



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anamarija Stanković

**TALOŽENJE KALCIJEVIH OKSALATA U  
UVJETIMA HIPEROKSALURIJE: UTJECAJ  
AMINOKISELINA RELEVANTNIH ZA  
PATOLOŠKU BIOMINERALIZACIJU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anamarija Stanković

**TALOŽENJE KALCIJEVIH OKSALATA U  
UVJETIMA HIPEROKSALURIJE: UTJECAJ  
AMINOKISELINA RELEVANTNIH ZA  
PATOLOŠKU BIOMINERALIZACIJU**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Berislav Marković  
Dr. sc. Damir Kralj, znanstveni savjetnik

Zagreb, 2018.





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Anamarija Stanković

**PRECIPITATION OF CALCIUM OXALATES  
UNDER CONDITIONS OF  
HYPEROXALURIA: THE INFLUENCE OF  
AMINO ACIDS RELEVANT FOR  
PATHOLOGICAL BIOMINERALIZATION**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:  
Assoc. prof. Berislav Marković, Dr. sc.  
Senior scientist, Damir Kralj Dr. sc.

Zagreb, 2018.





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### TALOŽENJE KALCIJEVIH OKSALATA U UVJETIMA HIPEROKSALURIJE: UTJECAJ AMINOKISELINA RELEVANTNIH ZA PATOLOŠKU BIOMINERALIZACIJU

Anamarija Stanković

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju  
Ulica cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek

U ovom radu provedena su sustavna istraživanja spontanog taloženja kalcijeva oksalata pri tri različite kompleksnosti (jednostavan sustav, NaCl sustav i sustav umjetnog urina) i pri dva početna pH ( $\text{pH}_i = 5,0$  i  $\text{pH}_i = 9,0$ ). U svim sustavima dominantno taloži kalcijev oksalat monohidrat (COM) osim u sustavu umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 9,0$ ,  $c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \geq 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_i(\text{Ca}^{2+}) \geq 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  gdje taloži smjesa COM i kalcijeva oksalata dihidrata (COD). Istraženo je djelovanje sedam aminokiselina (nepolarne - Ala, Phe; polarne - Gly, Ser, Cys i nabijene - His, Asp) na spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije ( $c_i(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) s ciljem rasvjetljavanja njihove uloge na taloženje hidrata kalcijeva oksalata. U sva tri promatrana sustava zabilježen je značajan utjecaj promatranih aminokiselina na morfologiju i rast kristala COM. Pri  $\text{pH}_i = 9,0$  uočene promjene su izraženije. Jedino u sustavu umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 9,0$  evidentirana je promjena sastava; polarne aminokiseline i nepolarne Phe inhibiraju taloženje COM.

U ovom radu je po prvi puta sintetiziran COD uz primjenu ultrazvučnog miješanja. Kristalno sjeme COD habitusa u obliku pravilnih tetragonalnih bipiramida s prizmom pripremljeno je u ultrazvučno mješanom sustavu:  $c_i(\text{Ca}^{2+}) = 9,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2,33 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{citrat}) = 9,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $c_i(\text{Ca}^{2+})/c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ). Zapaženo je da omjer  $c_i(\text{Ca}^{2+})/c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ ,  $c(\text{citrat})$  i način miješanja značajno utječu na morfologiju COD kristala.

(135 stranica, 73 slika, 14 tablica, 187 literaturnih navoda, 1 shema, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

**Ključne riječi:** hiperoksalurija / kalcijev oksalat monohidrat / kalcijev oksalat dihidrat / spontano taloženje / ultrazvučno miješanje / aminokiseline

**Mentori:** Izv. prof. dr. sc. Berislav Marković, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju  
Dr. sc. Damir Kralj, znanstveni savjetnik, Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

**Ocjenitelji:** Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Sveučilište u Zagrebu, PMF  
Prof. dr. sc. Davor Kovačević, Sveučilište u Zagrebu, PMF

Dr. sc. Jasminka Kontrec, znanstveni suradnik, Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

**Zamjena:** Dr. sc. Maja Dutour Sikirić, viši znanstveni suradnik, Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Rad prihvaćen: 04. travnja 2018.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### PRECIPITATION OF CALCIUM OXALATES UNDER CONDITIONS OF HYPEROXALURIA: THE INFLUENCE OF AMINO ACIDS RELEVANT FOR PATHOLOGICAL BIOMINERALIZATION

Anamarija Stanković  
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry  
Ulica cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek

In this Thesis, systematic research of spontaneous precipitation of calcium oxalate at three different complexities (simple, NaCl and artificial urine system) and two initial pH ( $pH_i = 5.0$  and  $9.0$ ) was conducted. In all investigated systems, dominant precipitation of calcium oxalate monohydrate (COM) was observed, except in artificial urine system at  $pH_i = 9.0$ ,  $c_i(C_2O_4^{2-}) \geq 6.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  and  $c_i(Ca^{2+}) \geq 7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  where precipitation of a mixture of calcium oxalate monohydrate (COM) and calcium oxalate dihydrate (COD) occurred. The influence of seven amino acids (nonpolar - Ala, Phe; polar - Gly, Ser, Cys and charged - His, Asp) on spontaneous precipitation of calcium oxalate in hyperoxaluria conditions ( $c_i(Ca^{2+}) = 7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  and  $c_i(C_2O_4^{2-}) = 6.0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) was studied in order to elucidate their role in precipitation of calcium oxalate hydrate. In all three investigated systems, significant influence of studied amino acids on morphology and crystal growth of COM was noted. The changes were more pronounced at  $pH_i = 9.0$ . Only in the artificial urine system at  $pH_i = 9.0$ , the change in composition was observed, polar amino acids and nonpolar Phe inhibit precipitation of COM.

In this Thesis, COD was synthesized for the first time with ultrasonic mixing. Crystal seed of COD in a shape of proper tetragonal bipyramids with prism was prepared in ultrasonically mixed system:  $c_i(Ca^{2+}) = 9.00 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_i(C_2O_4^{2-}) = 2.33 \text{ mmol dm}^{-3}$  and  $c(\text{citrate}) = 9.00 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $c_i(Ca^{2+})/c_i(C_2O_4^{2-}) = 3.86$ ). It was observed that the  $c_i(Ca^{2+})/c_i(C_2O_4^{2-})$  ratio,  $c(\text{citrate})$  and the way of mixing significantly influenced morphology of COD crystals.

(135 pages, 73 figures, 14 tables, 187 references, 1 scheme, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

**Keywords:** hyperoxaluria / calcium oxalate monohydrate / calcium oxalate dihydrate / spontaneous precipitation / ultrasonic agitation / amino acids

**Supervisor:** Assoc. prof. Berislav Marković, Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry  
Dr. sc. Damir Kralj, Senior scientist, "Ruđer Bošković" Institute, Zagreb

**Reviewers:** Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, University of Zagreb, Faculty of Science  
Prof. dr. sc. Davor Kovačević, University of Zagreb, Faculty of Science  
Dr. sc. Jasminka Kontrec, Research Associate, "Ruđer Bošković" Institute, Zagreb

**Substitute:** Dr. sc. Maja Dutour Sikirić, Senior Research Associate, "Ruđer Bošković" Institute, Zagreb

**Thesis accepted:** April, 4<sup>th</sup>, 2018.





*“Everything happens for a reason, only time will tell the reason”* 

*Veliko hvala mojim mentorima/šefovima bez kojih ovo nebi bilo moguće.*

*Zahvaljujem se šefu/mentorcu Damiru što me prihvatio u svoj laboratorij i što je pokazao iznimnu vjeru u mene. U radu mi je omogućio samostalnost i slobodu, a svojim znanjem i savjetima me uspio usmjeriti na pravi put.*

*Zahvaljujem se šefu/mentorcu Markoviću koji je pokazao iznimno strpljenje samnom. Šefe hvala Vam što ste me uvijek „digli“ kada bi „pala“, što ste uvijek bili uz mene i omogućili mi da budem tu gdje sam danas, veliko hvala na svim savjetima i pomoći kako znanstvenoj tako i privatnoj.*

*Veliko hvala Jasminki, na svemu. Kada bi se krenula zahvaljivati mislim da bi mogla još jedan doktorat i o tome napisati, složiti ćete se da nam je jedan sasvim dovoljan, ali ću ipak zahvaliti na nekoliko stvari: prvenstveno hvala na Vašoj vedrini, smirenosti, strpljenju, savjetima, znanju, bezuvjetnoj pomoći, ...i jednom predivnom prijateljstvu koje će trajati zauvijek.*

*Veliko hvala mojoj cimi (Branki) na svakom savjetu, kako stručnom tako i privatnom. Cimo hvala ti na beskrajnom strpljenju koje si imala prilikom objašnjavanja nikad prežaljene/naučene kinetike.*

*Hvala dragim legicama Ivi, Nives, Željki i Martini na nesebičnoj pomoći, pruženom strpljenju i savjetima tijekom ovih nekoliko godina. Curke hvala Vam što ste vjerovali u mene.*

*Veliko hvala prof. Vesni Babić-Ivančić na nesebičnoj pomoći i beskrajnom iskustvu u području oksalata. Draga Vesna, hvala Vam na svim radovima i bilješkama koje ste uspjeli pronaći kada je to bilo najpotrebnije.*

*Veliko hvala prof. Davoru Kovačeviću i prof. Dubravki Matković-Čalogović na stručnim savjetima i pomoći oko analize uzoraka te same izrade ove disertacije.*

*Hvala dragoj studentici/legici Silviji bez koje ovaj doktorat, kao i svi ostali uradci u posljednjih nekoliko godina nebi izgledali tako savršeno kao što izgledaju.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na moralnoj podršci, razumijevanju i što su me uvijek podupirali, a također mi i omogućili da se bavim onim što volim iako im nikada nije bilo posve jasno čime se točno u svojem poslu bavim.*

*Najveću zahvalnost dugujem mom dečku/zaručniku i naposljetku mužu Borisu i našem predivnom anđelu Leilani koji su najviše iskusili sve muke mog profesionalnog razvoja. Hvala vam što ste me uvijek podržavali i vjerovali u mene. Bez vas ne bi bilo ove disertacije, niti bilo kojeg mog uspjeha. Hvala na strpljivom podnošenju zanemarivanja, ohrabrenju koje ste mi pružali kad bih posustala i radovanju svakom mom uspjehu.*

***Željela bih se zahvaliti i svima koji su pomogli u nastanku ove doktorske disertacije, svemu onom što je njoj prethodilo te na različite načine oblikovali moj životni put proteklih godina, a nisu ovdje spomenuti.***

# SADRŽAJ

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
2.1. Taložni procesi .....	5
2.2. Utjecaj aditiva na taloženje .....	9
2.3. Kalcijevi oksalati.....	10
2.3.1. Kalcijev oksalat monohidrat, COM .....	10
2.3.2. Kalcijev oksalat dihidrat, COD .....	12
2.3.3. Kalcijev oksalat trihidrat, COT .....	13
2.4. Biomineralizacija .....	14
2.5. Patološka biomineralizacija.....	15
2.5.1. Urolitijaza.....	17
2.5.2. Bubrežni kamenci.....	17
2.5.3. Hiperkalcijurija.....	19
2.5.4. Hiperoksalurija .....	19
2.5.5. Taloženje kalcijeva oksalata pri povišenoj koncentraciji oksalata.....	22
2.6. Urin.....	23
2.6.1. Umjetni urin .....	24
2.7. Aminokiseline .....	25
2.7.1. Kiselo - bazna svojstva aminokiselina .....	26
2.7.2. Uloga aminokiselina u patološkoj biomineralizaciji .....	29
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>30</b>
3.1. Eksperimentalni postupci i aparature .....	31
3.1.1. Priprava kalcijeva oksalata dihidrata, COD .....	32
3.1.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata.....	33
3.2. Eksperimentalne metode .....	36
3.3. Obrada eksperimentalnih podataka .....	38
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>39</b>
4.1. Priprava kalcijeva oksalata dihidrata, COD .....	40
4.1.1. Morfologija kristala kalcijeva oksalata dihidrata .....	44
4.1.2. Utjecaj citratnih iona na taloženje kalcijeva oksalata dihidrata .....	46
4.1.3. Elektrokinetička mjerenja kalcijeva oksalata dihidrata .....	49
4.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u jednostavnom sustavu i u umjetnom urinu .....	54
4.2.1. Morfologija kalcijeva oksalata u jednostavnom sustavu.....	59

