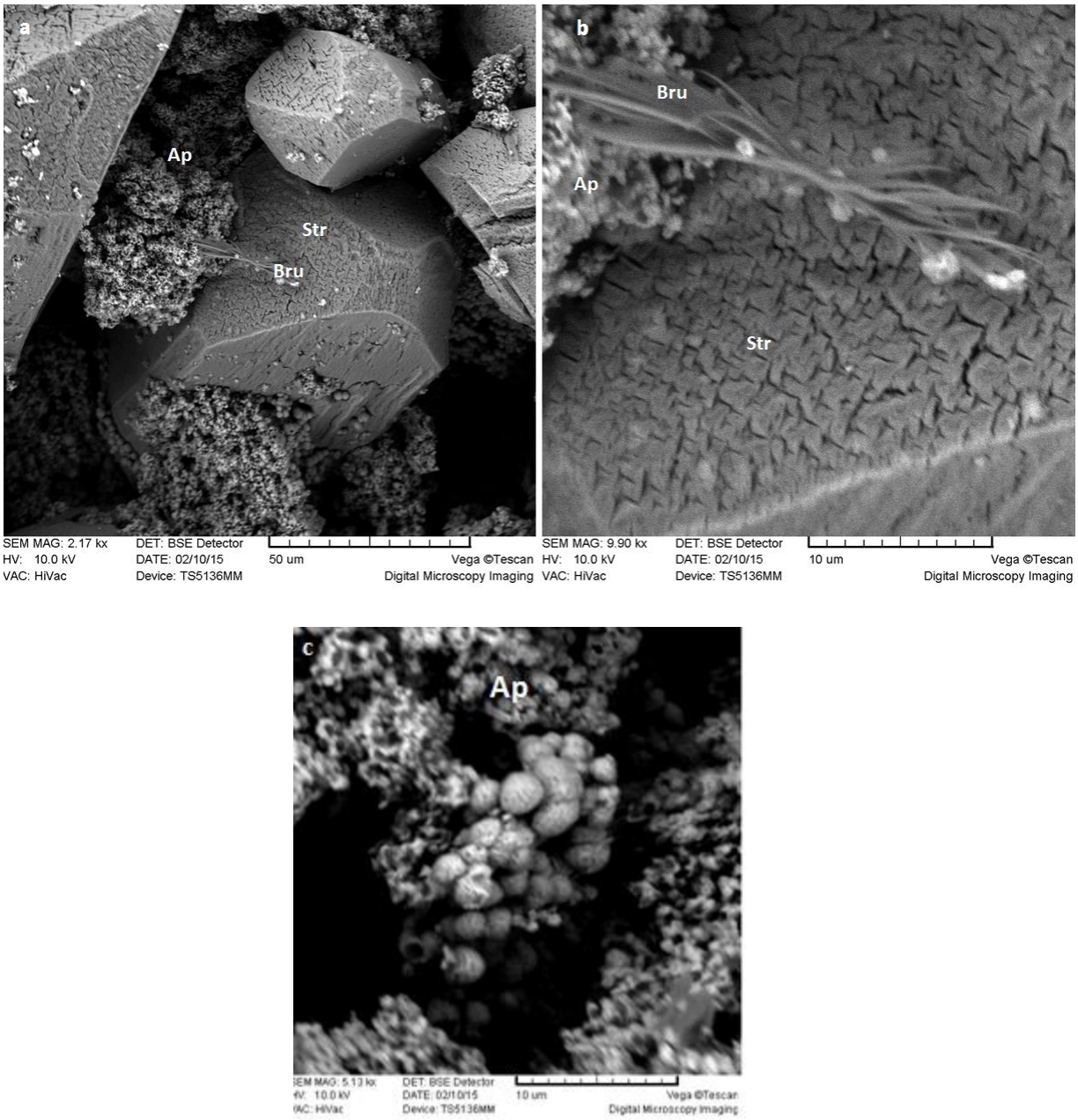
Slika 10.2.4.a) i b) Nakupine velikih kristala struvita (Str) i sitnih sferula apatita (Ap); uzorak OS 6

Na slici 10.2.4.a i b vidljiva je prisutnost tri različite mineralne komponente: karakteristični kristali struvita, apatitna komponenta i kristal brushita (Bru) označen strelicom na slici 10.2.4.b, koji se nalazi na kristalu struvita. Vidljiva je i poroznost na pojedinim kristalima struvita.



Slika 10.2.5.a) Uvećan prikaz kristala struvita (Str), brushita (Bru) i apatita (Ap); b) uvećani prikaz kristala brushita; uzorak OS 6

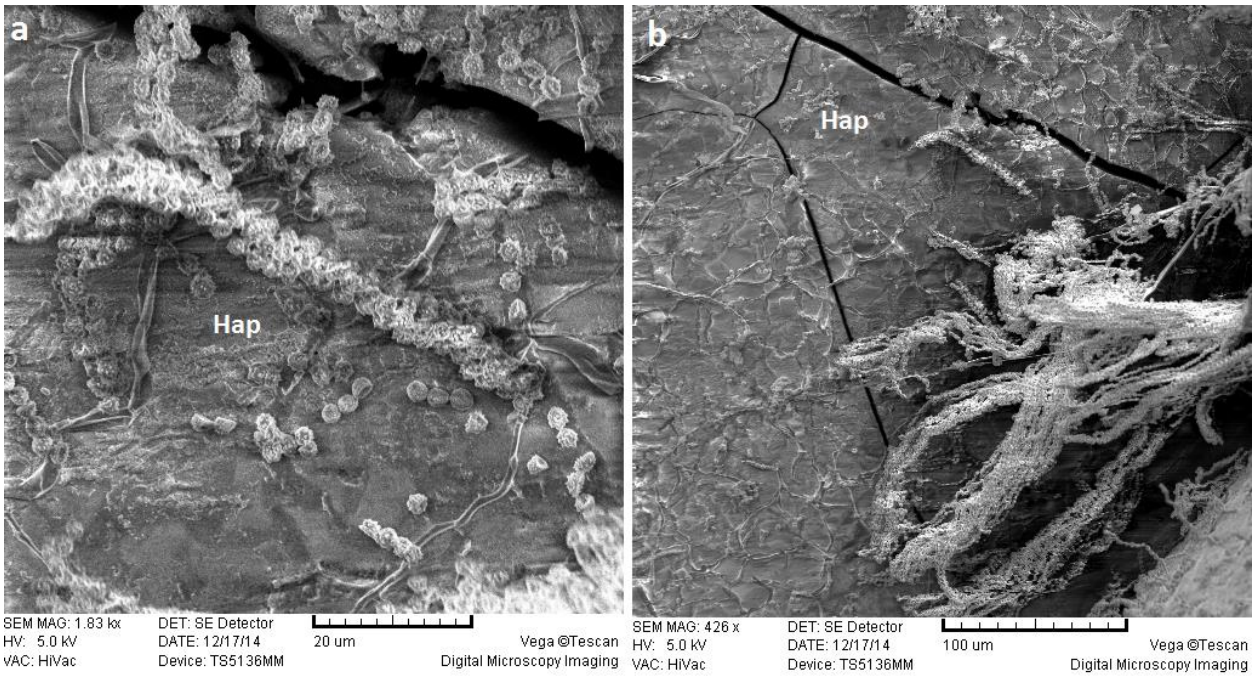
Na slici 10.2.5.a) vidljivi su karakteristični kristali struvita i brushita koji se nalaze u asocijaciji s apatitnom u obliku sitnih sferula; b) uočeni su radijalno raspoređeni kristali brushita u vidu sitnih, tankih dlačica.



Slika 10. 2.6.a) Prikaz kristala brushita (Bru); b) uvećan prikaz brushita na površini struvita (Str); c) uvećan prikaz sitnih sferula apatita (Ap); OS 6

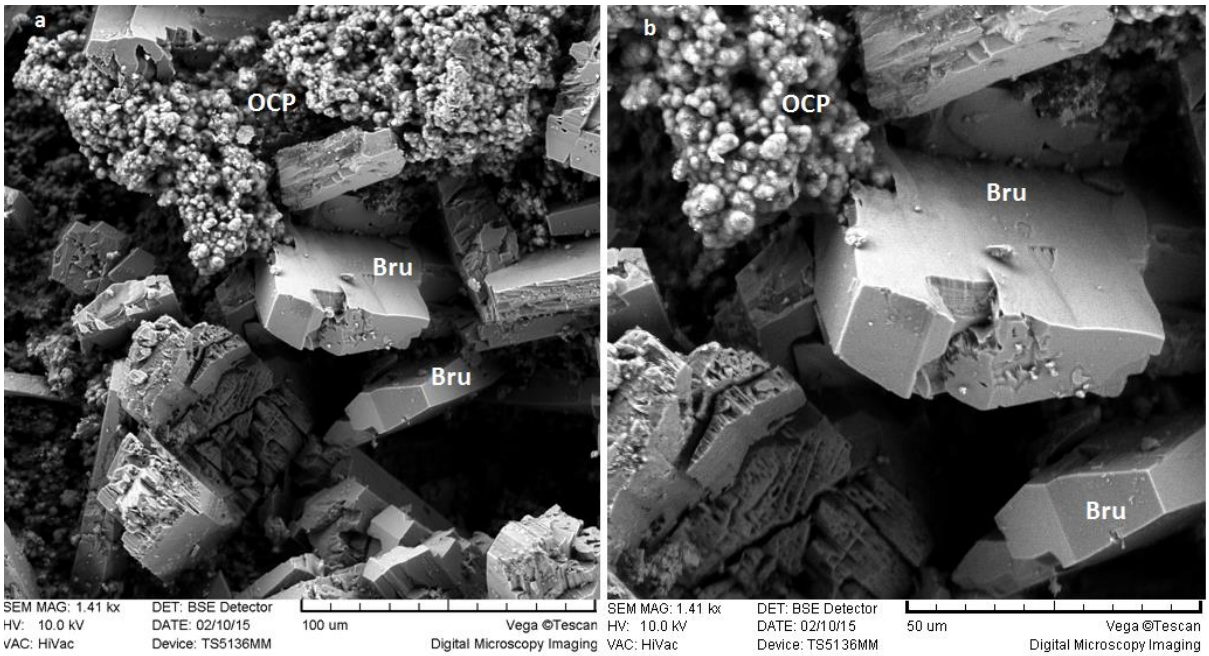
Na slici 10.2.6.a) vidljivi su veliki kristali struvita s lijepo razvijenim formama, na pojedinim plohama vide se pukotine. Na slici 10.2.6.b) vidljivi su kristali brushita s karakerističnim

kristalima u obliku iglica ili dlačica, na plohi struvitnog kamenca. Na slici 10.2.6.c) vidljive su sitne sferule apatita veličine 1-2 µm koje se nalaze na obje mineralne komponente, na struvitu i na brushitu.



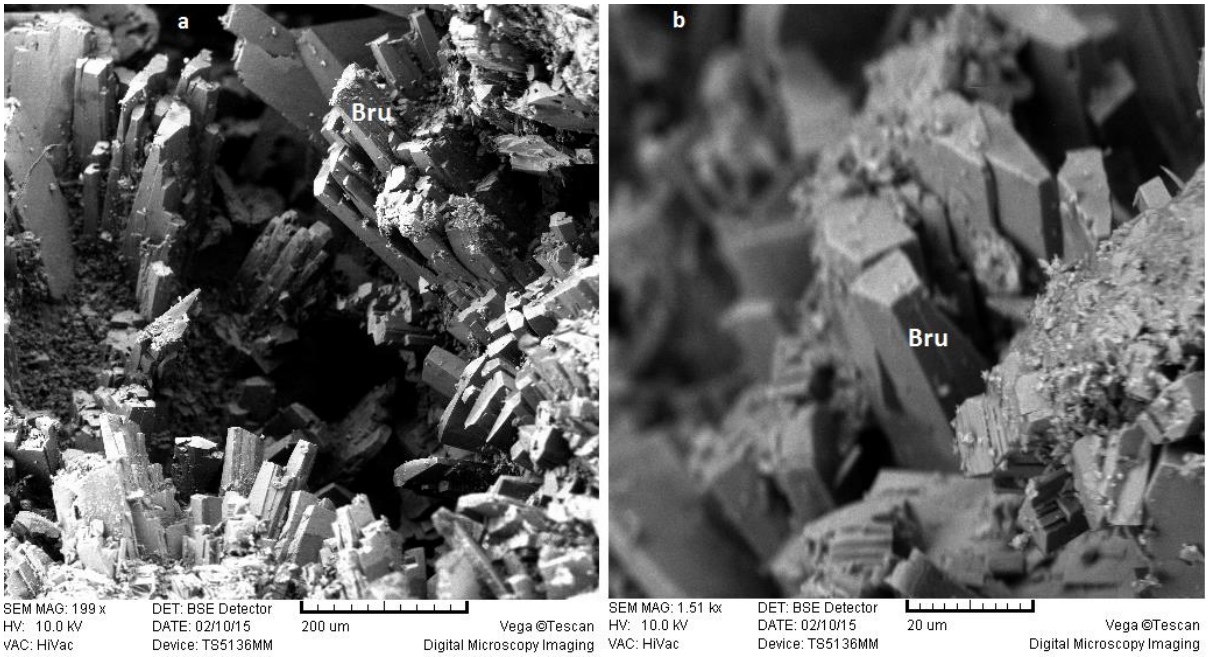
Slika 10.2.7.a) i b) Nakupine bakterija vidljive na površini kamenca građenog od hidroksilapatita (Hap); uzorak K 6

Na slici 10.2.7.a i b vide se nakupine sferičnih bakterija promjera 2 µm koje se na površini kamenca od apatita nakupljaju u obliku lanaca.

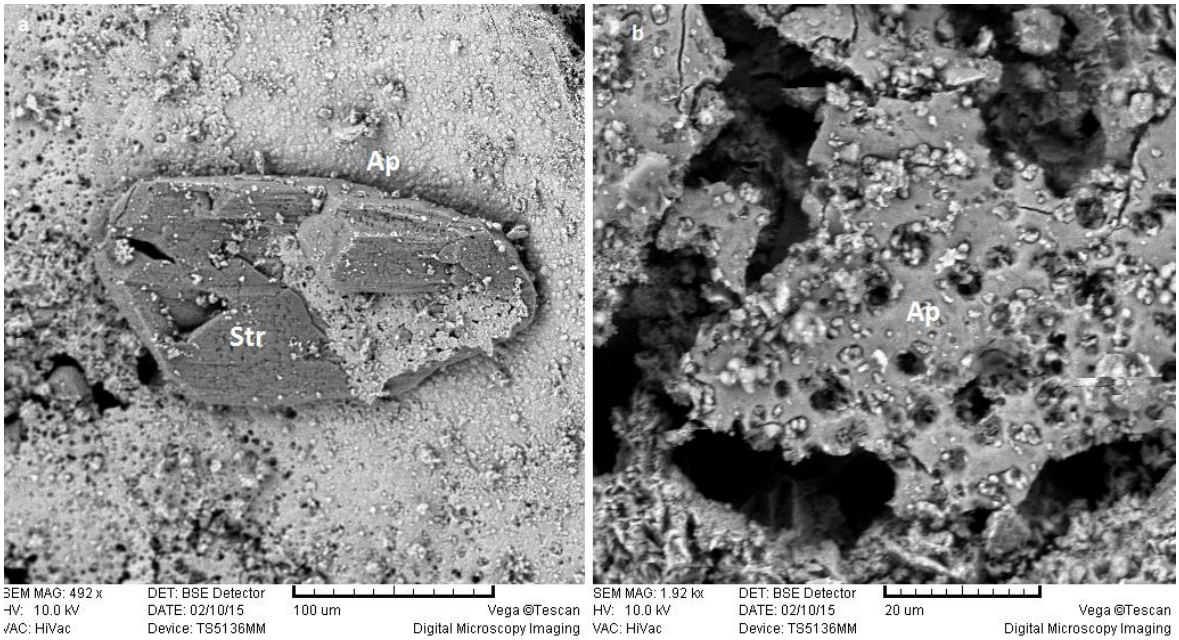


Slika 10.2.8.a) i b) Kristali brushita (Bru) i sitne sferule oko samih kristala (OCP-oktakalcij fosfat); uzorak OS 8

Vidljivi su pločasti, monoklinski kristali brushita veličine 50 µm i sitne sferule oktakalcij fosfata (slika 10.2.8.a i b) koje ih okružuju, a na slici 10.2.9.a i b su vidljivi štapićasti monoklinski kristali brushita.

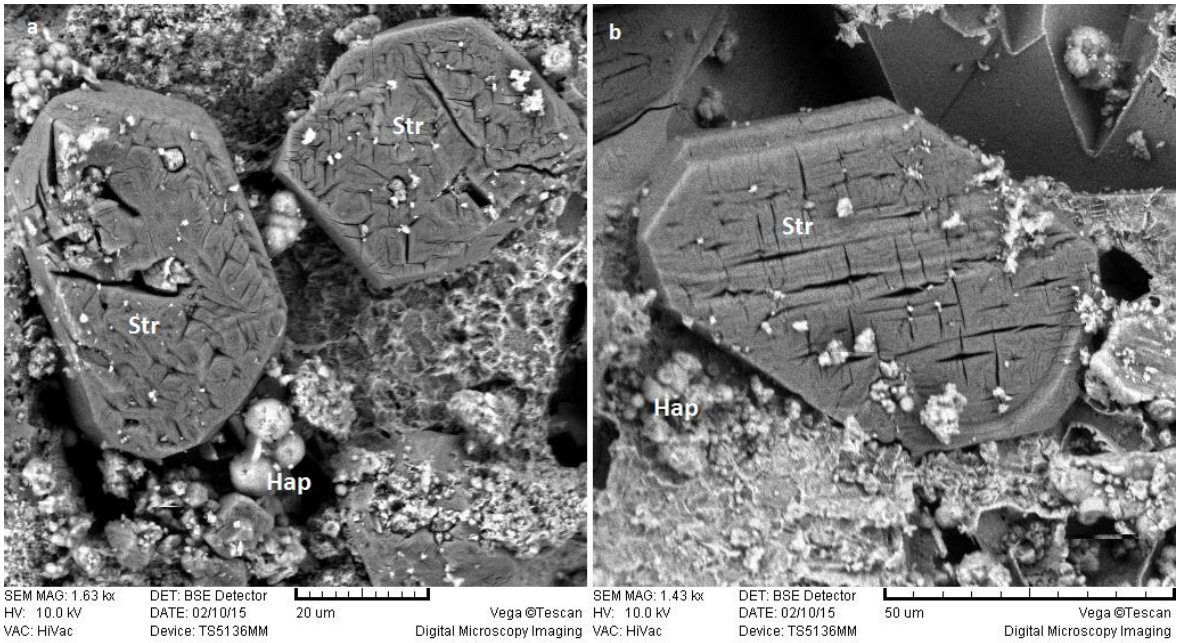


Slika 10.2.9.a i b Kristali brushita (Bru),uzorak OS 8



Slika 10.2.10.a) Prikaz kristala struvita (Str) i druge mineralne komponente-apatita (Ap); b) uvećan prikaz apatitne komponente; uzorak OS 10

Na slici 10.2.10.a vidi se kristal struvita u apatitnoj osnovi, a na slici 10.2.10.b uvećan prikaz apatita u obliku šupljikavih korica.



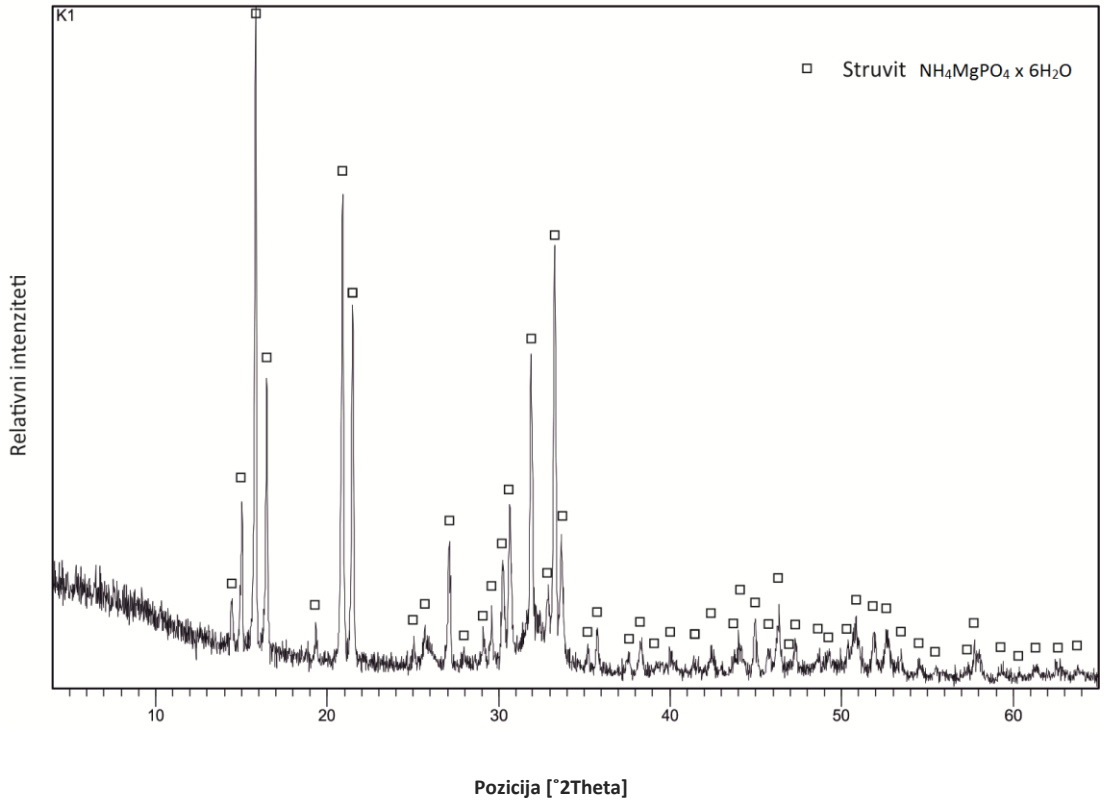
Slika 10.2.11.a) i b) Prikaz kristala struvita (Str) i hidroksilapatita (Hap); uzorak OS 10

Na slici 10.2.11.a) i b) vidljivi su veliki kristali struvita s lijepo razvijenim formama i izraženim pukotinama te apatit u obliku sferula u asocijaciji sa struvitom.

10. 3. Rezultati XRD analize

Svi uzorci snimljeni su rentgenskom difrakcijom na prahu (XRD metodom) na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak K 1 prikazani su u tablici 10.3.1. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 1).



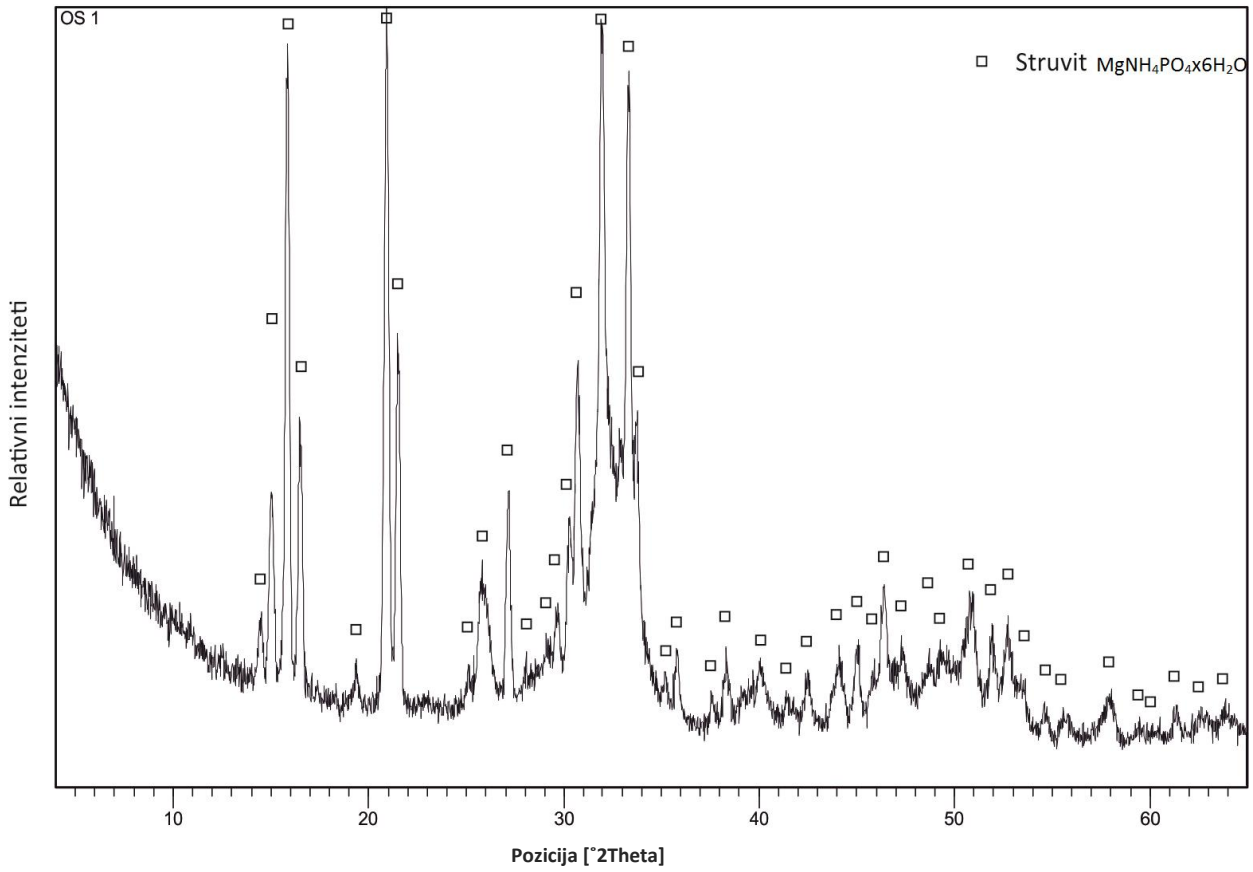
Slika 10.3.1. Difraktogram praha uzorka K 1

Dobiveni difraktogram uzorka K 1 (slika 10.3.1.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te svi analizirani relativni intenziteti odgovaraju struvitu.

Tablica 10.3.1. Rezultati XRD analize za uzorak K 1 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
00-015-0762	Struvit	NH_4MgPO_4 x $6H_2O$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak OS 1 prikazani su u tablici 10.3.2. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 2).



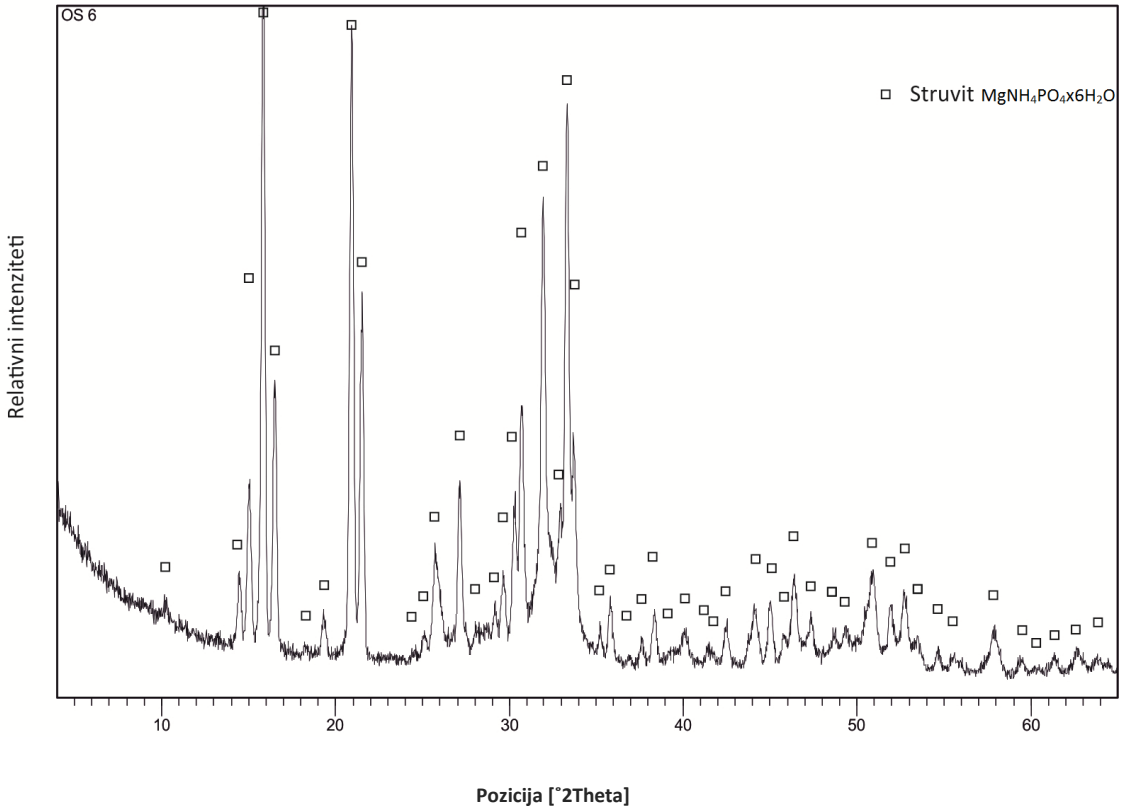
Slika 10.3.2. Difraktogram praha uzorka OS 1

Dobiveni difraktogram uzorka OS 1 (slika 10.3.2.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te svi analizirani relativni intenziteti odgovaraju struvitu.