4.2.2. Morfologija kalcijeva oksalata u sustavu umjetnog urina.....	61
4.3. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije.....	63
4.3.1. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u jednostavnom sustavu s aminokiselinama .....	68
4.3.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u NaCl sustavu s aminokiselinama.....	78
4.3.3. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u umjetnom urinu s aminokiselinama .....	85
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>95</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>100</b>
<b>7. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA .....</b>	<b>107</b>
<b>8. DODATAK .....</b>	<b>IV</b>
8.1. Infracrveni spektri standarda COM i COD .....	V
8.2. Termogravimetrijske krivulje standarda COM i COD.....	VI
8.2.1. Termogravimetrijske krivulje kalcijeva oksalata .....	VI
8.3. Rentgenski difraktogrami standarda COM i COD.....	VII
8.3.1. Rentgenogrami kalcijeva oksalata.....	VIII
8.4. Morfološka karakterizacija kalcijeva oksalata .....	XV
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>XVII</b>

## 1. UVOD

Biom mineralizacija je proces nastajanja funkcionalnih anorgansko-organskih hibridnih materijala (biominerala) u živim organizmima. Proces biom mineralizacije uključuje selektivno izdvajanje anorganskih i organskih konstitucijskih jedinica (iona, molekula) iz organizma te njihovu ugradnju u funkcionalne nadstrukture, pri čemu su svi ti procesi pod striktnom biološkom kontrolom. Mineralizirana tkiva su u stalnom kontaktu s tjelesnim tekućinama koje su izuzetno kompleksne, imaju visoku ionsku jakost, sadrže biološke makromolekule, male organske molekule i anorganske ione.<sup>1,2</sup> Funkcije biom mineraliziranih organa i tkiva su vrlo raznolike (potpora organizmu, zaštita (oklopi), plovnost, pokretanje, za mrvljenje hrane (zubi), kao deponiji minerala kalcija ...). Nasuprot biom mineralizacije kao procesa u kojem nastaju novi i funkcionalni materijali, postoji i patološka biom mineralizacija koja je proces neželjenog stvaranja biominerala. Tako nastaju patološki mineralizirane tvorbe: ovapnjenje krvnih žila (ateroskleroza), kamenci (mokraćni, bubrežni, žučni,...), karijes, itd. Specifični oblik patološke biom mineralizacije je urolitijaza. To je kronična, recidivirajuća bolest urinarnog trakta kod koje dolazi do nastajanja mokraćnih kamenaca u različitim dijelovima bubrega i mokraćnog mjehura.<sup>3</sup> Prisutna je širom svijeta, ali joj je učestalost s obzirom na pojedine zemlje odnosno određene regije različita.<sup>4</sup> Prema zadnjim svjetskim i nacionalnim epidemiološkim podacima uočen je izraziti porast pojave bubrežnih kamenaca u industrijaliziranim zemljama nakon Drugog svjetskog rata što se povezuje s povećanjem standarda i promjenama u prehranbenim navikama. Unatoč dosadašnjim opsežnim metaboličkim istraživanjima kod većine osoba s ovom bolešću etiologija bolesti ostaje nepoznata.<sup>5</sup>

Visoka učestalost urolitijaze navela je znanstvenike da pokušaju shvatiti načine na koji nastaju bubrežni kamenci imajući pri tome u vidu da je oko 80 % kamenaca kalcij oksalatnog sastava.<sup>6</sup> Gotovo četvrtina, dakle 25 % od tih kamenaca, postoji u čistom obliku, dok ih je 70 % vezano s kalcijevim fosfatom. Mali postotak, oko 5 % kamenaca su izgrađeni od čistog kalcijeva fosfata.<sup>7</sup> Kalcijevi oksalatni kamenci u biološkim uvjetima mogu nastati uslijed različitih metaboličkih poremećaja kao što su hiperkalcemija, hipocitaturija, hiperoksalurija ili promjena kiselosti urina.

Hiperoksalurija je metabolički poremećaj pojačanog izlučivanja oksalata urinom. Zdrave osobe na uobičajenoj prosječnoj dijeti izlučuju urinom 20 do 40 mg (0,22 do 0,44 mmol) oksalata na dan. Povećani unos hrane bogatom oksalatima povećava njihovo izlučivanje

urinom na 50 do 60 mg (0,56 do 0,67 mmol) na dan. Hiperoksalurija pridonosi stvaranju kamenaca tako što povećava zasićenje urina s obzirom na kalcijev oksalat. Poremećaj se može javiti kao primarna ili sekundarna hiperoksalurija.<sup>8</sup>

Na području patološke biomineralizacije kalcijeva oksalata napravljena su brojna istraživanja sa ciljem pronalaženja uzroka pojave urolitijaze. Kalcijevi oksalati kristaliziraju u obliku hidrata: termodinamički stabilni kalcijev oksalat monohidrat<sup>9,10</sup> (COM,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , vhevelit) te metastabilni dihidrat<sup>11-13</sup> (COD,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , vedelit) i trihidrat<sup>14,15</sup> (COT,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , engl. *caoxite*). Na nastajanje različitih hidratnih formi kalcijeva oksalata utječe niz čimbenika kao što su: prezasićenost, sastav otopine, omjer koncentracija kalcija i oksalata, temperatura, pH i način miješanja reakcijskih komponenata.<sup>16-19</sup> Budući da se u sastavu urina osim kalcija i oksalata nalaze brojne druge anorganske i organske molekule (kao njegovi stalni sastojci ili kao sastojci samo u osoba koje stvaraju bubrežne kamence), dio istraživanja je proveden i u uvjetima što sličnijim uvjetima u pravom urinu<sup>20-22</sup> odnosno u umjetnom urinu.<sup>23,24</sup> Većina umjetnih urina u svom sastavu sadrži: ureu, natrijev i/ili kalijev klorid, natrijev sulfat, magnezijev sulfat, različite natrijeve fosfate, natrijev oksalat, kalcijev klorid i citrat. Među organskim molekulama treba istaknuti proteine, koji su uključeni i u sastav bubrežnih kamenaca,<sup>25,26</sup> a količina i vrsta aminokiselina u njihovom sastavu varira ovisno o biološkim uvjetima urolitijaze.<sup>27,28</sup> Od aminokiselina tu se nalazi svih 20  $\alpha$ -aminokiselina. Količina i vrsta aminokiselina varira ovisno o biološkim uvjetima urolitijaze.

Prisutnost značajnih količina anorganskih i organskih iona daje prosječnu ionsku jakost urinu oko  $0,33 \text{ mol dm}^{-3}$ , dok pH urina varira sa sastavom urina unutar granica od 4,5 do 8,5. Kalcijevi i oksalatni ioni su uvijek prisutni u koncentracijama koje su iznad produkta topljivosti za COM. Koncentracija kalcija u 24h urinu zdravih osoba iznosi približno od 2,5 – 7,5 mmol, a koncentracija oksalata 0,22 – 0,44 mmol. Zbog toga je urin uvijek prezasićen s obzirom na COM, a navedene anorganske i organske molekule djeluju kao potencijalni inhibitori i/ili promotori taloženja čvrstih faza u urinu.

Učinak aminokiselina na taloženje hidrata kalcijevih oksalata proučavan je od strane nekih istraživača.<sup>28-33</sup> Međutim, podaci u literaturi su proturječni pa se tako bilježi učinak inhibicije taloženja<sup>32</sup>, promocije taloženja pri niskim koncentracijama i inhibicije pri visokim koncentracijama<sup>31</sup> te slab učinak ili njegov izostanak pri visokim koncentracijama aminokiselina.<sup>29</sup> Pri tome je kod jednih autora zapaženo da dodatak aminokiselina potiče stvaranje COM, a sprječava nastanak COT i COD<sup>31</sup>, dok kod drugih autora aminokiseline stimuliraju stvaranje COD, a inhibiraju nastanak COM.<sup>29</sup> Zabilježeno je da neke

aminokiseline (glutaminska kiselina, glicin, lizin) inhibiraju proces nukleacije COM, neke druge aminokiseline (prolin, alanin, valin, asparaginska kiselina) djeluju kao njegovi katalizatori dok serin i fenilalanin pokazuju neznatan učinak na nukleaciju.<sup>34</sup> Potvrđeno je inhibicijsko djelovanje aminokiselina na rast kristala COM koje ovisi o njenoj strukturi i povećava se s povećanjem koncentracije aminokiseline (glicin < alanin < prolin < asparaginska kiselina < glutaminska kiselina).<sup>35,36</sup>

Istraživanja provedena u sustavima u kojima je bila povišena koncentracija oksalata pokazala su da povišena koncentracija oksalata favorizira stvaranje COM.<sup>37</sup> Pri tom na morfologiju i svojstva tako nastalog COM utječu koncentracija i način miješanja taložnih komponenata, pH i temperatura.<sup>38</sup> Osim ovih izdvojenih istraživanja, pregledom dosadašnje literature nije zabilježeno sustavno istraživanje spontanog taloženja kalcijevih oksalata i utjecaja aminokiselina u uvjetima hiperoksalurije.

Cilj predloženih istraživanja je razlučiti utjecaj aminokiselina za koje se smatra da su relevantne za patološku biomineralizaciju kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije. Odabrane aminokiseline, Gly, Ala, Phe, His, Cys, Ser, Asp, nalaze se u sastavu urina zdravih i osoba sklonih stvaranju bubrežnih kamenaca. U tu svrhu istraživanja taloženja hidrata kalcijevih oksalata provedena su u jednostavnim sustavima, kompleksnijim sustavima, kao i u umjetnom urinu, bez dodatka i uz dodatak aminokiselina.

Na temelju rezultata strukturne i morfološke analize taloga moguće je procijeniti ulogu kompleksnosti kemijskog sastava taložnog sustava, kao i način interakcije te promotorsko i/ili inhibicijsko djelovanje odabranih aminokiselina na proces nastajanja hidrata kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije.