Tablica 10.3.2. Rezultati XRD analize za uzorak OS 1 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
01-077-2303	Struvit	$MgNH_4PO_4$ x $6H_2O$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak OS 6 prikazani su u tablici 10.3.3. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 3).



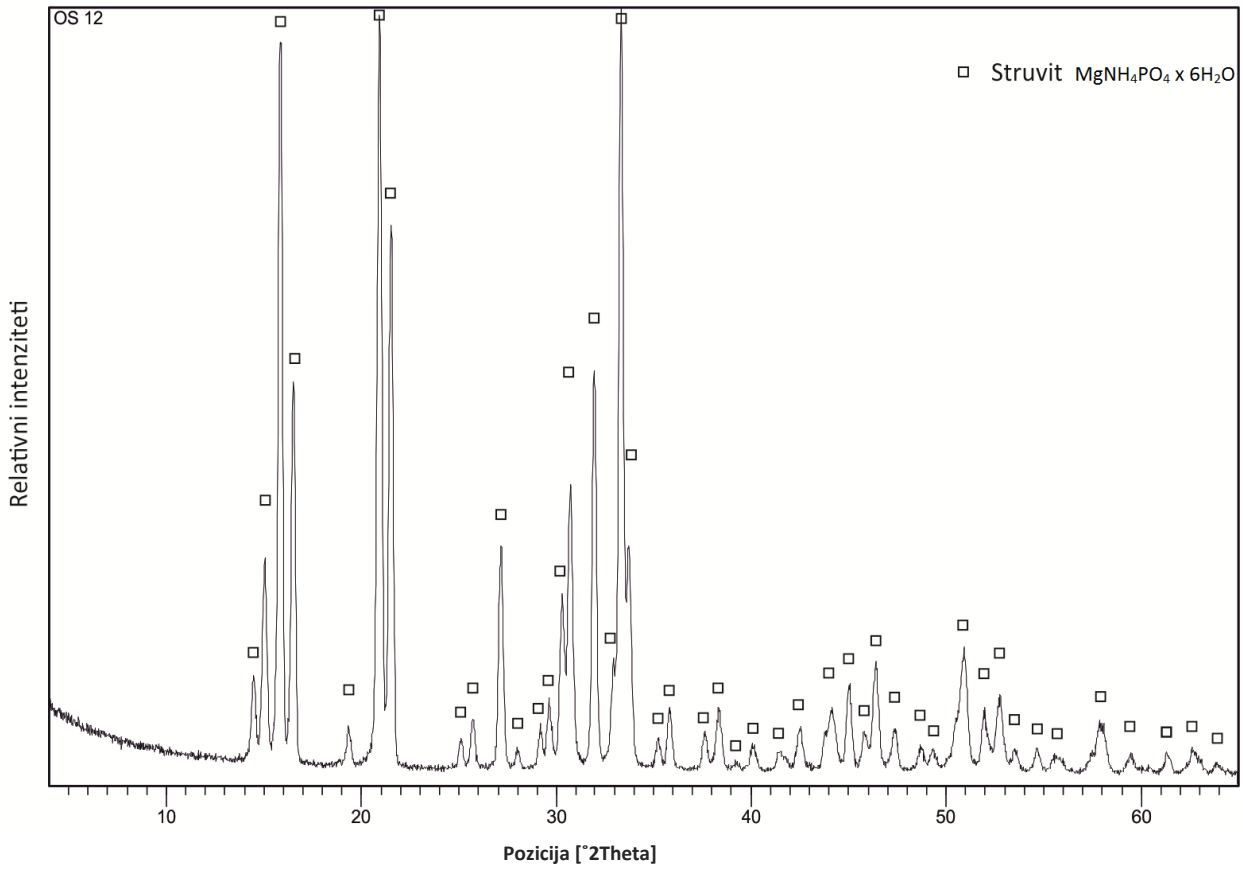
Slika 10.3.3. Difraktogram praha uzorka OS 6

Dobiveni difraktogram uzorka OS 6 (slika 10.3.3.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te svi analizirani relativni intenziteti odgovaraju struvitu.

Tablica 10.3.3. Rezultati XRD analize za uzorak OS 6 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
01-071-2089	Struvit	$MgNH_4PO_4 \times 6H_2O$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak OS 12 prikazani su u tablici 10.3.4. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 4).



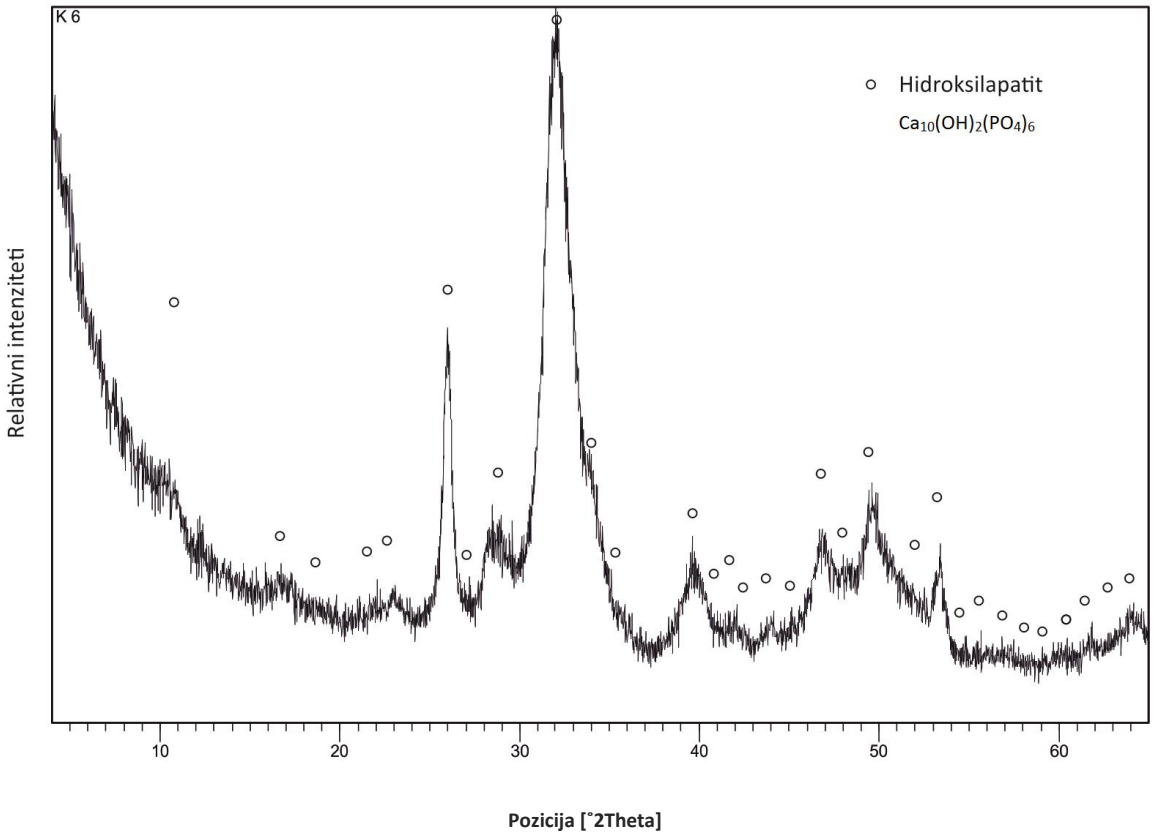
Slika 10.3.4. Difraktogram praha uzorka OS 12

Dobiveni difraktogram uzorka OS 10 (slika 10.3.4.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te analizirani relativni intenziteti odgovaraju struvitu.

Tablica 10.3.4. Rezultati XRD analize za uzorak OS 12 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
01-077-2303	Struvit	$MgNH_4PO_4 \times 6H_2O$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak K 6 prikazani su u tablici 10.3.5. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 5).



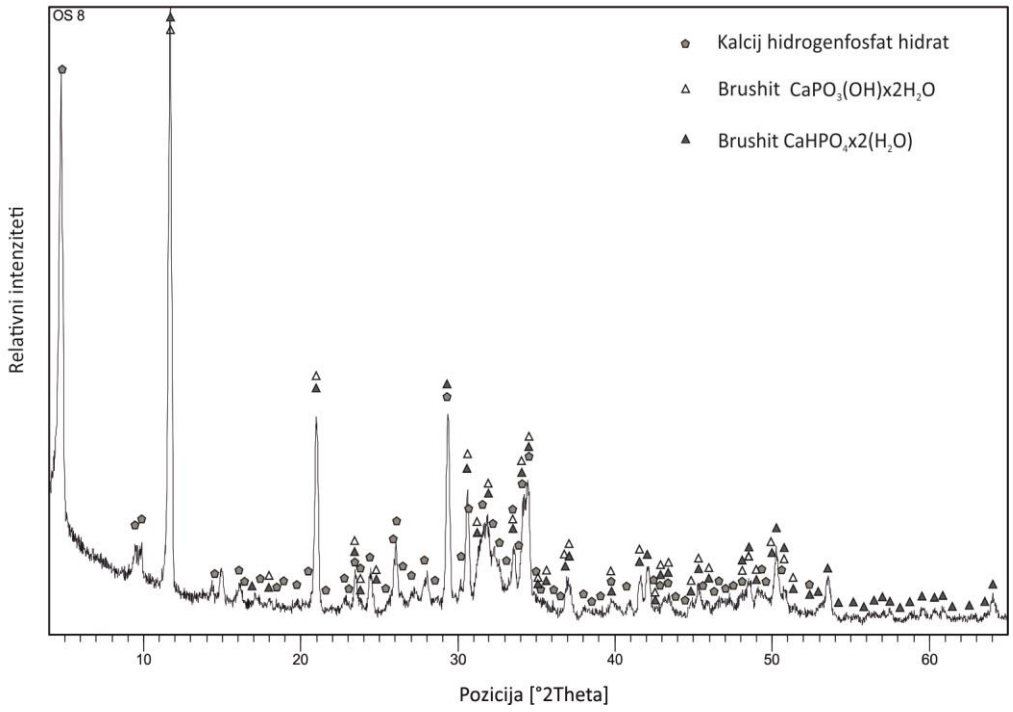
Slika 10.3.5. Difraktogram praha uzorka K 6

Dobiveni difraktogram uzorka K 6 (slika 10.3.5.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te svi analizirani relativni intenziteti odgovaraju hidroksilapatitu.

Tablica 10.3.5. Rezultati XRD analize za uzorak K 6 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
00-001-1008	Hidroksilapatit	$Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak OS 8 prikazani su u tablici 10.3.6. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 6).



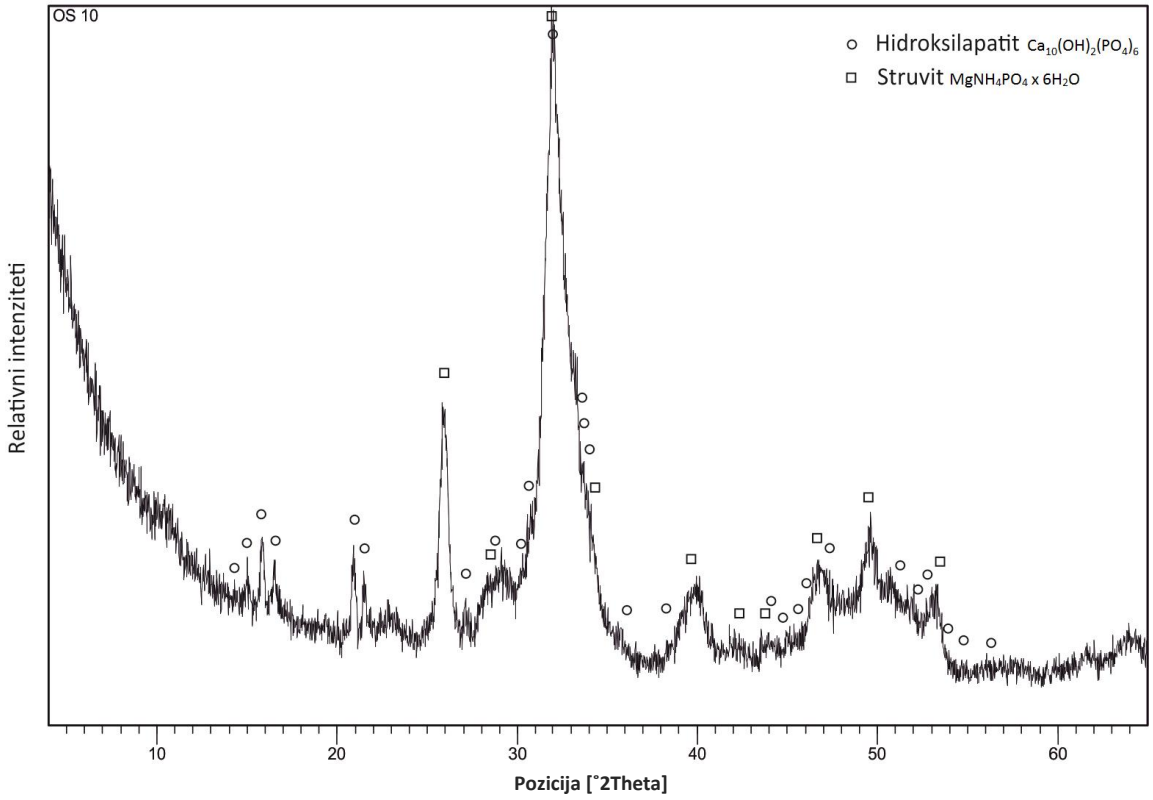
Slika 10.3.6. Difraktogram praha uzorka OS 8

Dobiveni difraktogram uzorka OS 8 (slika 10.3.6.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te analizirani relativni intenziteti odgovaraju brushitu i kalcij hidrogenfosfat hidratu.

Tablica 10.3.6. Rezultati XRD analize za uzorak OS 8 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
01-072-1240	Brushit	$CaHPO_4 \times 2(H_2O)$
00-009-0077	Brushit	$CaPO_3(OH) \times 2H_2O$
00-026-1056	Kalcij hidrogenfosfat hidrat	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \times 5H_2O$

Rezultati dobiveni XRD analizom za uzorak OS 10 prikazani su u tablici 10.3.7. (detaljniji podaci XRD analize su u prilogu 7).



Slika 10.3.7. Difraktogram praha uzorka OS 10

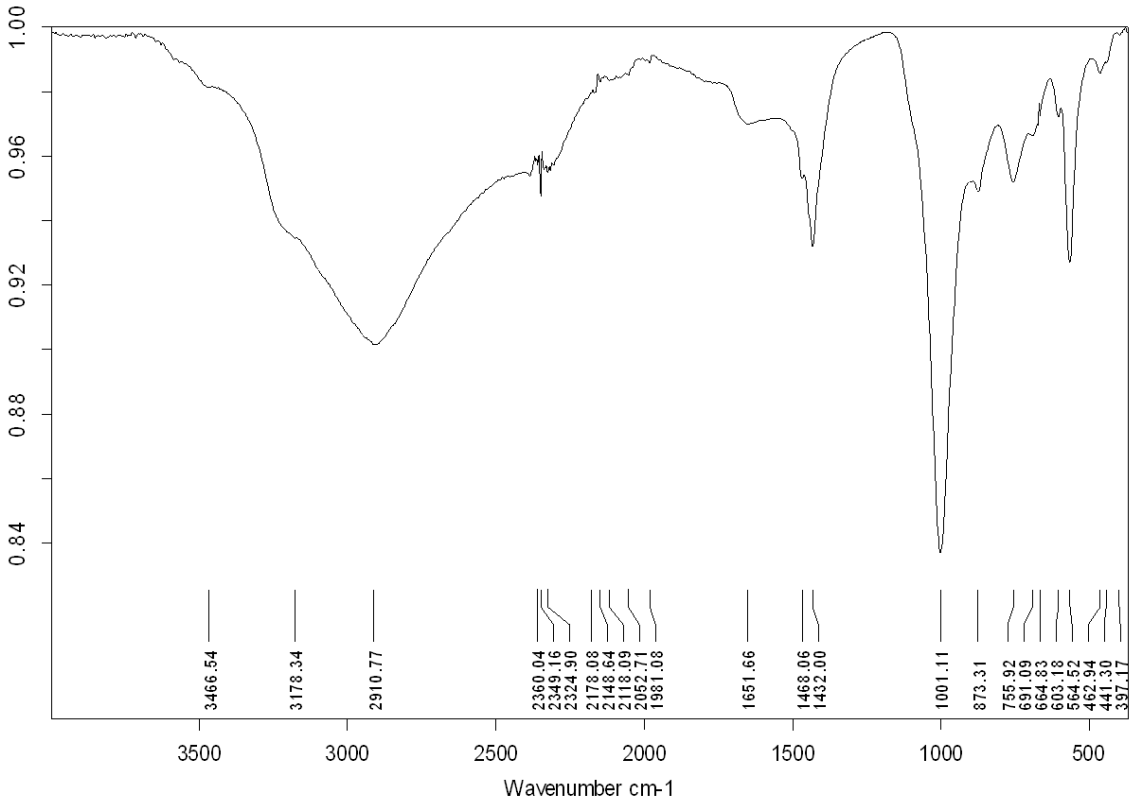
Dobiveni difraktogram uzorka OS 10 (slika 10.3.7.) analiziran je pomoću programa *X'Pert High Score Plus* te analizirani relativni intenziteti odgovaraju hidroksilapatitu i struvitu.

Tablica 10.3.7. Rezultati XRD analize za uzorak OS 10 dobiveni pomoću programa *X'Pert High Score Plus*.

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
00-001-1008	Hidroksilapatit	$Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$
00-003-0240	Struvit	$MgNH_4PO_4 \times 6H_2O$

10. 4. Rezultati analize IR spektroskopijom

Svi uzorci snimljeni su FTIR spektroskopijom na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



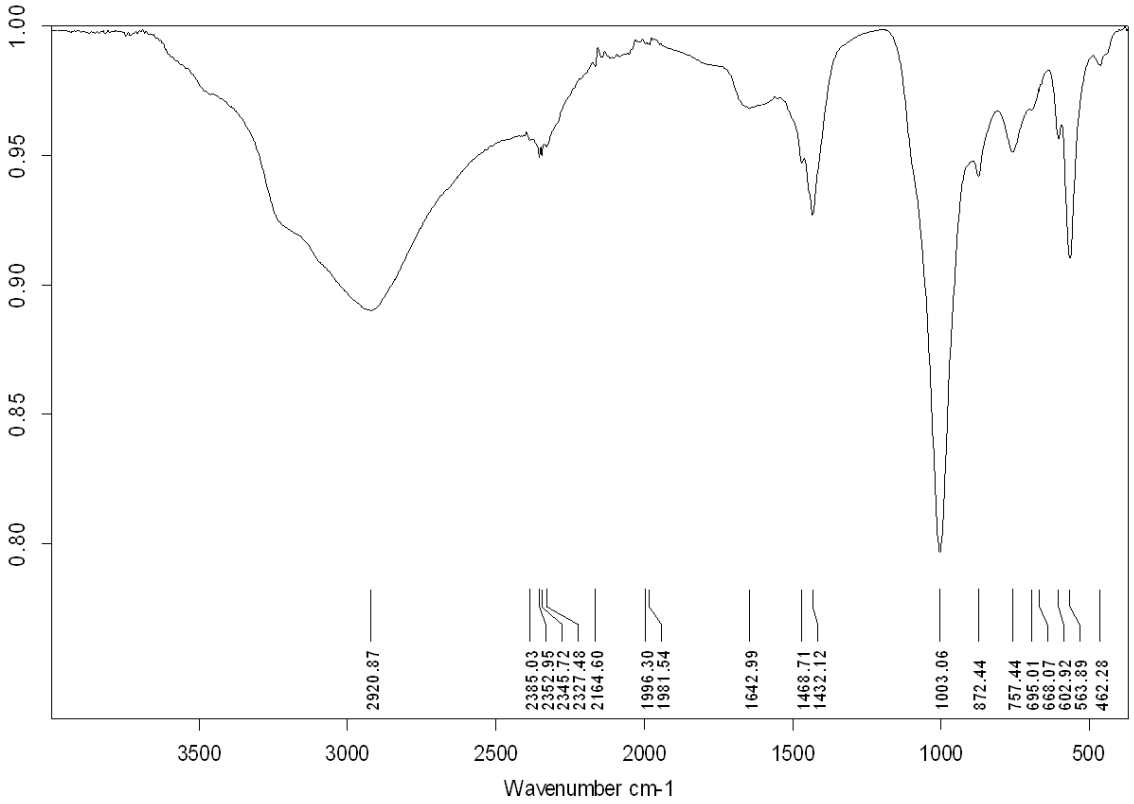
Slika 10.4.1. FTIR spektar bubrežnog kamenca K 1, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca K 1 (slika 10.4.1.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 3178 (istezanje O–H skupine), 2349 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1651, 1432 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1001 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 873 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 755 (C–C istezanje), 564 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Apsorpcija se javlja pri 3466, 3178 i 2910 cm^{-1} zbog O–H i N–H vibracija istezanja (Moenke, 1974). Pikovi oko 2349 cm^{-1} posljedica su istezanja CO_2 iz zraka (zbog

atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi između 2178 i 1981 cm^{-1} s jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Slabi intenzitet na 1651 cm^{-1} i nešto jači intenzitet na 1432 cm^{-1} dolaze od istezanja CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 1001 cm^{-1} upućuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabog intenziteta na 873 cm^{-1} (Popescu *et al.*, 2010) odgovara istezanju HPO_4^{2-} skupine. Slabi intenzitet na 755 cm^{-1} upućuje na C–C istezanje kalcijevog oksalata (Gianossi *et al*., 2012), dok oštra apsorpcijska vrpca slabijeg intenziteta na 564 cm^{-1} odgovara istezanju PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).



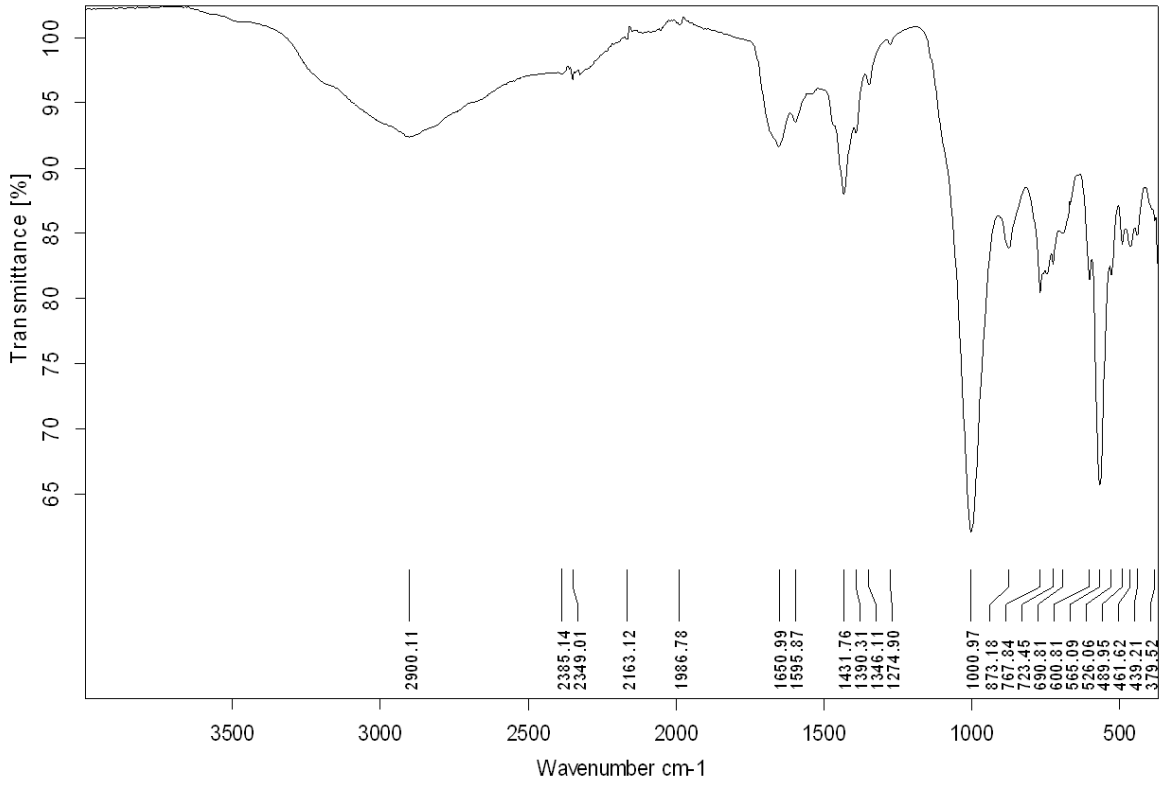
Slika 10.4.2. FTIR spektar bubrežnog kamenca OS 1, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca OS 1 (slika 10.4.2.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 2920 (istezanje O–H skupine), 2345 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1642 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1432 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1003 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 872 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 757 (C–C istezanje), 563 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Široka apsorpcijska vrpca javlja se pri 2920 cm^{-1} zbog O–H i N–H vibracija istezanja (Moenke, 1974). Pik na 2345 cm^{-1} je posljedica istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi između 2164 i 1981 cm^{-1} s jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Slab intenzitet na 1642 cm^{-1} i na 1432 cm^{-1} dolazi od istezanja CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 1003

cm^{-1} i slaba apsorpcijska vrpca na 872 cm^{-1} upućuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Slabi intenzitet na 757 cm^{-1} upućuje na C–C istezanje kalcijevog oksalata (Gianossi *et al*., 2012), dok oštra apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta na 563 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).