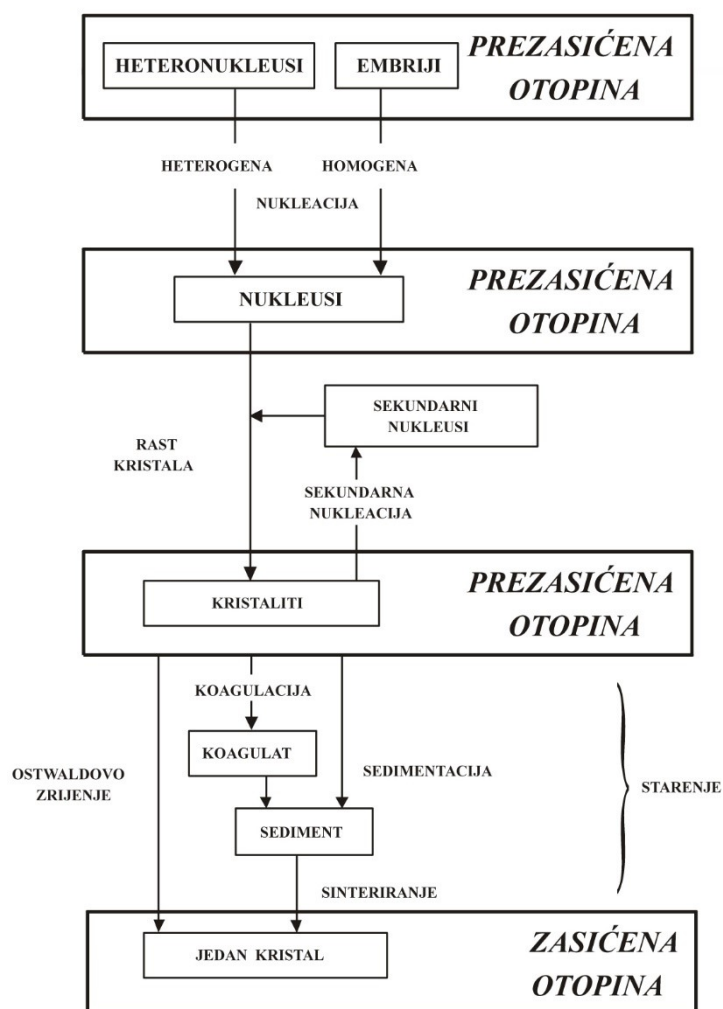
## **2. LITERATURNI PREGLED**



## 2.1. Taložni procesi

Taloženje podrazumijeva stvaranje nove, čvrste faze koja se izdvaja iz otopina. Uz pogodan izbor reagensa i taložnih uvjeta (koncentracija reaktanata, omjer reaktanata, pH, ionska jakost, temperatura, način i brzina miješanja...) iz kompleksnih homogenih smjesa moguće je istaložiti čitav niz kemijskih spojeva u čvrstom stanju. Taloženje čvrste faze s kristalnom strukturom nazivamo kristalizacija. Ti procesi su vrlo važni za čitav niz znanstvenih grana, ali i tehnologije počevši od kemije, farmacije, biologije, metalurgije do industrije.

Taložni procesi se zbivaju u nekoliko međufaza čiji se slijed može prikazati Nielsenovom shemom<sup>39</sup> taložnih procesa (slika 1).



Slika 1. Nielsen-ova shema mogućih stanja i međufaza uključenih u procese taloženja.<sup>39,40</sup>

Kao što je vidljivo iz **slike 1**, taloženje započinje iz prezasićene otopine, izdvajanjem čvrste faze (heteronukleusi ili embriji). Energetski najnestabilniji stupanj s obzirom na spontanost reakcije je nukleacija jer dolazi do izdvajanja čvrste faze iz vrlo nestabilne (prezasićene) otopine. Nukleacija se može zbivati na česticama nečistoća koje se nalaze u otopini (heterogena nukleacija) ili stvaranjem ionskih ili molekulskih asocijata ili nukleusa (homogena nukleacija). Nakon što su stvoreni nukleusi, proces se nastavlja rastom stvorenih nukleusa i nastajanjem kristala. Rastu samo oni nukleusi koji su dosegli određenu kritičnu veličinu (kritični nukleus). Drugi proces u nizu je rast kristala. To je zapravo zajednički naziv za niz temeljnih procesa koji se zbivaju na određenoj udaljenosti od same površine kristala, ali i na samoj površini. Kako je riječ o slijednim procesima, najsporiji od njih kontrolira ukupnu brzinu rasta.

Rast nukleusa u kristale ponekad je praćen nastajanjem novih sekundarnih nukleusa, zbog čega su u otopini prisutni kristali različitih dimenzija. Kristali mogu postojati u stabilnoj suspenziji ili mogu koagulirati.

Taloženje završava starenjem čvrste faze koje se zbiva u uvjetima bliskim ravnotežnima i njima se smanjuje ukupna energija sustava. Pojmom starenja obuhvaćen je niz procesa kao što su na primjer Ostwaldovo zrenje, agregacija, transformacija metastabilnih faza, itd. Teorijski, starenje taloga rezultira jednim jedinim kristalom u ravnoteži s otopinom, no ako se taloženje prati u nekom konačnom vremenu, sedimentacija je posljednja faza procesa. Ako se sustav prati duže vrijeme vidljivo je da se manje čestice otapaju, a veće dalje rastu. Termodinamički gledano, sustav nije stabilan dok se ne istaloži sav suvišak otopljene tvari u odnosu na topljivost. Time je taloženje i teoretski završeno.<sup>41</sup>

Pri taloženju teško topljivih anorganskih soli iz vodenih otopina, proces vrlo često započinje daleko od ravnotežnih uvjeta, tako da se nukleacija, rast kristala i starenje, odvijaju brzo i istovremeno. Ova činjenica prilično otežava izučavanje mehanizama koji kontroliraju procese taloženja, posebno zato što u velikom broju taložnih sustava kinetički faktori dominiraju u odnosu na termodinamičke, tako da inicijalno dolazi do formiranja termodinamički nestabilne čvrste faze, koja kasnije transformira u stabilnu modifikaciju. Usprkos tome, pažljivim ugađanjem eksperimentalnih uvjeta moguće je naglasiti pojedini od procesa, analizirati kinetičke parametre te donositi zaključke o mehanizmima proučavanih procesa. Spoznaja o kontrolnim mehanizmima taložnih procesa kao što su: veličina čestica, morfologija, kemijski i mineraloški sastav jest osnova racionalnom pristupu pripreme materijala novih fizikalnih i kemijskih svojstava. Najvažniji faktori koji utječu na svojstva taloga su pokretačka sila procesa koja se obično izražava kao prezasićenost, zatim temperatura, masena koncentracija i

kemijsko fizička svojstva suspendiranih nečistoća te koncentracija i kemijsko fizička svojstva otopljenih nečistoća i aditiva.

Da bi uopće nastali nukleusi nove faze, mora se prijeći energetska barijera - kritična prezasićenost. Prezasićenost ( $S$ ) se može definirati:

$$\ln S = \frac{\Delta\mu}{RT} \quad (1)$$

gdje je  $R$  opća plinska konstanta,  $T$  termodinamička temperatura, a  $\Delta\mu$  je razlika kemijskog potencijala otopljene tvari u prezasićenoj otopini,  $\mu_1$ , i kemijskog potencijala otopljene tvari u ravnoteži s kristalom u otopini,  $\mu_2$ :

$$\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2 \quad (2)$$

Uobičajeno je kemijski potencijal izraziti kao:

$$\mu = \mu^\circ + RT \ln a \quad (3)$$

gdje je  $\mu^\circ$  standardni kemijski potencijal otopljene tvari, te  $a$  aktivitet otopljene tvari. Kombiniranjem jednadžbi (1), (2) i (3) moguće je definirati prezasićenost kao stupanj zasićenosti:

$$S = \frac{a}{a_s} \quad (4)$$

pri čemu je  $a$  aktivitet otopljene tvari u prezasićenoj otopini i  $a_s$  aktivitet otopljene tvari u ravnoteži.

Aktivitet se izražava kao  $a = \gamma \frac{c}{c^\circ}$  gdje je  $\gamma$  koeficijent aktiviteta,  $c$  koncentracija otopljene tvari, a  $c^\circ = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Koeficijent aktiviteta,  $\gamma$ , označava odstupanje realne otopine od idealne, u kojoj konstituirajući ioni međusobno ne djeluju jedni na druge te je vrijednost  $\gamma$  za idealnu otopinu jednaka 1.

Za taloženje dvokomponentne ionske soli  $A_\alpha B_\beta$  pri konstantnoj temperaturi i tlaku prezasićenost se može izraziti kao:

$$S = \left( \frac{a_A a_B}{K_{sp}} \right)^{1/(\alpha+\beta)} \quad (5)$$

gdje je,  $K_{sp}$  stehiometrijska konstanta ravnoteže, poznata i pod nazivom “produkt topljivosti”, a definirana je koncentracijama otopljenih ionskih vrsta u otopini, odnosno množinskim udjelom sastojaka ili parcijalnim tlakom plinova. Za gornju je reakciju (5) ova konstanta definirana kao:

$$K_{sp} = (c(A^{a+}))^\alpha \cdot (c(B^{b-}))^\beta \quad (6)$$

U praksi, prezasićena otopina se može prirediti iz zasićene ili podzasićene otopine, promjenom temperature ili pH, dodatkom slabog otapala u otopinu jakog otapala, ili odgovarajućom kemijskom reakcijom. Najčešće su u pitanju kemijske reakcije taložnih komponenti otopljenih u različitim otopinama, ali mogu se primijeniti i reakcije između otopine i plina ili otopine i krutine.

Mnogo eksperimenata je napravljeno da bi se odredila maksimalna stabilna prezasićenost – granica metastabilnosti ili kritična prezasićenost. Treba naglasiti da kritična prezasićenost ovisi o dužini trajanja i vrsti eksperimenta, što je bitno pri usporedbi rezultata dobivenih za različite sustave. Kritična prezasićenost može se postići izotermno, kontinuiranim ili diskretnim povećavanjem koncentracije (direktnim miješanjem reaktanata) ili pothlađivanjem uz konstantnu koncentraciju.

Velik broj svojstava (uglavnom termodinamičkih) elektrolitnih otopina ovisi o prezasićenosti, druga pak (kinetička i kemijska) ovise i o odnosu koncentracija reaktanata. Stoga je potrebno ispitati široko područje koncentracija reaktanata da bi se dobila pouzdana informacija o taloženju iz otopine. Podaci dobiveni na taj način mogu se prikazati u obliku taložnih krivulja prikazivanjem mjerene veličine (turbiditet, morfologija, itd.) u ovisnosti o koncentraciji jedne komponente pri konstantnoj koncentraciji druge. Serija takvih krivulja različitih konstantnih koncentracija može poslužiti za konstrukciju taložnog dijagrama.<sup>42</sup>

## 2.2. Utjecaj aditiva na taloženje

Nečistoće su tvari, ioni ili molekule, koje se nalaze u otopini, a nisu taložne komponente za određenu čvrstu tvar. Teško je izbjeći nečistoće u otopini, stoga je i homogena nukleacija vrlo rijedak slučaj. Nečistoće djeluju na kemijski sastav čvrste faze, ali i na oblik i veličinu čestice kao i na samu kinetiku taloženja. Međutim, osim nečistoća koje se uobičajeno mogu pronaći u otopini, ponekad se dodaju supstance u vrlo malim količinama za poboljšavanje svojstva ili radi stabilizacije konačnog produkta. Te se tvari nazivaju aditivi.

Učinak aditiva ovisi o njihovoj vrsti i koncentraciji. Kod procesa kristalizacije, aditivi mogu imati utjecaj na morfologiju kristala, odnosno na promjenu ravnotežnog oblika kristala. Razumijevanje mehanizama interakcija aditiva s nastajućom krutom fazom od velike je važnosti za sve procese u kojima su oblik i veličina kristala važni. Taloženje iz prezasićene otopine u koju su dodani aditivi više nije uzrokovano samo svojstvima te otopine, već i prisutnošću aditiva. Kada su: prezasićenost, omjer koncentracija reaktanata, pH, temperatura i način miješanja konstantni, aditivi preuzimaju kontrolu nad taložnim procesom.<sup>43</sup> Aditivi se adsorbiraju na aktivnim mjestima površine kristala i smanjuju slobodnu energiju površine kristala. Postoje brojni načini proučavanja utjecaja aditiva, a jedan od njih je uspoređivanje morfologije istaloženih kristala s i bez aditiva. Tako se određuje specifična adsorpcija na kristalne plohe. Što je veća brzina rasta u smjeru okomitom na kristalnu plohu, to će ploha biti manja.<sup>30</sup> Također je moguće da se u prisutnosti aditiva pojave nove kristalne plohe. Rezultat interakcije bit će promjena habitusa kristala. Na malim i kompaktnim kristalima aditivi se mogu jednoliko adsorbirati na svim plohama. U tom slučaju neće biti vidljive promjene habitusa, ali će rast i otapanje malih kristala, te transformacija metastabilnih faza biti inhibirani.

U taložnim sustavima, efekt aditiva se očituje u inhibiciji i/ili promociji nukleacije, rasta, otapanja, agregacije i transformacije metastabilnih faza.