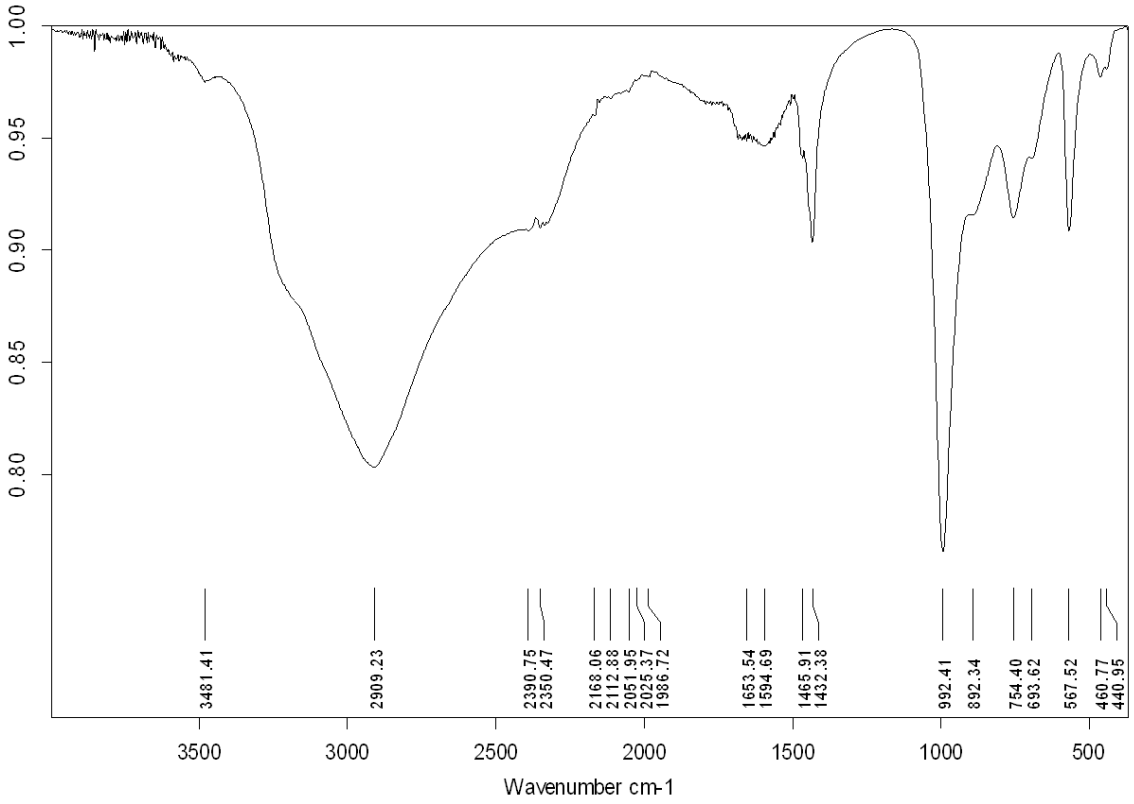


Slika 10.4.3. FTIR spektar bubrežnog OS 6, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca OS 6 (slika 10.4.3.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 2900 (istezanje O–H skupine), 2349 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1650 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1431 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1000 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 873 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 767 (C–C istezanje), 565 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Apsorpcijska vrpca pri 2900 cm^{-1} javlja se zbog O–H i N–H vibracija istezanja (te dvije vrpce se poklapaju, ali NH_4^+ se ne vidi jer je puno slabijeg intenziteta) (Moenke, 1974). Pik na 2349 cm^{-1} posljedica je istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi na 2163 i 1986 cm^{-1} s jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Slabi intenziteti na 1650 cm^{-1} i 1431 cm^{-1} dolaze od istezanja CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 1000 cm^{-1} upućuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabog intenziteta na 873 cm^{-1} (Popescu *et al.*, 2010) odgovara istezanju HPO_4^{2-} skupine. Slabi intenzitet na 767 cm^{-1} upućuje na C–C istezanje kalcijevog oksalata (Gianossi *et al*., 2012), dok oštra apsorpcijska vrpca jakog intenziteta na 565 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).



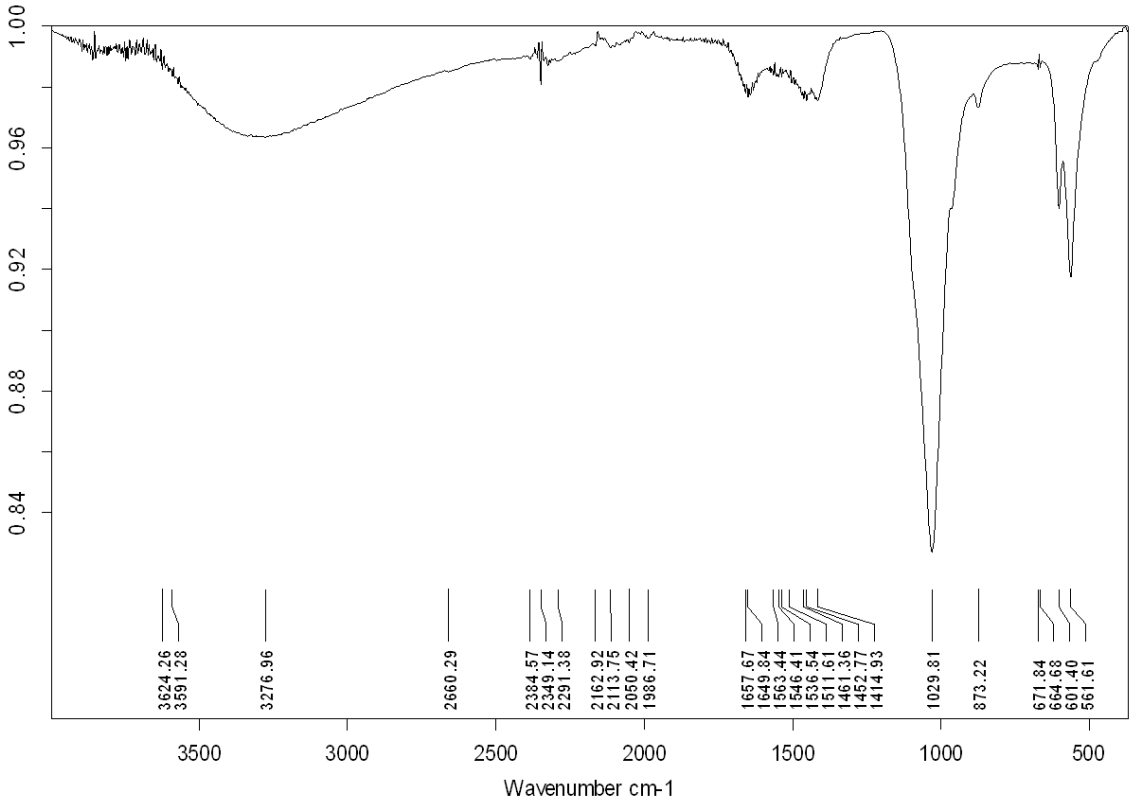
Slika 10.4.4. FTIR spektar bubrežnog OS 12, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca OS 12 (slika 10.4.4.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 2909 (O–H istezanje), 2390 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1594 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1432 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 992 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 892 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 754 (C–C istezanje), 567 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Apsorpcijska vrpca sa pikovima od 3481 i 2909 cm^{-1} javlja se zbog O–H i N–H vibracija istezanja (Moenke, 1974). Pikovi oko 2390 cm^{-1} posljedica su istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi na 2168–1986 cm^{-1} sa jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Slabi intenzitet na 1594 cm^{-1} i slabi do srednji intenzitet na 1432 cm^{-1} ukazuju na istezanje CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 992 cm^{-1} upućuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabog intenziteta na 892 cm^{-1} (Popescu *et al.*, 2010) odgovara

istezanju HPO_4^{2-} skupine prisutne u uzorku. Slabi intenzitet na 754 cm^{-1} upućuje na C–C istezanje iz kalcijevog oksalata (Gianossi *et al*., 2012), dok oštra apsorpcijska vrpca jakog intenziteta na 567 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).



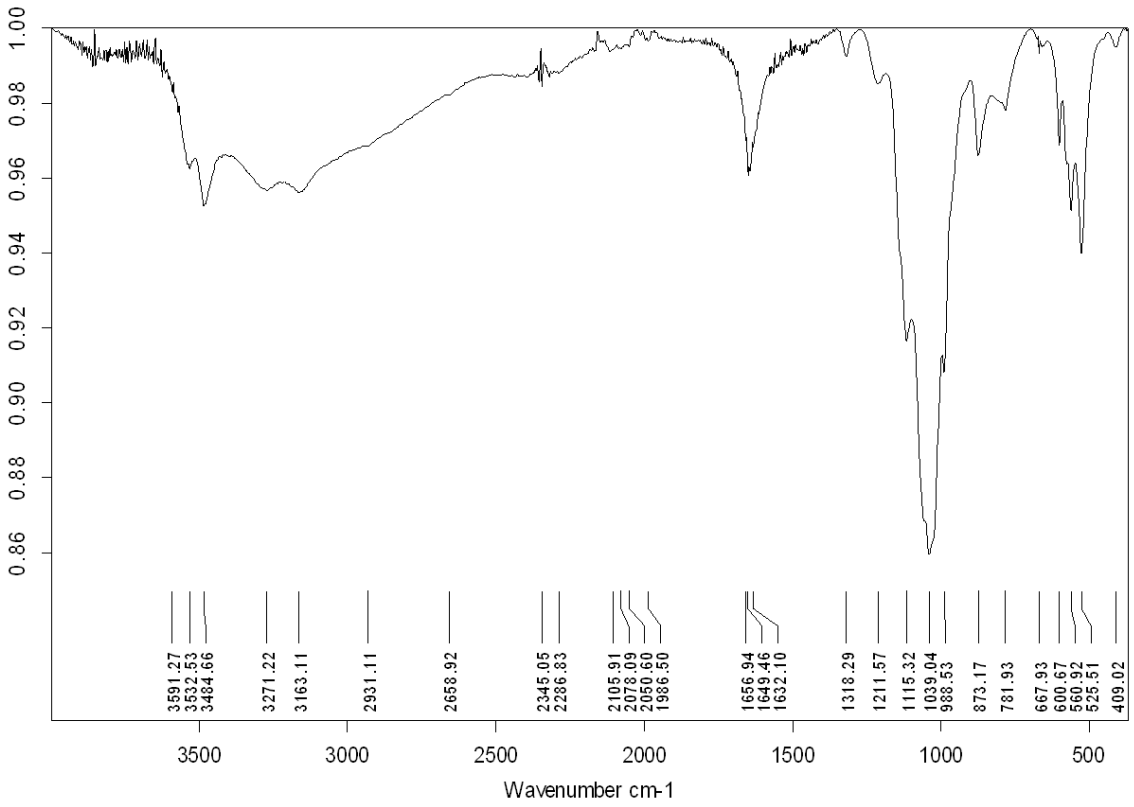
Slika 10.4.5. FTIR spektar bubrežnog kamenca K 6, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca K 6 (slika 10.4.5.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\upsilon}_{max}$ / cm^{-1}: 3276 (O–H istezanje), 2349 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1657 (savijanje molekule vode), 1414 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1029 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 873 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 601 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 561 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Apsorpcijska vrpca pri 3276 cm^{-1} javlja se zbog O–H vibracija istezanja (Moenke, 1974). Pik na 2349 cm^{-1} je posljedica istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom

pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi na 2162–1986 cm^{-1} sa jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Pik slabog intenziteta na 1657 cm^{-1} može se pripisati savijanju molekule vode (Hirsch *et al*., 2014). Pikovi slabih intenziteta na 1414 i 873 cm^{-1} dolaze od istezanja CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 1029 cm^{-1} upućuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabijeg intenziteta na 873 cm^{-1} odgovara istezanju HPO^{2-} skupine prisutne u uzorku (Popescu *et al.*, 2010). Oštra apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta na 601 i 561 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).



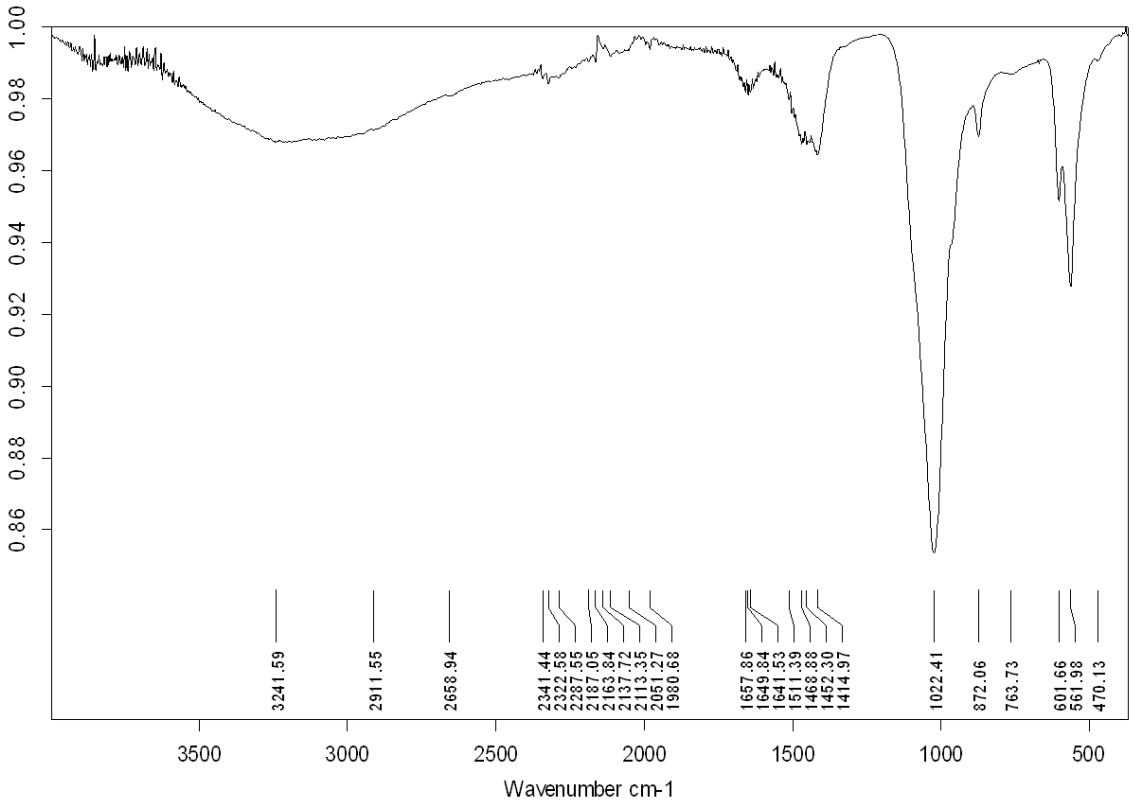
Slika 10.4.6. FTIR spektar bubrežnog OS 8, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca OS 8 (slika 10.4.6.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 3532 (istezanje O–H skupine), 3271 (istezanje O–H skupine), 2345 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1649, (savijanje molekule vode), 1039 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 988 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 873 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 781 (C–C istezanje), 560 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 525 (P–O savijanje).