Aditivi se koriste u industrijskim procesima za inhibiranje, ubrzavanje ili modificiranje taloženja. Oni imaju važnu ulogu u kontroli biološke i inhibiciji patološke mineralizacije.

## 2.3. Kalcijevi oksalati

Oksalati su široko rasprostranjeni spojevi na Zemlji. U biljkama oksalate pronalazimo u obliku oksalne kiseline ili različitih soli natrija, kalija, magnezija i/ili kalcija. Osim patogenog djelovanja, kalcijev oksalat je najčešći slabo topljivi mineral koji se nalazi u višim biljkama.<sup>44-47</sup>

U prirodi postoje tri hidratna oblika kalcijeva oksalata: termodinamički stabilan kalcijev oksalat monohidrat (vevelit)<sup>9,10</sup>, metastabilan dihidrat (vedelit)<sup>11-13,19</sup> te također metastabilan trihidrat (kaoksit).<sup>14,15</sup>

U **tablici 1** dane su kemijske formule i skraćenice te vrijednosti produkta topljivosti kalcijevih oksalata na 37 °C.<sup>48-50</sup>

**Tablica 1.** Produkti topljivosti kalcijevih oksalata na 37 °C.

Naziv	Formula	$K_{sp}$
kalcijev oksalat monohidrat, COM	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,26 \cdot 10^{-9}$
kalcijev oksalat dihidrat, COD	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$3,63 \cdot 10^{-9}$
kalcijev oksalat trihidrat, COT	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$8,20 \cdot 10^{-9}$

### 2.3.1. Kalcijev oksalat monohidrat, COM

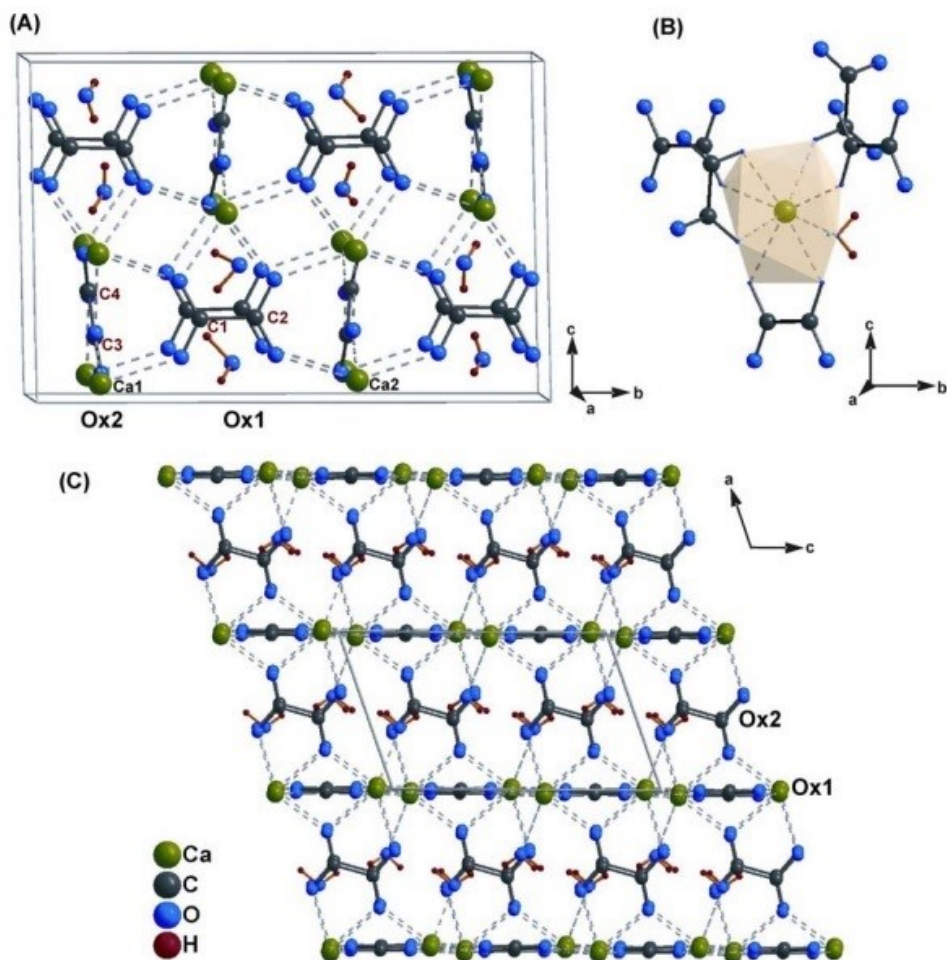
COM najčešće kristalizira u dvije monoklinske strukture:

1) osnovnoj, visokotemperaturnoj, koja je stabilna iznad 45 °C ( $a = 9,978 \text{ \AA}$ ,  $b = 7,295 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,292 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 107,07^\circ$ ,  $Z = 8$ ,  $V = 876,228 \text{ \AA}^3$ , prostorna grupa  $I2/m$ ). Gledajući duž smjera [100] kristalna struktura se sastoji od naslaganih planarnih slojeva iona kalcija i oksalata u omjeru 2:1, koji se izmjenjuju sa slojevima oksalata i molekula vode u položaju paralelnom s ravninom (010).<sup>51-53</sup>

2) niskotemperaturnoj, stabilnoj ispod 45 °C ( $a = 9,9763 \text{ \AA}$ ,  $b = 14,5884 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,29134 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 107,05^\circ$ , prostorna grupa  $P2_1/c$ ). Oksalati u (010) ravnini su pretrpjeli malu distorziju, pa se duljina osi  $b$  podvostručila a simetrija smanjila.<sup>51-52</sup>

Prijelaz iz osnovne strukture (visokotemperaturne) u niskotemperaturnu događa se u temperaturnom rasponu od 38 – 45 °C.

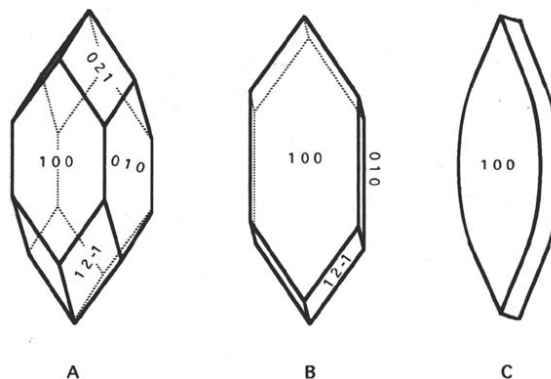
Postoji i treća struktura, rompska, koja isključivo nastaje dehidracijom dihidrata (COD) u temperaturnom području od 118 - 130 °C.<sup>53</sup> Ima rompsku simetriju s parametrima:  $a = 12,088 \text{ \AA}$ ,  $b = 10,112 \text{ \AA}$ ,  $c = 14,634 \text{ \AA}$ .



**Slika 2.** Kristalna struktura COM (A), oksalatni ioni koordinirani na kalcijeve ione u poliedar (B) slaganje kalcijevih i oksalatnih iona duž [100] smjera (C).<sup>54</sup>

Koordinacijski poliedar pseudo-ekvivalentnih Ca1 i Ca2 iona je distorzirana kvadratna antiprizma (**slika 2 (A)**). U poliedarskoj strukturi, atom kalcija je koordiniran s osam atoma kisika od kojih sedam potječe od ukupno pet oksalatnih iona ( $C_2O_4^{2-}$ ), a jedan od molekule vode. Na **slici 2 (B)** se vidi da su na kalcij dva oksalatna aniona vezana bidentatno (s obje karboksilne skupine), a tri su vezana monodentatno (s jednom karboksilnom skupinom). Ox1 i Ox2 nisu kristalografski ekvivalentni (**slika 2 (C)**). Šest kalcijevih iona u ravnini (100) planarno su koordiniran sa Ox1. Četiri kalcijeva iona koordinirana su s Ox2, te su vodikovim vezama povezani s dvije molekule vode. Ox2 i voda se izmjenjuju i formiraju vrpce koje leže u (010) ravnini duž c osi. Ca-Ox1 slojevi su povezani jedan s drugim preko Ox2 i molekula vode. Kristalna struktura COM sastoji od iona kalcija koji su koordinirani paralelno (Ox1) i okomito (Ox2) oksalatnim ionima unutar ravnine (100).

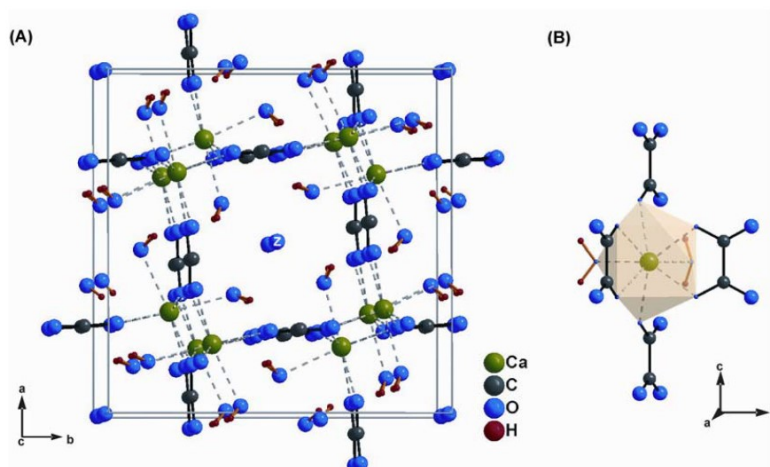
Neke od karakterističnih morfologija kristala COM prikazane su na **slici 3** s pripadajućim *hkl* indeksima pojedinih ploha.<sup>53</sup>



**Slika 3.** Morfologija kristala COM: A - prizmatični kristal, B - pločasti kristal, C - kristal oblika suze.

### 2.3.2. Kalcijev oksalat dihidrat, COD

COD kristalizira u tetragonskom sustavu s parametrima jedinične ćelije:  $a = 12,371 \text{ \AA}$ ,  $b = 14,583 \text{ \AA}$ ,  $c = 10,116 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ,  $Z = 8$ ,  $V = 1125,937 \text{ \AA}^3$ , prostorna grupa  $I4/m$ .<sup>55,56</sup> Četiri iona kalcija dihidratnog oblika formule  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  koordinirano je s osam molekula vode.

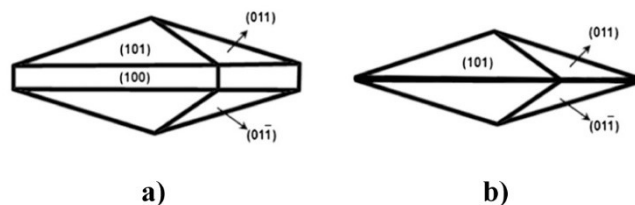


**Slika 4.** Kristalna struktura COD (A) i  $\text{Ca}^{2+}$  ion koordiniran s oksalatnim ionima u poliedar (B).<sup>54</sup>

Kalcijev ion je koordiniran s osam atoma kisika koji potječu od dvije molekule vode i četiri oksalatna iona. U usporedbi s COM, ion kalcija je koordiniran s jednim oksalatom manje, ali jednom molekulom vode više (**slika 4**). Veze koje se uspostavljaju koordinacijom dvije



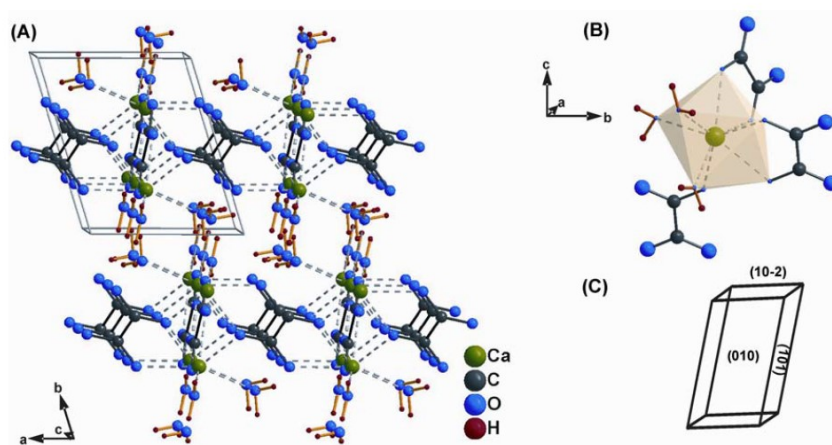
molekule vode na oksalatne kisike su vodikove veze. Oksalati tvore kanale koji prolaze kroz kristal i sadrže molekule vode (zeolitna voda označena sa Z na **slici 4**). Kristali COD koji nastaju u vodenoj otopini imaju oblik tetragonalne bipiramide s dominantnom (101) ravninom i/ili tetragonalne bipiramide s prizmom s karakterističnom (100) ravninom (**slika 5**).<sup>17,57-59</sup>



**Slika 5.** Morfologija COD kristala a) tetragonalna bipiramida s prizmom b) tetragonalna bipiramida.

### 2.3.3. Kalcijev oksalat trihidrat, COT

COT kristalizira u triklinskom sustavu s parametrima jedinične ćelije:  $a = 12,371 \text{ \AA}$ ,  $b = 14,583 \text{ \AA}$ ,  $c = 10,116 \text{ \AA}$ ,  $Z = 8$ ,  $\alpha = 76,5^\circ$ ,  $\beta = 70,35^\circ$ ,  $\gamma = 70,62^\circ$ ,  $V = 325,9 \text{ \AA}^3$ , prostorna grupa  $P\bar{1}$ .<sup>60</sup> Tri od osam kisikovih atoma koordiniranih oko iona kalcija potječu od molekule vode, četiri atoma od dva oksalatna iona, dok jedan potječe od trećeg oksalatnog iona. To znači da sveukupno u koordinaciji imamo tri oksalatna iona i tri molekule vode (**slika 6**).



**Slika 6.** Kristalna struktura COT (A) Ca<sup>2+</sup> ion koordiniran s oksalatnim ionima (B) pravilni triklinski oblik kristala COT (C).<sup>54</sup>

## 2.4. Biomineralizacija

Većina definicija kojima se opisuje pojam biomineralizacije odnosi se na formiranje čvrste, nove faze, najčešće anorgansko - organskih minerala s fascinantnom morfologijom i specifičnim svojstvima, a koja se zbiva u živim organizmima.<sup>41,61,62</sup> Nukleacija, rast, vrsta polimorfa i orijentacija anorgansko - organskih minerala kontrolirani su i to najčešće organskom matricom. Neki od biominerala pronađenih u prirodi (**tablica 2**) jesu visoko organizirani anorgansko - organski materijali s izvanrednim svojstvima i funkcijama. Jedan od najistraživanijih biominerala je  $\text{CaCO}_3$ <sup>63-69</sup> zatim slijede fosfati.<sup>70-74</sup>

**Tablica 2.** Primjeri anorganskih minerala u biološkim sustavima.

MINERAL	ANORGANSKI SASTAV	ORGANIZAM	FUNKCIJA
Kalcit, aragonit	$\text{CaCO}_3$	školjkaši	egzoskelet
		sisavci	statokonij - gravitacijski receptor
Hidroksiapatit (HAP)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot (\text{OH})$	kralježnjaci	endoskelet, zubi
Fluorapatit (FAP)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot (\text{F})$	morski psi	zubna caklina
Gips	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	meduze	gravitacijski receptor
Silika	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	dijatomeje, radiolarije	egzoskelet
Magnetit	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	bakterije	receptor za magnetsko polje
Ferihidrit	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	kralježnjaci	spremnici željeza
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	kralježnjaci	zubna caklina, kosti

Izvanredna svojstva i funkcije biominerala potiču znatizelju istraživača već dugi niz godina te stoga izučavanje biomineralizacije obuhvaća znanstvena područja i biologije i znanosti o materijalima. Kemijski sastav, struktura, većina kemijskih i fizikalnih svojstava biominerala su poznati, međutim fiziološki procesi koji upravljaju njihovim nastajanjem još uvijek nisu do kraja razjašnjeni.

U posljednje vrijeme, biomineralizacija se izučava kao zasebno područje bioanorganske kemije, ali također postaje i sve raširenije područje istraživanja koje se naziva biomimetička kemija. Biomimetička kemija bazira se na proučavanju modelnih sustava koji se svojom

funkcionalnošću i sastavom približuju realnim biološkim sustavima. Zahvaljujući navedenom području, fizikalno-kemijski principi nukleacije i rasta kristala važni za biomineralizaciju postaju jasniji, a spoznaje biomimetičkih istraživanja omogućuju sintezu novih materijala nanometarskih veličina.<sup>75-77</sup> Izvrstan primjer je fluoroapatit, spoj koji imitira i daje jasniju sliku vrlo kompleksnog procesa formiranja kostiju i zubi.<sup>78-80</sup> Sustavno istraživanje evolucije i interakcije organskih komponenti s anorganskim fazama ključni su za biomineralizaciju, ali i za razvoj bioloških materijala. U pojednostavljenim modelnim sustavima, sintetički polimeri s poznatim funkcijama, strukturama i kemijskom reaktivnošću jesu dobar izbor za razumijevanje organsko-mineralnih (anorganskih) interakcija.

## 2.5. Patološka biomineralizacija

Biomineralizacija se može definirati kao fiziološka i/ili patološka te je nužno dobro poznavanje fiziološke biomineralizacije kako bi se što bolje objasnili mehanizmi patološke biomineralizacije. Neki primjeri patološki mineraliziranih anorganskih minerala prikazani su u **tablici 3**. Kalcijevi oksalati se u normalnim fiziološkim uvjetima nalaze u tkivima biljaka, međutim u ljudi i životinja se pojavljuju kao patološki mineralizirane tvorbe.<sup>81-84</sup> Svi navedeni primjeri anorganskih minerala u stalnom su kontaktu s tjelesnim tekućinama koje su izuzetno kompleksne, imaju visoku ionsku jakost, sadrže biološke makromolekule, male organske molekule i anorganske ione. Mehanizmi i uvjeti pri kojima nastaju spomenuti kamenci još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Urolitijaza je oblik patološke biomineralizacije, a u novije vrijeme se naziva i „bolest civilizacije“. To je bolest kod koje dolazi do nastajanja kamenaca u različitim dijelovima bubrega i mokraćnog sustava.<sup>3,87</sup>

**Tablica 3.** Primjeri patološki mineraliziranih anorganskih minerala u biološkim sustavima.

<b>PATOGENI BIOMINERAL</b>	<b>ANORGANSKI SASTAV</b>	<b>MINERAL</b>	<b>KEMIJSKA FORMULA</b>
Bubrežni kamenci	oksalati	Kalcijev oksalat monohidrat (COM)	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
		Kalcijev oksalat dihidrat (COD)	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
		Kalcijev oksalat trihidrat (COT)*	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
	fosfati	Kalcijev fosfat (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
		Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
		Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Žučni kamenci	oksalati, fosfati i karbonati	COM	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Kamenci u nosnoj šupljini, rinoliti		TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Kamenci u žlijezdama slinovnicama		Kalcijev karbonat (CC)	$\text{CaCO}_3$
Karijes na zubnom plaku	fosfati i karbonati	TCP, DCPD, OCP, CC	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CaCO}_3$
* većinom se ne pojavljuje u bubrežnim kamencima, ali se smatra prekursorima nastanka COM i/ili COD <sup>85,86</sup>			

### 2.5.1. Urolitijaza

Na pojavu i učestalost bubrežnih kamenaca mogu utjecati genetski, nutritivni i ekološki čimbenici. Utvrđeno je da će se kod 12 % muškaraca i 5 % žena razviti bolest bubrežnih kamenaca u dobi do 70-te godine života. Učestalost pojave bubrežnih kamenaca podjednaka je za oba bubrega, a kod 40 % bolesnika prisutni su kamenci u oba bubrega. Prema zadnjim svjetskim i nacionalnim epidemiološkim podacima uočen je izraziti porast pojave bubrežnih kamenaca u industrijaliziranim zemljama nakon Drugog svjetskog rata što se povezuje s povećanjem standarda i promjenama u prehranbenim navikama.<sup>5</sup>

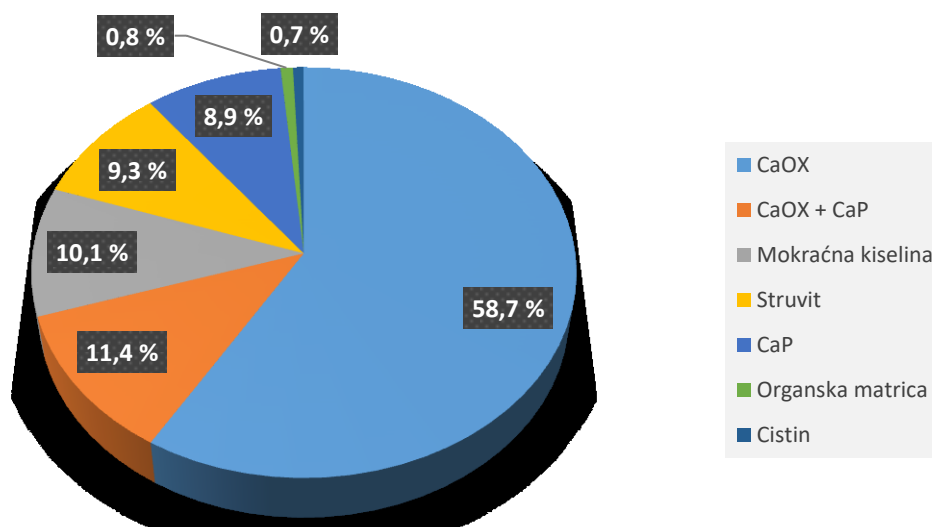
U prevenciji urolitijaze vrlo važnu ulogu imaju prehrana i životni stil. Svakako se preporuča hidratacija koja potiče mokrenje i na taj se način povećava volumen i smanjuje zasićenost urina. Preporuča se i smanjeni unos soli, natrijeva klorida, čiji prekomjerni unos može uzrokovati povećano izlučivanje kalcija, a smanjeno oksalata. Također, potrebno je limitirati unos hrane bogate purinom.