Pojavljuje se O–H dublet na pikovima oko 3500 cm^{-1} zbog asimetričnih istezanja molekula vode koje su vezane slabim vodikovim vezama. Pikovi ispod 3300 cm^{-1} upućuju na vibraciju istezanja O–H skupine. Pik na 2345 cm^{-1} je posljedica istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi na 2105 i 1986 cm^{-1} sa jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Pik na 1645 cm^{-1} može se pripisati savijanju molekule vode (Hirsch *et al*., 2014). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 988 i 1039 cm^{-1}

upućuju na asimetrično istezanje P–O skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabog intenziteta na 873 cm^{-1} (Popescu *et al.*, 2010) odgovara istezanju HPO_4^{2-} skupine. Slabi intenzitet na 781 cm^{-1} upućuje na C–C istezanje kalcijevog oksalata (Gianossi *et al*., 2012), a oštra apsorpcijska vrpca jakog intenziteta na 560 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010). Srednje jaka apsorpcija na 525 cm^{-1} odgovara istezanju fosfatne skupine.



Slika 10.4.7. FTIR spektar bubrežnog OS 10, snimljen ATR metodom pri sobnim uvjetima. Na osi apscisa prikazan je valni broj (cm^{-1}), a na ordinati relativni intenzitet transmisije.

Asignacijom FTIR spektra bubrežnog kamenca OS 10 (slika 10.4.7.) uočene su karakteristične vibracijske vrpce pojedinih funkcionalnih skupina.

IR (ATR), $\tilde{\nu}_{max}$ / cm^{-1}: 3241 (istezanje NH_4^+), 2911 (istezanje O–H skupine), 2322 (asimetrično istezanje C=O iz zraka), 1649 (savijanje molekule vode), 1452 (istezanje CO_3^{2-} skupine), 1022 (istezanje PO_4^{3-} skupine), 872 (istezanje HPO_4^{2-} skupine), 561 (istezanje PO_4^{3-} skupine).

Apsorpcijska vrpca sa pikovima od 3241 do 2658 cm^{-1} javlja se zbog O–H i N–H vibracija istezanja (Moenke, 1974). Pikovi oko 2322 cm^{-1} posljedica su istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Pikovi na 2187–1980 cm^{-1} s jako slabim intenzitetima pripadaju šumu koji se često javlja zbog nečistoća prisutnih u zraku ili zbog greške instrumenta. Slabi intenziteti na 1657–1641 cm^{-1} mogu se pripisati savijanju molekule vode (Hirsch *et al*., 2014). Slabi intenzitet na 1452 cm^{-1} posljedica je istezanja CO_3^{2-} skupine (Shafaa & Azooz, 2007). Jak intenzitet i oštra apsorpcijska vrpca na 1022 cm^{-1} upućuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (S.D.Ross, 1974). Apsorpcijska vrpca slabog intenziteta na 872 cm^{-1} (Popescu *et al.*, 2010) odgovara istezanju HPO_4^{2-} skupine prisutne u uzorku, a oštra apsorpcijska vrpca jakog intenziteta na 561 cm^{-1} ukazuje na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010).

Tablica 10.3.8. Popis uzoraka i rezultata dobivenih korištenjem elektronske mikroskopije (SEM), rentgenske difrakcije na prahu (XRD) i infracrvene spektroskopije (FTIR).

Oznaka uzorka	**SEM**	**XRD**	**FTIR**
K 1	Struvit, apatit	Struvit	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat
OS 1	Struvit, biofilm	Struvit	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat
OS 6	Struvit, brushit, apatit	Struvit	Struvit, brushit, karbonatni apatit, kalcij oksalat
OS 12	___	Struvit	Struvit, karbonatni apatit, kalcij oksalat
K 6	Hidroksilapatit, bakterije	Hidroksilapatit	Hidroksilapatit, karbonatni apatit
OS 8	Brushit, kalcij hidrogenfosfat hidrat	Brushit, kalcij hidrogenfosfat hidrat	Brushit, kalcij hidrogenfosfat hidrat, kalcijev oksalat
OS 10	Hidroksilapatit, struvit	Hidroksilapatit, struvit	Hidroksilapatit, struvit karbonatni apatit

U tablici 10.3.8. nalazi se popis svih uzoraka na temelju SEM, XRD i FTIR analize, s time da smo XRD analizom dobili podatke o prevladavajućim mineralnim komponentama u uzorku, a SEM i FTIR analizom dobili smo i podatke o mineralnim komponentama koje su u uzorku koje zastupljene s manje od 5%.

11. RASPRAVA

Svi uzorci najprije su promatrani pod svjetlosnim i elektronskim mikroskopom kako bi se dobilo što više informacija o morfologiji, strukturnim obilježjima, laminaciji, radijalnoj strukturi (tablica 9.1.1.) i odnosima tj. prostornom rasporedu pojedinih mineralnih faza u bubrežnim kamencima i njihovim asocijacijama.

Slike bubrežnih kamenaca sastava struvita uzoraka K 1, OS 1, OS 6 i OS 12, dobivene promatranjem uzoraka pod lupom ukazuju na to da su sva četiri kamenca karakterističnog struvitnog izgleda, boje, poroznosti (slike 10.1.1., 10.1.2., 10.1.3., 10.1.4.) te da su vrlo slični. Uzorak OS 10 koji odgovara sastavu hidroksilapatita i struvita sličnog je izgleda kao i prethodni promatrani kamenci (slika 10.1.7.), samo je malo kompaktniji i manje porozan zbog većeg udjela apatitne komponente. U apatitnim bubrežnim kamencima, karbonatna skupina često zamjenjuje fosfatnu, i na taj način tvori mineral koji je relativno slabo kristaliziran. Postotak apatita i struvita u bubrežnim kamencima može varirati od Ap_0 do Ap_{100}, ali najčešće taj omjer ostaje između Ap_{70} i Ap_{30} (Gibson, 1974). Što je veća struvitna komponenta kamenci postaju porozniji, a kristali struvita u agregatima imaju stupičast, ponekad i radijalni raspored. To se najbolje vidi promatranjem uzoraka bubrežnih kamenaca pod lupom. Većina struvitnih kamenaca dosta je porozna i trusi se, što potvrđuje visoki udio struvitne komponente, što smo potvrdili i rezultatima XRD analize i IR spektroskopije. Na uzorku K 6 koji odgovara sastavu hidroksilapatita vidljiva je laminarna građa karakteristična za aptitne bubrežne kamence (Gibson, 1974) i organska tvar prisutna u unutrašnjosti kamenca (slika 10.1.5.a). Površina uzorka prekrivena je staklastim žuto-smeđim materijalom sa koncentričnim laminacijama (slika 10.1.5.b). Promatranjem pod lupom bubrežnog kamenca OS 8 koji odgovara sastavu brushita i kalcij hidrogenfosfat hidrata (točnije oktakalcij fosfatu (OCP), $Ca_8H_2(PO_4)_6$ x $5H_20$), vidljivi su karakteristični monoklinski radijalno raspoređeni štapićasti kristali brushita (Gibson, 1974) u unutrašnjosti (slika 10.1.6.a) i uz vanjski rub samog kamenca (slika 10.1.6.b). Kamenci od brushita nisu kompaktni i sadrže brojne šupljine koje su djelomično ispunjene sferičnim česticama apatita (ili kod uzorka OS 8, oktakalcij fosfatom) i organske tvari (Grases, 1998).

Kao metodu, kojom možemo odrediti morfologiju i prostorni raspored pojedinih faza u bubrežnim kamencima, a u slučaju struvitnih kamenaca vidjeti tragove biomineralizacije uzrokovane djelovanjem bakterija koje su vezane uz urinarne infekcije, korištena je pretražna elektronska mikroskopija (SEM).

Na uzorku bubrežnog kamenca K 1 promatranog pod elektronskim mikroskopom, vidljivi su karakteristični kristali struvita prepoznatljivog habitusa u apatitnom matriksu (slika 10.2.1.a). Apatit se u analiziranim uzorcima nalazi često uz struvitne kamence u obliku malih sferula koje imaju šuplju unutrašnjost (uzorci K 1, OS 6 i OS 10; slike 10.2.3.c, 10.2.6.c, 10.2.10.b). Individualne sferule apatita većinom se nakupljaju u šupljinama kamenaca. Te sferule su otprilike veličine 5 µm, a često dolaze i u agregatima (Grases, 1998).

Vidljiva poroznost na kristalima struvita može biti posljedica djelovanja mikroorganizama (slika 10.2.1.b). Na temelju prethodnih spoznaja o struvitnim kamencima i SEM slika možemo pretpostaviti da bakterije imaju bitnu ulogu u njihovom stvaranju. Prisutnost pora vidljivih na površinama kristala struvitnih kamenaca upućuje na moguću interakciju kristala s urinom. Urin cirkulira, tj. prolazi kroz kristal i na taj način može povećati apsorpciju drugih iona mokraće koji mogu stimulirati rast ili agregaciju kristala. Također se može pretpostaviti da poroznost kristala olakšava prijanjanje bakterija i razvoj biofilma, u kojem su bakterije okružene egzopolisaharidima i na taj način stječu otpotnost na liječenje infekcija antibioticima. Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama koji su ireverzibilno povezani sa površinom, stvaraju ekstracelularni polimerni matriks koji služi za pohranjivanje nutrijenata, a ujedno može „zarobiti“ i druge mikrobe i ne-celularni materijal poput minerala i kristala (slika 10.2.2.c i 10.2.3.a i b). Oni se mogu definirati i kao visoko permeabilni vodeni kanali koji služe za transport nutrijenata i otpadnih produkata kod bakterija (slika 10.2.3.b) (Prywer *et al*. 2012). Na slici 10.2.2.a i b vide se kristali struvita sa svojim karakterističnim formama, a na većem povećanju (slika 10.2.2.c) dobro su vidljivi bakterijski biofilmovi i ekstracelularni polisaharidi (uzorak OS 1). Na slici 10.2.3.c vidi se apatit u obliku sferula koji u takvom obliku često dolazi u asocijaciji sa struvitnim, tj. infektivnim kamencima. Biofilmovi se primarno sastoje od stanica mikroorganizama i ekstracelularnih polimera, a sadrže od 50 do 90% ukupnog organskog ugljika. Kod biofilmova postoje varijablina kemijska i fizikalna svojstva, ali primarno se sastoje od

polisaharida. Ekstracelularni polimeri su vrlo hidratizirani jer mogu uključivati velike količine vode u svoju strukturu pomoću vodikovih veza. Mogu se vezati s metalnim ionima, dvovalentnim kationima i drugim molekulama kao što su lipidi i proteini. Biofilmovi su vrlo heterogeni i sadrže mikrokolonije bakterijskih stanica koje su uvučene u matriks od ekstracelularnih polimera. Imaju i sposobnost da pomoću ureaze hidroliziraju ureu u urinu do amonijaka i ugljičnog dioksida. Amonijevi ioni dižu pH vrijednost, što dovodi do precipitacije hidroskilapatita i struvita (Donlan, 2002). Promatrani kristali struvita na uzorcima bubrežnih kamenaca vidljivi su ununtar takvih biofilmova koji su građeni od bakterijskih stanica i njihovih produkata (slike 10.2.2.a,b i c, 10.2.3.a i b).

Na uzorku kamenca OS 6 pomoću SEM-a vidljivi su karakteristični veliki kristali struvita (slika 10.2.4.a i b) sa lijepo razvijenim formama (slika 10.2.6.a i b) u apatitnom matriksu i dokazana je prisutnost još jedne mineralne komponente, brushita (slike 10.2.4.b, 10.2.5.a i b, 10.2.6.a i b). Brushit počinje kristalizirati na taj način da pojedinačne iglice kristala u početku rastu paralelno s površinom, a zatim se spajaju u snopove prilikom procesa nukleacije i rasta. Središnje točke tih snopova omogućuju lakši daljni rast individualnih kristala, najprije u dva suprotna smjera, a zatim i u različitim smjerovima tako dugo dok daljnjim rastom cijelu dostupnu površinu ne ispune iglicama (slika 10.2.5.b) (Cuneyt Tas, 2006). Brushit može kristalizirati samo u ograničenom rasponu pH vrijednosti, pa liječenje često uključuje promjenu pH vrijednosti urina kod takvih pacijenata. Asocijacija kisele faze sa struvitom i bakterijama koje proizvode NH_4^+ ione moglo bi se objasniti nekom biološkom aktivnošću. Jedna od teorija je da neka vrsta bakterija stvara kiseli mikrookoliš čime se ubrzava reakcija produkcije amonijaka (Gibson, 1974). U takvom mikrookolišu mogla bi početi precipitacija kisele faze u alkalnom okolišu. Postoji i mogućnost da je brushit kristalizirao kao posljedica provođenja određene terapije, promjenom pH vrijednosti, tj. zakiseljavanjem urina.

Na uzorku kamenca OS 8 pomoću SEM-a vidljivi su tipični monoklinski kristali brushita (slika 10.2.8.a i b) koji se pojavljuju i u obliku obliku štapića (slika 10.2.9.a i b), i sitne sferule veličine otprilike 5 μm (Grases, 1998) na kristalima brushita i oko njih (slika 10.2.8.a i b) koje odgovaraju kalcij hidrogenfosfat hidratu (OCP). Oktakalcij fosfat (OCP), $Ca_8H_2(PO_4)_6$ x $5H_20$, ima strukturne sličnosti s hidroksilapatitom ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) te se oba minerala u bubrežnim kamencima javljaju u obliku sferula pa ih je teško razlikovati.

Brushit često prelazi u kalcij hidrogenfosfat hidrat porastom pH vrijednosti i temperature. Oktakalcij fosfat može hidrolizirati do apatita (hidroliza je inhibirana u prisutnosti magnezija ili pirofosfata, a promovirana u prisutnosti karbonata ili fluoridnih iona) što ovisi o pH uvjetima, temperaturi i prisutnosti iona kalcija i fosfata ($Ca_5(PO_4)_3F$) (LeGeros *et al*., 1984).

Na uzorku kamenca K 6, nalaze se nakupine sferičnih bakterija i bakterijski biofilmovi karakteristični za infektivne kamence (slike 10.2.7.a i b) na površini kamenca od hidroksilapatita. Vjerojatno se radi o Gram-pozitivnim bakterijama (jer su one otpornije na sušenje, a uzorci nisu bili prethodno konzervirani) iz roda *Streptococcus.* Stanice takvih bakterija najčešće su sferične ili jajolike, promjera od 0,5 do 2,0 μm. Pojavljuju se u parovima ili lancima ukoliko rastu u tekućem mediju (Holt, 1994). I apatitni kamenci spadaju u tzv. infektivne kamence koji nastaju kao posljedica bakterijske infekcije mokraćnog sustava (prisutne bakterije potvrđene SEM-om na slici 10.2.7.a i b) koje hidroliziraju ureu do amonijaka i ugljičnog dioksida, što dovodi do porasta pH vrijednosti urina i taloženja topivih iona magnezija i kalcija te na taj način nastaju kamenci koji sadrže magnezij amonij fosfat (struvit) i kalcij fosfat (apatit) (Vraneš & Leskovar, 2009).

Na uzorku kamenca OS 10 pomoću SEM-a vidljiv je kristal struvita u apatitnoj osnovi (slika 10.2.10.a) i uvećani prikaz apatitne komponente u obliku šupljikavih korica (slika 10.2.11.b). Također su vidljivi i veliki kristali struvita s lijepo razvijenim formama i izraženim pukotinama te apatit u obliku sferula u asocijaciji sa struvitom (slika 10.2.11.a i b). Te šupljinice mogu biti posljedica mikrobiološke aktivnosti. Bakterije koje su vezane uz infektivne struvitne i apatitne kamence cijepaju ureu do amonijaka i ugljičnog dioksida. Zbog izbijanja plinova na površinu uslijed metaboličkih procesa bakterija, unutrašnjost sferule ostaje prazna. Kristali struvita su hemimorfni, tj. zbog gubitka horizontalne ravnine simetrije, razlikuju se gornja i doljnja polovica kristala što se lijepo može vidjeti na slikama 10.2.5.a i 10.2.11.a.

Uzorak OS 12 je dosta vlažan i raspada se, tj. nestabilan je u vakuumu i kao takav nije bio pogodan za snimanje na pretražnom elektronskom mirkoskopu.

Od sedam analiziranih uzoraka bubrežnih kamenaca pomoću XRD metode, četiri difraktograma odgovaraju struvitu (slika 10.3.1.–10.3.4.), jedan hidroksilapatitu (slika

10.3.5.), jedan je mješavina struvita i hidroksilapatita (slika 10.3.7.), a jedan mješavina brushita i kalcij hidrogenfosfat hidrata (slika 10.3.6.). Za detaljniju analizu trebalo je usitniti čitav uzorak u homogeni prah da bismo dobili pouzdanije rezultate analize. XRD metoda ne pokazuje prisutnost komponenata koje su u uzorku zastupljene s manje od 5%, a to smo potvrdili pretražnom elektoronskom mikroskopijom i FTIR spektroskopijom (tablica 10.3.8.).

Na temelju rezultata analize FTIR spektroskopijom ustanovilo se da sva četiri struvitna kamenca sadrže malu količinu karbonatnog apatita (pikovi oko 1415–1420 cm^{-1}) isto kao i kamenac od hidroksilapatita, jedan je mješavina struvita i apatita (iako struvit prevladava u tim uzorcima), a jedan se sastoji od brushita i kalcij hidrogenfosfat hidrata. Na jednom uzorku XRD metodom pronađen je samo struvit, a pomoću SEM-a je dokazana prisutnost još jedne mineralne komponente, brushita. To je još jedan dokaz o značaju korištenja te metode prilikom ovakvih istraživanja.

IR spektri pokazuju apsorpcijske vrpce (istezanja ili savijanja) pri određenim valnim duljinama, predstavljajući na taj način određene funkcionalne skupine kao rezultat rotacijskih i vibracijskih kretnji u molekulama. Apsorpcija i intenzitet vrpci vezan je uz molekularni sastav i strukturu svakog sastojka u uzorku. Kod bubrežnih kamenaca, pojedina mineralna faza može biti određena pomoću apsorpcijskog spektra sa specifičnim vrpcama istezanja ili savijanja.

Analizirani uzorci imaju široku apsorpcijsku vrpcu koja odgovara O–H vibraciji istezanja (radi se o kristalnoj vodi) sa pikovima u rasponu od 3624 do 2600 cm^{-1} (Moenke, 1974). S tom vrpcom preklapa se i vrpca s N–H vibracijom istezanja koja bi trebala biti prisutna, pošto smo XRD metodom otkrili struvitnu komponentu u većini uzoraka, ali je moguće da se ne vidi jer je puno slabijeg intenziteta. Apsorpcijske vrpce umjerenog intenziteta s pikovima između 2341 i 2286 cm^{-1} su posljedica istezanja CO_2 iz zraka (zbog atmosferskog utjecaja prilikom pripreme ili snimanja uzorka). Kod struvitnih kamenaca, apsorpcijske vrpce slabih intenziteta između 1651–1461 cm^{-1} su posljedica istezanja CO_3^{2-} funkcionalne skupine (Shafaa & Azooz, 2007), a dokazuju prisutnost karbonatne komponente u uzorku koja vjerojatno pripada karbonatnom apatitu, ali ga količinski ima jako malo pa ga XRD metodom nismo identificirali. Oštre apsorpcijske vrpce jakih intenziteta s pikovima od

1029 do 873 cm^{-1} su posljedica istezanja PO_4^{3-} skupine (S.D. Ross, 1974), a dokazuju prisutnost fosfatne komponente u uzorku. Oštre apsorpcijske vrpce umjerenih intenziteta s pikovima od 723 do 690 cm^{-1} ukazuju na prisutnost male količine kalcijevog oksalata u uzorku (Gianossi *et al*., 2012) koji često služe kao kristalizacijska jezgra na koju se kasnije talože drugi minerali, u ovom slučaju fosfati. Oštre apsorpcijske vrpce umjerenih intenziteta s pikovima između 671 i 525 cm^{-1} ukazuju na istezanje PO_4^{3-} skupine (Popescu *et al.*, 2010) i dokazuju prisutnost fosfatne komponente u uzorku, ovisno o intenzitetu (slike 10.4.1.–10.4.4.). Kod kamenca od hidroksilapatita i mješavini brushita i kalcij hidrogenfosfat hidrata te hidroksilapatita i struvita, prema literaturi, apsorpcijske vrpce s pikovima između 1656 i 1632 cm^{-1} odgovaraju istezanju molekule vode (Hirsch *et al*., 2014) (slike 10.4.5.–10.4.7.). Na temelju rezultata FTIR spektroskopije vidimo da XRD metoda nije dovoljna za detekciju malih količina određenih mineralnih komponenti u bubrežnim kamencima. Na četiri uzorka od sedam analiziranih, uz struvitnu komponentu postoje i određene male količine karbonatnog apatita i kalcijevog oksalata. Jedan kamenac odgovara hidroksilapatitu, jedan mješavini hidroksilapatita i struvita, a jedan je kombinacija brushita i kalcij hidrogenfosfat hidrata (vidi tablicu 10.9. u prilogu 8). Kalcij hidrogenfosfat hidrat termodinamički je metastabilna faza i spontano prelazi u apatit. S fiziološkog stajališta smatra se da precipitira kao prekursor apatitu.

Iako FTIR metoda ima najširu upotrebu u rutinskoj analizi bubrežnih kamenaca u laboratorijima, pomoću njih se može utvrditi samo prisutnost pojedinih iona i radikala bez razlikovanja specifičnih spojeva u mnogim tipovima bubrežnih kamenaca i njihovim mješavinama. Često dolazi do preklapanja vrpca pojedinih funkcionalnih skupina što dodatno otežava interpretaciju. Upravo zbog toga, uz FTIR metodu koristili smo i rentgensku difrakciju na prahu koja je preciznija i zajedno sa IR spektroskopijom daje vrlo usporedive rezultate, a morfologija pojedinih komponenti bubrežnih kamenaca kao i topografske karakteristike, kemijske promjene na njihovim površinama te vrlo rijetke i slabo zastupljene faze potvrđene su zapažanjima pomoću pretražne elektronske mikroskopije koja je dopunila prve informacije o izgledu, morfologiji kamenaca promatranih pod lupom.

12. ZAKLJUČAK

Iako postoji mnogo dostupnih metoda za analizu sastava i strukture bubrežnih kamenaca, ni jedna metoda zasebno ne daje sve potrebne informacije zbog čega smo prilikom izrade ovog rada koristili kombinaciju metoda koje nam daju odgovore na strukturna i morfološka obilježja. Analizirani su bubrežni kamenci rentgenskom difrakcijom na prahu (XRD metodom), infracrvenom spektroskopijom (FTIR), i pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM). Iako je XRD metoda preciznija od IR spektroskopije, njihovi se rezultati izvrsno nadopunjuju, te potvrđuju rezultate analize istraživanja dobivenih pomoću svjetlosnog i elektronskog mikroskopa.

Morfologija pojedinih komponenti bubrežnih kamenaca kao i topografske karakteristike te kemijske promjene na njihovim površinama potvrđene su zapažanjima na SEM-u. Kristali struvita relativno su veliki i imaju karakterističnu izgled u odnosu na kristale hidroksilapatita koji su puno manji, praškastog izgleda i dolaze u obliku korica i sitnih sferula na površini bubrežnih kamenaca i u njihovoj poroznoj unutrašnjosti. Struvitni agregati sadrže velik broj bakterijskih stanica i debelih biofilmova unutar vlaknastog organskog matriksa. Pomoću SEM-a mogu se vidjeti bakterijski biofilmovi koji se u posljednje vrijeme uvelike istražuju zbog njihove povezanosti s rezistencijom na antibiotike i rekurentnim infekcijama urinarnog trakta. Definicija biofilmova se konstantno mijenja već duži vremenski period upravo zbog toga što svako novo istraživanje nadograđuje već postojeće znanje o njihovoj strukturi i stvaranju, između ostalog, i na struvitnim bubrežnim kamencima.

XRD metodom određena je kristalna struktura minerala, na temelju rezultata analize difraktograma praha s određenim difakcijskim maksimumima. Ta metoda sama po sebi nije dovoljna jer smo na temelju rezultata dobivenih snimanjem uzoraka FTIR metodom dokazali da u većini analiziranih uzoraka ima pojedinih funkcionalnih skupina koje pripadaju drugoj mineralnoj komponenti, a XRD metodom ih nismo otkrili jer su u uzorcima zastupljene s manje od 5%. Većina kamenaca od struvita sadrži i apatitnu komponentu u većem ili manjem postotku i mali udio kalcij oksalata koji u velikoj većini slučajeva služi kao jezgra za naknadno taloženje drugih spojeva i minerala. Kod istraživanja takvih kamenaca od koristi bi bila i primjena polarizacijske mikroskopije.

Upravo zbog različitih i promjenjivih fizikalno-kemijskih uvjeta unutar urinarnog trakta dolazi do kristalizacije više od jedne mineralne komponente sličnog mineralnog sastava (npr. asocijacija fosfatnih minerala), ili može dodi do pojave više komponenata različitog mineralnog sastava unutar jednog kamenca (npr. asocijacija fosfatnih i oksalatnih minerala). Svi analizirani kamenci sastoje se od više kristalnih komponenti, odnosno više faza (u većini slučajeva u uzorcima zastupljnih s manje od 5%) što upućuje na različite fiziološke uvjete koje nastojimo što bolje objasniti kako bi uspješnije odredili medicinsku terapiju i izbjegli ponovno stvaranje kamenaca.

13. POPIS LITERATURE

Back, M.E. & Mandarino, J.A. (2008): Fleischer's Glossaryof Mineral Species 2008. The Mineralogical Record Inc., XVI+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, United Kingdom, 126 – 136.

Basiri, A., Taheri, M. & Taheri, F. (2012): What is the State of the Stone analysis Techniques in Urolithiasis? Urology Journal, Iran, 445 – 454.

Cuneyt Tas, A. (2006): Electroless deposition of brushite(CaHPO4 x $2H_2O$) crystals on Ti-6Al-4V at room temperature. International Journal of Material Research, Clemson, USA, 639 – 644.

Donlan, R.M. (2002): Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, USA, Vol. 8, No. 9, 881 – 890.

Dragčević, K. (2010): Istraživanje korozije u procesima grafičke reprodukcije. Doktorski rad, Grafički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

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

Giurgiu, A. & Tamas, T. (2013): Mineralogical data on bat guano deposits from three Romanian caves. Studia UBB Geologia, Romania, 58 (2), 13 – 18.

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

Gupta, M., Bhayana, S., & Sikka, S.K. (2011): Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, India, 793 – 798.

Holt, J.G. (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Willinams and Wilkins, ed., p. 532.

Kontrec, J., Babić-Ivančić, V. & Brečević, Lj. (2005): Formation and morphology of struvite and newberyite in aqueous solutions at 25 and 37 ˚C. Collegium Antropologicum 29, Zagreb, Croatia, 289 – 294.

LeGeros, R.Z., Kijkowska, R. & LeGeros, J.P. (1984): Formation and transformation of octacalcium phosphate, OCP: a preliminary report. Scanning Electron Microscopy, (Pt 4):1771 – 7.

Lonsdale, K. (1968): Epitaxy as a growth factor in urinary calculi and gallstones. Nature, 217, 56 – 58.

McLean, R.J.C., Nickel, J.C., Beveridge, T.J. & Costerton, J.W. (1989): Observations of the ultrastructure of infected kidney stones. Journal of Medical Microbiology, 29, 1 – 7.

Milošević, D., Batinić, D. (2002): Urolitijaza u dječjoj dobi. Paediatria Croatica, 46 (Supl 1): 33 – 35.

Moenke, H. H. W. (1974): Vibrational Spectra and the Crystal-chemical Classification of Minerals. V.C. Farmer, ed.: The infrared spectra of minerals. Chapter 7, London, 112 – 118.

Pasero, M., Kampf, A.R., Ferraris, C., Pekov, I.V., Rakovan, J. & White, T.J. (2010): Nomenclature of the apatite supergroup minerals. European Journal of.Mineralogy, 22, 163 – 179.

Plodinec, M. (2014): Fizikalna i kemijska svojstva funkcionaliziranih titanatnih nanostruktura. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Popescu (Pintilie), G. S., Ionescu, I., Grecu, R. & Preda, A. (2010): The Use of Infrared Spectroscopy in the Investigation of Urolithiasis. 18, 4/4, Romania, 67 – 77.

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. U: Report on the Management of Staghorn Calculi, 7 – 8.