### 2.5.2. Bubrežni kamenci

U novije vrijeme uslijed povećane pojave bubrežnih kamenaca obnovio se interes znanstvenika za razjašnjavanje patofiziologije stvaranja kamenaca s osobitim osvrtom na oksalatne kamence. Na **slici 7** prikazan je sastav bubrežnih kamenaca. Analizom je potvrđeno da su bubrežni kamenci smjesa kalcijevih soli oksalata, fosfata i mokraćne kiseline (**tablica 3, slika 7**). Oko 70 % svih bubrežnih kamenaca sastoji se samo od kalcijevih oksalata ili u smjesi s kalcijevim fosfatima.<sup>88</sup>

Najčešći hidratni oblik kalcijeva oksalata koji se nalazi u bubrežnim kamencima je kalcijev oksalat monohidrat, a zatim slijedi kalcijev oksalat dihidrat.<sup>89</sup> Između ova dva hidratna oblika, monohidrat je više patogen obzirom da se može naći u urinu osoba koje su sklone stvaranju kamenaca, a dihidrat je više fiziološki obzirom da se može naći u urinu zdravih osoba.<sup>90-92</sup>

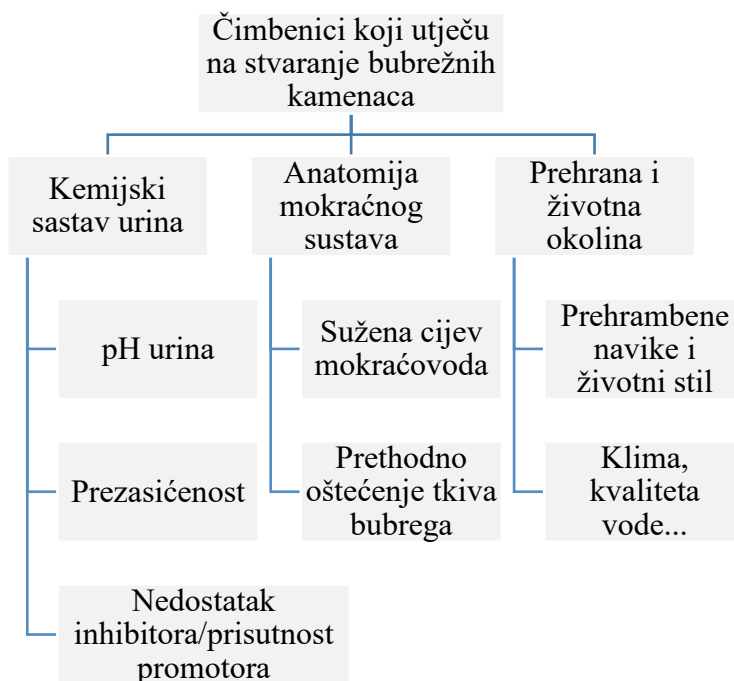
Trihidrat se rijetko može naći u sastavu bubrežnih kamenaca, te se smatra prekursorom za nastajanje monohidrata i dihidrata.<sup>85,86</sup> Kalcijevi fosfati prisutni su u obliku apatita (hidroksiapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ili karbonatni apatit,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)$ ) te ponekad kao brušit ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Struvit ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) je čest u sastavu fosfatnih kamenaca. Urati u bubrežnim kamencima su rijetka pojava (oko 10 % svih bubrežnih kamenaca sastoji se od urata).<sup>93</sup> Rjeđi oblici su kamenci mokraćne kiseline i cisteinski kamenci.<sup>94</sup> Cisteinski kamenci se vrlo lako prepoznaju po svojim karakterističnim okruglim oblicima, heksagonalnom obliku i po žutoj boji.



**Slika 7.** Sastav bubrežnih kamenaca<sup>88</sup>

Legenda: OX – oksalati; P – fosfati

Na **slici 8.** spomenuti su neki od uvjeta i čimbenika koji pogoduju stvaranju kamenaca.<sup>93</sup>



**Slika 8.** Shematski prikaz faktora koji utječu na stvaranje bubrežnih kamenaca.

Oksalatni kamenci mogu nastati kao produkt promjene kemijskog sastava urina usljed različitih metaboličkih poremećaja kao što su hiperkalciurija, hipocitraturija, hiperoksalurija ili promjena kiselosti urina.

### 2.5.3. Hiperkalciurija

Hiperkalciurija je čest metabolički poremećaj koji se javlja kod oko 60 % osoba s bubrežnim kamencima. Hiperkalciurija se najčešće definira kao stanje kad je izlučena dnevna količina kalcija u urinu viša od 7,5 mmol kod muškaraca, a 6,2 mmol kod žena. S patogenetskog aspekta hiperkalciurija je važna kod stvaranja kalcijevih kamenaca jer povećava koncentraciju kalcija u urinu i zasićenje s obzirom na nastajanje kalcijevih oksalata i fosfata. Osim toga, hiperkalciurija može smanjiti aktivnost inhibitora za kristalizaciju kalcijevih soli zbog njihovog vezivanja na kalcijeve ione.<sup>95-97</sup>

### 2.5.4. Hiperoksalurija

Hiperoksalurija je metabolički poremećaj pojačanog izlučivanja oksalata urinom. Oksalna kiselina je relativno jaka kiselina, a može nastati u organizmu na nekoliko načina. Jedan način je stvaranje oksalne kiseline iz serina i etanolamina, drugi način je iz hidroksiprolina, zatim iz glicina, a male količine nastaju izravnom sintezom iz askorbinske kiseline. Zdrave osobe na uobičajenoj prosječnoj dijete izlučuju urinom 20 do 40 mg (0,22 do 0,44 mmol) iona oksalata na dan. Povećani unos hrane bogate oksalatima povećava njihovo izlučivanje urinom na 50 do 60 mg (0,56 do 0,67 mmol) na dan. Hiperoksalurija pridonosi stvaranju kamenaca tako što povećava zasićenje urina s obzirom na nastajanje kalcijeva oksalata. Poremećaj se može javiti kao primarna ili sekundarna hiperoksalurija.<sup>98</sup>

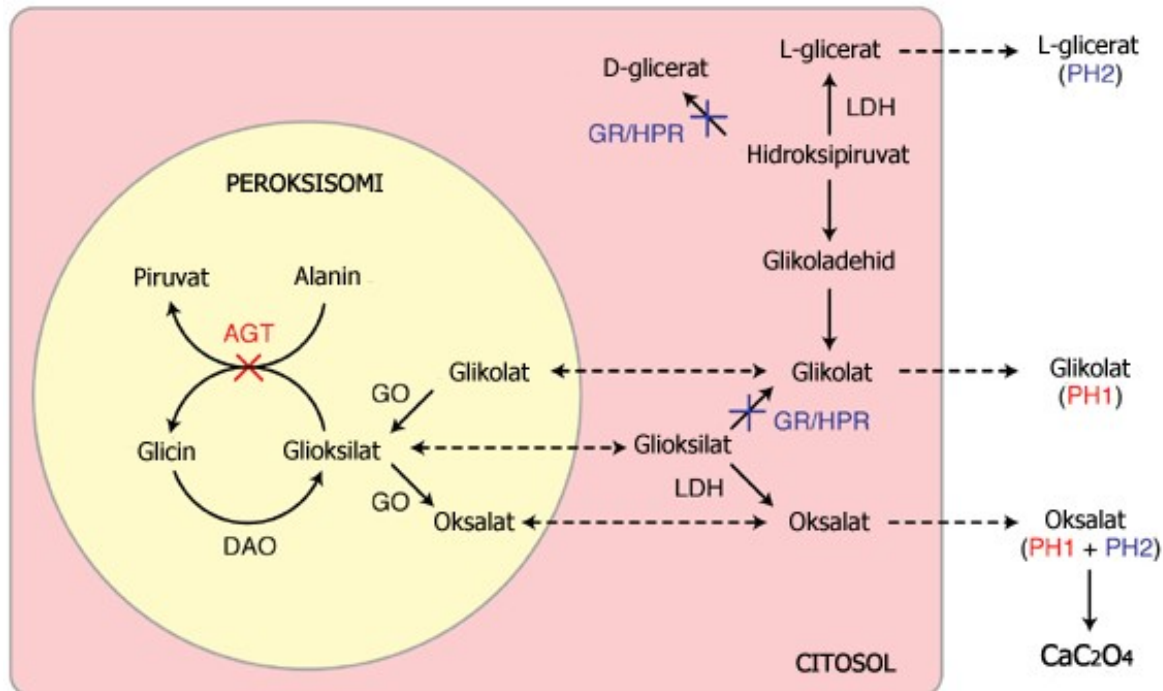
Primarna hiperoksalurija javlja se rjeđe, a javlja se i kod djece.<sup>99</sup> Predstavlja urođenu bolest kod koje dolazi do prekomjernog stvaranja i izlučivanja oksalata u rasponu od 135 do 270 mg (1,35 do 3,00 mmol) na dan. Zbog tih razloga dolazi do pojave izrazite kristalurije i stvaranja kamenaca. Razlikuju se dva tipa primarne hiperoksalurije.<sup>100</sup>

Tip I (PH1) nastaje zbog smanjene aktivnosti jetrenog enzima alanin-glioksalat-transferaze (AGT) uslijed čega dolazi do pojačanog stvaranja glioksalata koji se ireverzibilno pretvara u oksalnu kiselinu (**slika 9**). Poremećaj u radu enzima AGT u peroksisomima jetre onemogućava transaminaciju glioksilata u glicin te dolazi do oksidacije u oksalat. Glicin se opet može deaminirati u reakciji kataliziranom enzimom *D*-aminokiselina oksidazom (DAO). Moguće je da se glioksilat reducira u glikolat s enzimom glioksilat-hidroksipiruvat

reduktazom (GR-HPR). Glioksilat se također može oksidirati u glikolat u reakciji kataliziranom enzimom glikolat-oksidadom (GO) ili se pak glioksilat transportira u citosol gdje se u reakciji kataliziranom s enzimom laktat-dehidrogenazom (LDH) oksidira u oksalat. Smatra se da se koncentracija oksalata može smanjiti inhibicijom enzima glikolat-oksidade (GO) što bi direktno dovelo do blokiranja nastanka glioksilata iz glikolata i neposredno bi se smanjilo nastajanje oksalata.

Tip II (PH2) se javlja rijeđe, najčešće u ranijoj životnoj dobi kao posljedica nedostatka ili odsutnosti enzima glioksilat reduktaze-hidroksipiruvat reduktaze (GR-HPR) što za posljedicu ima inhibiciju reakcije redukcije glioksilata u glikolat te hidroksipiruvata u *D*-glicerat u citosolu. Ta pojava uzrokuje prekomjerno stvaranje *L*-glicerata u citosolu, odnosno povećane koncentracije oksalata u organizmu. Iz hidroksipiruvata u enzimskoj reakciji dekarboksilacije s hidroksipiruvat dekarboksilazom nastaje glikoladehid koji se nadalje može oksidirati u glikolat (slika 9).<sup>100</sup>

Sekundarna hiperoksalurija je češća, a kao uzrok spominje se pojačana apsorpcija oksalata u crijevima tzv. crijevna hiperoksalurija. Kod nje se može povećati količina oksalata u urinu iznad 100 mg (1,11 mmol) na dan i ona je dosta česti uzrok stvaranju kamenaca.<sup>101</sup>



**Slika 9.** Shematski prikaz nastanka primarne hiperoksalurije tip I (PH1) i tip II (PH2).





### 2.5.5. Taloženje kalcijeva oksalata pri povišenoj koncentraciji oksalata

Na području patološke biomineralizacije kalcijeva oksalata napravljena su brojna istraživanja s ciljem pronalazjenja uzroka pojave urolitijaze. Na nastajanje različitih hidratnih formi kalcijeva oksalata utječe niz čimbenika kao što su: prezasićenost, sastav otopine, omjer koncentracija kalcija i oksalata, temperatura, pH i način miješanja reakcijskih komponenata.<sup>16-</sup>

<sup>19</sup> U laboratorijskim uvjetima taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperkalciurije više je istraženo i pojašnjeno za razliku od taloženja u uvjetima hiperoksalurije. Hiperoksalurija se najčešće proučava *in vivo*.<sup>100-102</sup>

Ovisno o prezasićenosti COM taloži u nekoliko oblika: pločice (niska prezasićenost), dendriti (srednja i visoka prezasićenost) i mikrokristalični agregati (visoka prezasićenost).<sup>38,82,103</sup>

Dendritnoj morfologiji osim navedenog također pogoduju i neki aditivi: kationski i anionski surfaktanti.<sup>82</sup> Aditivi, kao što je citrat, inhibiraju nukleaciju<sup>104</sup>, rast<sup>97</sup> i agregaciju<sup>105</sup> COM. To je jedan od razloga zašto se upravo soli citrata koriste u prevenciji urolitijaze. Citratni ioni inhibiraju stvaranje COM budući da kompleksiraju  $\text{Ca}^{2+}$  ione čime se relativna prezasićenost otopine/urina snižava te smanjuju brzinu nukleacije. Nadalje, nađeno je da citratni ioni inhibiraju rast postojećih kristala COM vezanjem na površinu kristala te ometanjem vezanja kalcijevih iona na kristalnu površinu i ugradnjom na mjesta rasta. Prema nekim literaturnim izvorima, citratni ioni također smanjuju agregaciju postojećih kristala.<sup>13,97,104-106</sup>

COM najčešće taloži u smjesi s COD. U sustavima koji su miješani mehaničkim putem, smjesa COM/COD je produkt taloženja, a ukoliko se sistem magnetski miješa nastaje i COT.<sup>13,15</sup> Starenjem taloga nestabilniji COD prelazi u COM, a tu transformaciju inhibira suvišak bilo iona kalcija, bilo oksalata.<sup>18</sup>

U slučaju rasta COM na kristalnom sjemenu, utvrđeno je da je kontroliran površinskim procesima drugog reda.<sup>107,108</sup> Brzina rasta je pritom proporcionalna površini kristala raspoloživoj za rast, odnosno omjeru ukupne površine kristala i količine kristalnog sjemena.