Prywer, J., Torzewska, A. & Plocinski, T. (2012): Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus mirabilis*. Urological research, 40(6): 699 – 707.

Rogelj, I. (1998): Istine i zablude o mlijeku i mliječnim proizvodima u prehrani. Mljekarstvo, 48 (3), 153 – 164.

Romero, V., Akpinar, H. & Assimos G. D. (2010): Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors. U: Urology, 12(2-3), e86 – e96.

Ross, S.D. (1974): Phosphates and other oxy-anions of group V. V.C. Farmer, ed.: The infrared spectra of minerals, Chapter 17, London, 383 – 422.

Shafaa, K.H., Azooz, K. & M. A. (2007): Application of Vibrational Spectroscopy in Identification of the Composition of the Urinary Stones. Journal of Applied Sciences Research 3(5): 387 – 391.

Shafiee, M.A.(2010): Urinary composition and stone formation. University of Toronto, 2010.

Taylor, E.N. & Curhan, G.C.(2006): Differences in 24-Hour Urine Composition between Black and White Women. U: Journal of the American Society of Nephrology, 654 – 659.

Vraneš, J. & Leskovar, V. (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija, Zagreb, 147 – 165.

Internetski izvori

Analiza bubrežnih/žučnih kamenaca FTIR spektroskopijom: http://www.irb.hr/Istrazivanja/Zavodi-i-centri/Zavod-za-fizicku-kemiju/Laboratorij-za-sintezu-i-procese-samoorganizacije-organskih-molekula/Analiza-bubreznih-zucnih-kamenaca-ft-ir-spektroskopijom (2014)

Barbara L. Dutrow, Christine M. Clark: X-ray Powder Diffraction (XRD): http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html (2014)

Dick Gibson: Mineralogy of kidney stone: http://www.gravmag.com/kstones.shtml (2015)

Gianossi, M. L., Summa, V. (2012): A Rewiew of Pathological Biomineral Analysis Techniques and Classification Schemes. An Introduction to the Study of Mineralogy: http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/27435.pdf (2014)

Hirsch, A., Azuri, I., Addadi, L., Weiner, S., Yang, K., Curtarolo, S. and Kronik, L. (2014): Infrared Absorption Spectrum of Brushite from First Principles. Chemistry of materials: http://materials.duke.edu/auro/AUROARTICULA/cm500650t.pdf (2014)

Infrared Spectroscopy: http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf (2014)

Online edition for students of organic chemistry lab courses at the University of Colorado, Boulder, Dept of Chem and Biochem.Chapter 15, Infrared Specrtoscopy: Theory, 2002.: http://orgchem.colorado.edu/Spectroscopy/irtutor/IRtheory.pdf (2015)

Popović, Z. (1999): Infracrvena spektroskopija: ftp://prelog.chem.pmf.hr/pub/POAK/Praktikum%20anorganske%20k%201%20i%202/IR_skripta.pdf (2014)

Stuart, B.(2004): Infrared spectroscopy: Fundamentals and aplications: http://www.slideshare.net/amirhosein66/barbara-h-stuartinfraredspectroscopyfundamebookfiorg (2014)

Prilog 1.

Tablica 1. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka K 1

Pozicija (2θ)	d-međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
14.4707	6.12119	7.10
15.0302	5.89459	22.89
15.8324	5.59768	100.00
16.4939	5.37462	39.75
19.3382	4.59008	5.15
20.8863	4.25321	73.63
21.4718	4.13853	56.26
25.6703	3.47039	4.42
27.0855	3.29220	18.12
29.5577	3.02223	5.67
30.2242	2.95709	16.45
30.6295	2.91887	24.97
31.9159	2.80410	48.15
33.2909	2.69136	65.70
33.6919	2.66025	19.52
35.2158	2.54854	2.54
35.7673	2.51050	5.98
37.5636	2.39448	2.36
38.3215	2.34884	4.17
40.1473	2.24614	1.97
42.4430	2.12981	2.84

44.1041	2.05338	3.49
44.9456	2.01687	7.49
46.3421	1.95929	7.78
47.3271	1.92079	3.53
50.8532	1.79557	6.61
51.9107	1.76145	4.81
52.6562	1.73826	5.19
57.9104	1.59243	3.59
59.3615	1.55692	1.08
62.6683	1.48126	1.17

Prilog 2.

Tablica 2. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka OS 1

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
14.4534	6.12850	7.57
15.0295	5.89485	27.48
15.7760	5.61755	76.55
16.4508	5.38861	35.77
19.3753	4.58136	4.76
20.9123	4.24798	100.00
21.5112	4.13105	49.64
25.7133	3.46468	16.51
27.1655	3.28269	29.55
29.5722	3.02078	11.51
30.2222	2.95728	21.85
30.6659	2.91549	45.78
31.9120	2.80444	87.42
33.3863	2.68389	85.62
33.7729	2.65405	39.56
35.8377	2.50573	9.23
37.6304	2.39038	4.64
38.3315	2.34825	9.92
40.0340	2.25223	8.51
42.4866	2.12773	6.42
44.1129	2.05299	8.13

45.0771	2.01129	10.26
46.4436	1.95524	17.21
47.3641	1.91937	8.68
48.7241	1.86893	15.43
49.3700	1.84598	8.98
50.9080	1.79377	15.69
51.8785	1.76247	11.95
52.7085	1.73666	13.71
54.6293	1.68005	3.52
55.6807	1.65080	3.06
57.9733	1.59085	5.62
61.3412	1.51134	3.65
62.6981	1.48063	3.10
63.9300	1.45624	2.91

Prilog 3.

Tablica 3. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka OS 6

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
14.4776	6.11832	10.66
15.0628	5.88190	26.42
15.8807	5.58074	100.00
16.5438	5.35853	39.89
19.2933	4.60065	6.29
20.9274	4.24496	97.73
21.5467	4.12432	50.10
25.0746	3.55148	3.17
25.7043	3.46588	15.38
27.1015	3.29029	25.71
29.1443	3.06415	5.98
29.6606	3.01198	10.06
30.3132	2.94861	23.46
30.7335	2.90923	36.80
31.9822	2.79844	68.42
33.3510	2.68665	84.30
33.7618	2.65490	29.92
35.2497	2.54617	4.46
35.8450	2.50524	8.35
37.6488	2.38925	4.15
38.3935	2.34460	7.46

40.1048	2.24842	4.58
41.4421	2.17891	2.45
42.4869	2.12771	5.53
44.1377	2.05189	7.79
45.0242	2.01353	8.89
46.3410	1.95933	11.43
47.3698	1.91915	6.05
48.6954	1.86997	3.07
49.3265	1.84751	4.38
50.9318	1.79299	13.60
51.9028	1.76170	8.86
52.6870	1.73732	11.32
53.5126	1.71244	4.36
54.6424	1.67968	2.80
55.4894	1.65603	1.81
57.8615	1.59366	6.48
59.4305	1.55528	2.25
61.3648	1.51081	2.32
62.5658	1.48344	2.53

Prilog 4.

Tablica 4. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnim ravninama razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnim intenzitetima analiziranog uzorka OS 12

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
14.5209	6.10014	10.03
15.0372	5.89185	25.62
15.8919	5.57685	88.56
16.5398	5.35982	49.25
19.3536	4.58646	4.53
20.9387	4.24270	97.55
21.5628	4.12128	65.81
25.1028	3.54755	3.53
25.7070	3.46553	6.15
27.1699	3.28217	28.83
28.0034	3.18634	2.25
29.1639	3.06214	4.82
29.6266	3.01535	7.81
30.2079	2.95864	18.70
30.7147	2.91097	35.70
31.9718	2.79933	51.35
32.9507	2.71837	13.74
33.3386	2.68762	100.00
33.7159	2.65841	28.36
35.2496	2.54617	3.66
35.8266	2.50648	6.96

37.5977	2.39238	4.40
38.3454	2.34744	7.74
39.2257	2.29676	0.60
40.0230	2.25283	2.50
41.4470	2.17866	2.06
42.5091	2.12665	4.86
43.7671	2.06840	4.25
44.1185	2.05274	7.31
45.0439	2.01269	9.94
45.7855	1.98180	4.46
46.4252	1.95598	12.81
47.3677	1.91924	4.92
48.7222	1.86900	2.67
49.3037	1.84831	2.34
50.9467	1.79250	14.62
51.9269	1.76094	6.73
52.7648	1.73494	9.04
53.4875	1.71319	2.51
54.6579	1.67924	2.84
55.5286	1.65496	1.62
57.7991	1.59523	5.60
59.4513	1.55479	2.36
61.3007	1.51224	2.41
62.5980	1.48399	2.89
63.8391	1.45689	1.02

Prilog 5.

Tablica 5. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka K 6

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
10,6572	8,30149	5,57
16,9343	5,23583	3,29
26,0026	3,42679	43,44
28,5392	3,12772	9,09
32,1300	2,78590	100,00
39,6942	2,27073	11,88
46,9653	1,93474	11,29
49,7535	1,83265	15,91
53,3706	1,71525	12,87

Prilog 6.

Tablica 6. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka OS 8

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
4.7663	18.54039	77.03
4.8842	18.09300	41.12
9.4633	9.34596	4.93
9.8528	8.97732	5.05
11.6978	7.56520	100.00
11.8057	7.49634	50.91
14.3550	6.17029	2.31
16.1331	5.49401	3.00
20.9534	4.23974	32.48
22.8185	3.89725	2.14
23.4342	3.79624	6.47
24.4193	3.64528	6.61
26.0381	3.42221	11.03
27.2194	3.27630	2.36
28.0173	3.18479	5.42
29.3236	3.04582	31.87
30.5720	2.92423	18.37
31.2660	2.86089	8.26
31.9314	2.80278	13.81
33.6053	2.66690	9.35
34.1763	2.62364	18.48

34.5216	2.59818	21.04
36.9286	2.43418	5.43
38.0366	2.36578	0.94
39.8254	2.26355	2.34
40.9334	2.20480	2.04
41.5636	2.17282	5.55
42.1316	2.14483	8.06
43.4921	2.08084	2.64
45.3073	2.00161	4.73
48.6338	1.87219	4.66
49.1098	1.85516	3.43
50.2655	1.81518	10.63
50.8294	1.79636	3.58
53.5401	1.71163	6.67
57.5217	1.60227	1.20
59.5617	1.55217	1.72
60.9187	1.52081	1.20
63.9745	1.45413	2.39

Prilog 7.

Tablica 7. Podaci o kutevima difrakcije zračenja (2θ), mrežnih ravnina razmaknutih za iznos međumrežnog razmaka (d) i relativnih intenziteta analiziranog uzorka OS 10

Pozicija (2θ)	d međumrežni razmak (A)	Relativni intenzitet (%)
15.8386	5.59549	12.41
20.8682	4.25687	12.11
21.5004	4.13310	8.56
25.8850	3.44210	37.87
28.6985	3.11073	7.91
31.9395	2.80208	100.00
39.9500	2.25677	14.62
46.7067	1.94484	12.59
49.6007	1.83794	20.12
53.3511	1.71583	10.81

Prilog 8.

Tablica 10.9. Podaci o valnim brojevima (cm^{-1}) i karakterističnim vibracijskim vrpcama pojedinih funkcionalnih skupina u analiziranim uzorcima.

Oznaka uzoraka	**Valni brojevi (cm^{-1}) i karakteristične vibracijske vrpce funkcionalnih skupina**	**Mineralni sastav**
K 1	3178 (istezanje O-H), 2349 (asim. istezanje C=O), 1651 (istezanje CO_3^{2-}), 1432 (istezanje CO_3^{2-}), 1001 (istezanje PO_4^{3-}), 873 (istezanje HPO_4^{2-}), 755 (C-C istezanje), 564 (istezanje HPO_4^{2-})	Struvit (karbonatni apatit, kalcij oksalat)
OS 1	2920 (istezanje O-H), 2345 (asim. istezanje C=O), 1642 (istezanje CO_3^{2-}), 1432 (istezanje CO_3^{2-}), 1003 (istezanje PO_4^{3-}), 872 (istezanje HPO_4^{2-}), 757 (C-C istezanje), 563 (istezanje HPO_4^{2-})	Struvit (karbonatni apatit, kalcij oksalat)
OS 6	2900 (istezanje O-H), 2349 (asim. istezanje C=O), 1650 (istezanje CO_3^{2-}), 1431 (istezanje CO_3^{2-}), 1000 (istezanje PO_4^{3-}), 873 (istezanje HPO_4^{2-}), 767 (C-C istezanje), 565 (istezanje HPO_4^{2-})	Struvit (brushit, karbonatni apatit, kalcij oksalat)
OS 12	2909 (istezanje O-H), 2390 (asim. istezanje C=O), 1549 (istezanje CO_3^{2-}), 1432 (istezanje CO_3^{2-}), 992 (istezanje PO_4^{3-}), 892 (istezanje HPO_4^{2-}), 754 (C-C istezanje), 567 (istezanje HPO_4^{2-})	Struvit (karbonatni apatit, kalcij oksalat)
K 6	3276 (istezanje O-H), 2349 (asim. Istezanje C=O), 1657 (savijanje mol. vode), 1414 (istezanje CO_3^{2-}), 1029 (istezanje PO_4^{3-}), 873 (istezanje CO_3^{2-}), 601 (istezanje PO_4^{3-}), 561 (istezanje PO_4^{3-})	Hidroksilapatit, (karbonatni apatit)
OS 8	3721 (istezanje O-H), 3532 (istezanje O-H), 2345 (asim. istezanje C=O), 1649 (savijanje mol. vode), 1039 (istezanje PO_4^{3-}), 988 (istezanje PO_4^{3-}), 873 (istezanje HPO_4^{2-}), 781 (C-C istezanje), 560 (istezanje PO_4^{3-}), 525 (P–O savijanje)	Brushit, kalcij hidrogen fosfat hidrat (kalcijev oksalat)
OS 10	3241 (istezanje NH_4^{+}), 2911 (istezanje O-H), 2322 (asim. istezanje C=O), 1649 (savijanje mol. vode), 1452 (istezanje CO_3^{2-}), 1022 (istezanje PO_4^{3-}), 872 (istezanje HPO_4^{2-}), 561 (istezanje PO_4^{3-})	Hidroksilapatit, struvit (karbonatni apatit)