Kinetika taloženja COD je manje istražena zbog teže pripreme u laboratorijskim uvjetima. Ukoliko se ne koriste aditivi (ili otopina umjetnog urina) COD taloži u smjesi s COM.<sup>12,13,109-</sup>

<sup>111</sup> Taloženje COD favorizira viši omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ , niska prezasićenost, te razni aditivi (citrat, magnezij,...), otopina umjetnog urina, te viši pH ( $\text{pH} \geq 6$ ).<sup>12,13,109-113</sup>

Spontanom taloženjem kalcijeva oksalata iz otopine visoke ionske jakosti (podešene s NaCl) i uz magnetsko miješanje nastaje COT (sam ili u smjesi s COM).<sup>14,15</sup> Također uz pomoć aminokiselina (Glu, Trp i Orn) u širokom koncentracijskom području COT taloži u smjesi s COM.<sup>30,31</sup>

Kinetika kristalnog rasta COT kontrolirana je površinskim procesima, drugog, trećeg ili četvrtog reda. Transformacija COT u COM odvija se direktnim prijelazom, bez dobivanja COD kao međuprodukta, a brzina transformacije povećava se povišenjem temperature.<sup>14-17,30,31</sup>

Istraživanja provedena u sustavima u kojima je bila povišena koncentracija oksalata pokazala su da povišena koncentracija oksalata favorizira stvaranje COM.<sup>37</sup> Pri tom na morfologiju i svojstva tako nastalog COM utječu koncentracija i način miješanja taložnih komponenata, pH i temperatura.<sup>38</sup> Istraživanja napravljena na pacijentima koji imaju bubrežne kamence pokazala su da povišena koncentracija oksalata također favorizira stvaranje COM, a povišena koncentracija kalcija COD.<sup>37</sup>

## 2.6. Urin

Urin je tekućina nastala procesom filtracije i reapsorpcije vode i niskomolekularnih tvari u nefronu (jedinica za pročišćavanje krvi u bubregu). Kemijski sastav urina može biti pokazatelj rizika nastanka bubrežnih kamenaca.<sup>113,114</sup> Prisutnost značajnih količina anorganskih i organskih iona, uglavnom klorida, natrija, fosfata, magnezija, bikarbonata, kalcija, oksalata, citrata i urata daje prosječnu ionsku jakost urinu oko  $0,33 \text{ mol dm}^{-3}$ . Urin zdravih osoba je blago kiseo, pH oko 6,0 a može se biti u rasponu od 4,5 do 8,0.<sup>115,116</sup> Promjene pH urina povezane su s raznim bolestima (npr. metabolički poremećaji, karcinom, bubrežni kamenci,...).<sup>117,118</sup> U urolitijazi, promjene pH se smatraju jednim od faktora nastanka bubrežnih kamenaca jer utječu na jedan ili više procesa taloženja (kristalizaciju, rast, agregaciju,...)<sup>119-121</sup> Prethodna istraživanja pokazala su da o pH ovisi koja će se vrsta bubrežnih kamenaca formirati.<sup>112,122,123</sup> Tako na primjer, pH urina iznad 6,5 povećava udio dvovalentnih i trovalentnih fosfatnih iona koji na taj način povećavaju prezasićenost s obzirom na kalcijev fosfat. Pokazano je da promjena pH može poslužiti za kvalitativno praćenje taloženja fosfata.<sup>124,125</sup> Kalcijevi oksalati talože neovisno o pH, međutim primijećeno je da COM taloži u kiselom i neutralnom, a COD u lužnatom pH području.<sup>111-113</sup>

Osim pH, na promociju i/ili inhibiciju oksalatnih kamenaca utječe još čitav niz spojeva koje se nalaze u urinu, kao što su ioni magnezij, citrat, organske mikro i makromolekule, glikozaminoglikani,...<sup>114,118,126-128</sup> Među organskim molekulama koje su sastavni dio urina treba istaknuti proteine, koji su uključeni i u sastav bubrežnih kamenaca, a količina i vrsta

aminokiselina u njihovom sastavu varira ovisno o biološkim uvjetima urolitijaze.<sup>25-28</sup> Od aminokiselina tu se nalazi svih 20  $\alpha$ -aminokiselina.

Budući da se u sastavu urina nalaze brojne anorganske i organske molekule (kao njegovi stalni sastojci ili kao sastojci samo u osoba koje stvaraju bubrežne kamence), u literaturi su pronađena istraživanja koja su provedena u uvjetima što sličnijim uvjetima u pravom urinu<sup>20-22</sup> odnosno u umjetnom urinu.<sup>23,24</sup>

### 2.6.1. Umjetni urin

Pod umjetnim urinom podrazumijevamo otopinu različitih kemikalija kojima se postižu uvjeti i kemijski sastav približan ljudskom urinu.

U **tablici 4** prikazan je sastav umjetnog urina iz nekoliko literaturnih izvora. Većina umjetnih urina u svom sastavu sadrži: natrijev i/ili kalijev klorid, natrijev sulfat, magnezijev sulfat, različite natrijeve fosfate, ureu, natrijev oksalat, kalcijev klorid i natrijev citrat. Kao što je vidljivo iz **tablice 4**, sastav umjetnog urina zbog prilagodbe određenom tipu istraživanja (taloženje kalcijeva oksalata monohidrata, dihidrata, fosfata,..) značajno odstupa od jednog do drugog literaturnog izvora. U tom smislu, dobiveni rezultati su teško međusobno usporedivi. Iz tog razloga, Burns i Finlayson<sup>24</sup> su još 1980. godine predložili sastav standardnog referentnog umjetnog urina. Unatoč tome, i novija istraživanja koja se provode u umjetnom urinu i dalje prilagođavaju sastav svojim eksperimentima i željenom cilju.<sup>23,86</sup> Sastav umjetnog urina korišten u ovoj disertaciji određen je prema referenci Burns i Finlayson<sup>24</sup> (uz potrebnu prilagodbu istraživanjima koja su tema ove disertacije) i prikazan je u **tablici 7** (vidi Eksperimentalni dio).

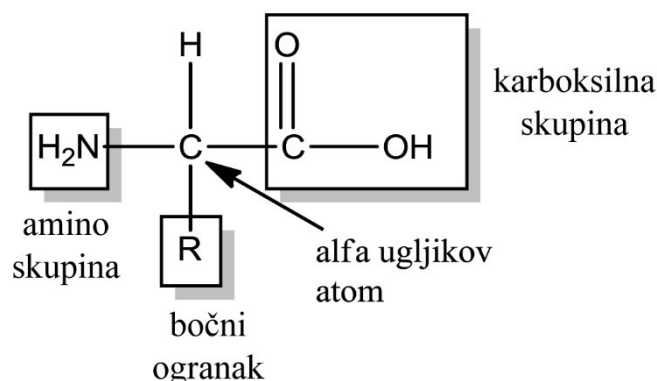
**Tablica 4.** Sastav umjetnog urina iz literaturnih izvora.

SPOJ	KONCENTRACIJA/ mmol dm <sup>-3</sup>						
	Isaacson <sup>129</sup>	Doremus <sup>48</sup>	Miller <sup>130</sup>	Barker <sup>131</sup>	Rose <sup>132</sup>	Brown <sup>12</sup>	Burns i Finlayson <sup>24</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,9	16,5	23,4	16,5	14,9	16,95	16,95
KCl	92,6	25,0	111,5	52,0	92,6	63,70	63,70
NH <sub>4</sub> Cl	65,1	20,0	59,5		65,1		27,60
NH <sub>4</sub> OH				20,0		ili HCl	17,90
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,7	2,0	8,1	2,0	6,7	3,85	3,85
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,8		4,1	13,0	1,8	32,30	32,30
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	39,6	16,5	29,9	3,5	39,6		
NaCl	213,9	170,0	158,3	170,0	213,9	105,50	105,50
Natrijev citrat	2,7	1,6	2,7	1,6	2,7	3,21	3,21
Urea	291,4	500,0		500,0	291,4		
Kreatinin		13,0		13,0			
Hipurinska kiselina		3,0		3,0			
Mokraćna kiselina				3,0			
pH	5,4	5,7		6,5	5,4	6,50	6,50

## 2.7. Aminokiseline

Aminokiseline su molekule koje sadrže amino skupinu (-NH<sub>2</sub>) i karboksilnu skupinu (-COOH). Njihova glavna biološka uloga je izgradnja proteina. Proteini su esencijalni spojevi svih živih organizama. Aminokiseline su prirodni spojevi koji u prirodi rijetko dolaze u slobodnom stanju. U proteinima se nalazi samo dvadeset vrsta aminokiselina. Sve su one, osim prolina,  $\alpha$ -aminokiseline jer su amino i karboksilne skupine vezane za isti,  $\alpha$ -atom ugljika.<sup>133,134</sup> Osim amino i karboksilne skupine, strukturu aminokiselina određuje i bočni lanac (R) koji može biti alifatski ili aromatski i može nositi funkcionalne skupine. Opća formula aminokiseline je prikazana na **slici 10**. Osim glicina, sve aminokiseline dobivene hidrolizom proteina su optički aktivne. Odnosno kada na **slici 10** R ne označava vodik, već neki alkilni ili arilni radikal,  $\alpha$ -ugljikov atom je asimetrično supstituiran, te se javlja optička aktivnost jer se model ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom. Razlikujemo dva stereoizomera, L i D - oblik. Aminokiseline koje se nalaze u proteinima, odnosno u organizmu svih živih bića, pripadaju L-obliku, prema tome, imaju jednak raspored supstituenata na  $\alpha$ -C atomu. Osim dosad već navedenih podjela, aminokiseline se mogu podijeliti i na esencijalne i

neesencijalne. Aminokiseline koje čovjekov organizam nije u stanju sintetizirati, a nužne su za njegovo funkcioniranje, nazivaju se esencijalne aminokiseline.



**Slika 10.** Opća strukturna formula aminokiseline.

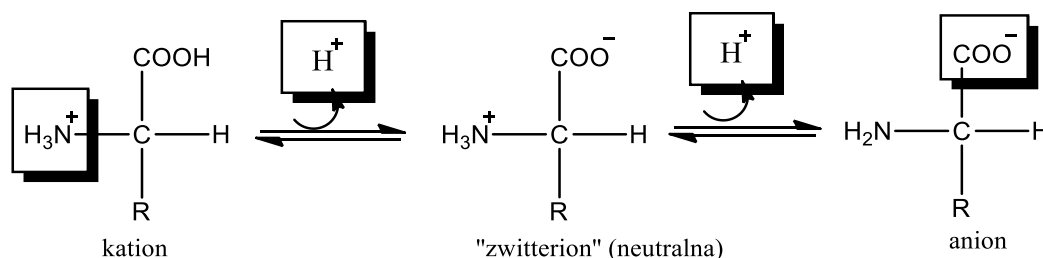
### 2.7.1. Kiselo - bazna svojstva aminokiselina

Iako aminokiseline sadrže amino i karboksilnu skupinu, neka njihova svojstva odudaraju od uobičajenih karakteristika tih skupina:

- kristali aminokiselina su nehlapljivi i raspadaju se na visokim temperaturama
- dobro topljive u vodi
- u vodenoj otopini ponašaju se kao tvari visokog dipolnog momenta
- imaju niske konstante disocijacije kiseline i baze

Navedena se fizikalno-kemijska svojstva dobro poklapaju s njihovom strukturom. Karboksilna skupina može kao kiselina disocijacijom osloboditi H<sup>+</sup> ione, a bazična amino skupina prima H<sup>+</sup> ione.

Kada su obje skupine disocirane, dobivamo formulom prikazan dipolarni ion tzv. zwitterion (**slika 11**), u tom obliku aminokiseline se nalaze u vodenoj otopini. Dodatkom H<sup>+</sup> iona (kiseline) negativno nabijena karboksilna skupina prima H<sup>+</sup> ione i postaje neutralna (bez naboja). Dodatkom OH<sup>-</sup> iona (lužine) H<sup>+</sup> ioni s amino-skupine disociraju i vežu se s OH<sup>-</sup> ionima u vodi, te dolazi do stvaranja aniona, zadnja strukturna formula aminokiseline na **slici 11**. Svaka aminokiselina u vodenoj otopini može postojati u tri oblika, kationskom, zwitterionskom i anionskom obliku. Koji je oblik favoriziran, ovisi o konstantama disocijacije karboksilne skupine, odnosno amino skupine i o pH vrijednosti otopine, tj. o koncentraciji H<sup>+</sup> iona.



**Slika 11.** Strukturni prikaz disocijacije aminokiselina.

Kod neke određene pH vrijednosti, kad se aminokiselina nalazi u dipolarnom obliku, tu vrijednost označavamo kao izoelektričnu točku. Ona se može izračunati iz  $pK$  vrijednosti kisele i bazične skupine, a negativan logaritam od vrijednosti izoelektrične točke, pojedine aminokiseline, označavamo s  $pI$  (jednadžba 7).

Pri pH vrijednosti izoelektrične točke aminokiselina je neutralna, iako svaka aminokiselina posjeduje jedan pozitivan i jedan negativan naboj.<sup>134</sup>

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (7)$$

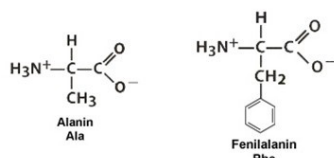
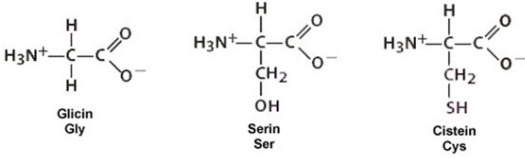
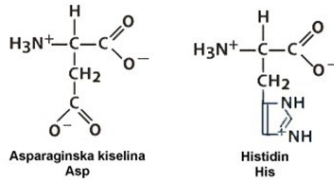
Ako molekula ima više od dvije ionizacijske skupine, disocijacija se odvija u više koraka. Izoelektrična točka nalazit će se u onom području pH, u kojem je zwitterionski oblik molekule dominantna vrsta. Vrijednost  $pI$  će biti jednak onom pH kod kojeg je koncentracija molekularnog oblika s jednim pozitivnim nabojem jednaka koncentraciji molekulske vrste s jednim negativnim nabojem. Općenito možemo reći da je  $pI$  jednak aritmetičkoj sredini  $pK$  vrijednosti onih disocijacijskih reakcija u kojima izravno sudjeluje zwitterionski oblik (jednadžba 7).

Na temelju fizikalno-kemijskih, prije svega disocijacijskih svojstava bočnih lanaca, aminokiseline su podijeljene na nepolarne i polarne, dok se polarne još dijele na nenabijene (neutralne) i nabijene, koje mogu biti ili kisele ili bazične. U **tablici 5** prikazane su aminokiseline korištene u ovoj disertaciji s pripadajućim oznakama i konstantama, a na **slici 12** njihove strukturne formule s opisom bočnog lanca.<sup>134</sup> Aromatski bočni lanac imaju His i Phe, međutim His je s bazičnim (tj. s pozitivno naelektriziranim bočnim lancem), a Phe s nepolarnim bočnim lancem. Alifatski bočni lanac imaju sve ostale odabrane aminokiseline, ali se također razlikuju: Asp se karakterizira kao aminokiselina s kiselim bočnim lancem (tj. s

negativno naelektriziranim bočnim lancem), Ala je s nepolarnim, a ostale su s polarnim bočnim lancem. Aminokiseline s polarnim bočnim lancem (Gly, Ser i Cys) omogućavaju formiranje vodikovih veza koje su osnova za formiranje viših oblika organizacije aminokiselina u molekulama proteina.

**Tablica 5.** Prikaz aminokiselina korištenih u disertaciji s pripadajućim oznakama, konstantama disocijacije i izoelektričnim točkama.

AMINOKISELINA	OZNAKA	$pK_1$ (-COOH)	$pK_2$ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	$pK_b$ (-R)	$pI$
ALANIN	Ala, A	2,34	9,69	-	6,00
ASPARAGINSKA KISELINA	Asp, D	1,88	9,60	3,65	2,77
CISTEIN	Cys, C	1,96	10,13	8,18	5,07
GLICIN	Gly, G	2,34	9,60	-	5,97
HISTIDIN	His, H	1,82	9,17	6,00	7,59
FENILALANIN	Phe, F	1,83	9,13	-	5,48
SERIN	Ser, S	2,21	9,15	-	5,58

BOČNI LANAC	STRUKTURNA FORMULA AMINOKISELINE
NEPOLARNI	 <p>Alanin Ala</p> <p>Fenilalanin Phe</p>
POLARNI	 <p>Glicin Gly</p> <p>Serin Ser</p> <p>Cistein Cys</p>
NABIJEN	 <p>Asparaginska kiselina Asp</p> <p>Histidin His</p>

**Slika 12.** Strukturne formule korištenih aminokiselina s opisom bočnog lanca.



### 2.7.2. Uloga aminokiselina u patološkoj biomineralizaciji

Bubrežni kamenci, osim već spomenute anorganske komponente (**tablica 3**), sadrže i organsku komponentu. Među organskim molekulama treba istaknuti aminokiseline. U urinu osoba koje su sklone stvaranju bubrežnih kamenaca nalazi se svih 20  $\alpha$ -aminokiselina. Količina i vrsta aminokiselina varira ovisno o biološkim uvjetima urolitijaze. U jednom od kliničkih ispitivanja pronađeno je da se aminokiseline Gly i His u urinu osoba koje ne stvaraju kamence nalaze u nešto višoj koncentraciji. Ser, Gly, Phe metaboličkim putem u organizmu mogu stvoriti oksalat, a u organskoj matrici, koja je sastavni dio svakog bubrežnog kamena pronađeni su His i Cys.<sup>27,53</sup>

Učinak aminokiselina na taloženje hidrata kalcijevih oksalata proučavan je od strane brojnih istraživača.<sup>28-36</sup> Međutim, podaci u literaturi su proturječni pa se tako bilježi učinak inhibicije taloženja<sup>32</sup>, promocije taloženja pri niskim koncentracijama i inhibicije pri visokim koncentracijama<sup>31</sup> te slab učinak ili njegov izostanak pri visokim koncentracijama aminokiselina.<sup>29</sup> Pri tome je kod jedne skupine autora zapaženo da dodatak aminokiselina potiče stvaranje COM, a sprječava nastanak COT i COD<sup>31</sup>, dok kod drugih autora aminokiseline stimuliraju stvaranje COD, a inhibiraju nastanak COM.<sup>29</sup> Zabilježeno je da neke aminokiseline (glutaminska kiselina, glicin, lizin) inhibiraju proces nukleacije COM, neke druge aminokiseline (prolin, alanin, valin, asparaginska kiselina) djeluju kao njegovi katalizatori dok serin i fenilalanin pokazuju neznatan učinak na nukleaciju.<sup>34</sup> Potvrđeno je inhibicijsko djelovanje aminokiselina na rast kristala COM koje ovisi o strukturi aminokiselina i povećava se s povećanjem koncentracije aminokiselina (glicin < alanin < prolin < asparaginska kiselina < glutaminska kiselina).<sup>35,36</sup> Navedeni podaci o djelovanju različitih aminokiselina nesumnjivo ukazuju na njihovu značajnu ulogu u patogenezi urolitijaze i nameću potrebu daljnjih istraživanja.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Eksperimentalni postupci i aparature

U **tablici 6** naveden je popis kemikalija *p. a.* čistoće korištenih za pripremu taložnih sustava kalcijeva oksalata.

**Tablica 6.** Naziv i kemijska formula kemikalija korištenih u eksperimentima.

Naziv kemikalije	Kemijska formula	Proizvođač
kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
natrijev oksalat	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	
natrijev klorid	$\text{NaCl}$	Kemika
kalijev klorid	$\text{KCl}$	
tri natrijev citrat dihidrat	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	
natrijev sulfat	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	
magnezijev sulfat heptahidrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
amonijev klorid	$\text{NH}_4\text{Cl}$	
urea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	
glicin, Gly	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	
alanin, Ala	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	
fenilalanin, Phe	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	
histidin, His	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	
cistein, Cys	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$	
serin, Ser	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	
asparaginska kiselina, Asp	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	

Sve korištene aminokiseline su  $\alpha$ -aminokiseline jer su amino i karboksilne skupine vezane za isti,  $\alpha$ -atom ugljika. Za pripremu otopina korištena je deionizirana voda provodnosti manje od  $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

Korištene aminokiseline se prema bočnom lancu klasificiraju u 3 skupine: nepolarne, polarne i nabijene (s negativno ili pozitivno naelektriziranim bočnim lancem). Strukturne formule i klasifikacija korištenih aminokiselina prikazane su na **slici 12** (vidi Literaturni pregled, poglavlje 2.7.1).

Odabrane aminokiseline, osim po strukturi, odabrane su jer se nalaze i u sastavu urina zdravih osoba i onih sklonih stvaranju bubrežnih kamenaca. Gly i His se u urinu zdravih osoba nalaze u nešto višoj koncentraciji<sup>27</sup>, te je pretpostavka da bi mogli biti inhibitori taloženja. Ser, Gly, Phe metaboličkim putem u organizmu mogu stvoriti oksalat. U organskoj matrici, koja je sastavni dio svakog bubrežnog kamenca pronađeni su His i Cys, a poznato je da organska komponenta kontrolira čitav niz procesa (nukleaciju, kemijski i mineraloški sastav,

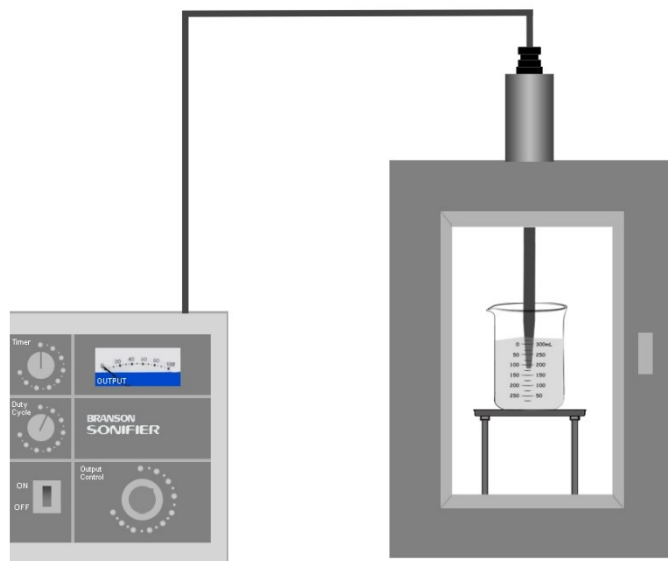
morfologiju i orijentaciju kristala anorganske faze). Phe i His su esencijalne aminokiseline (aminokiseline koje čovjekov organizam nije u stanju sintetizirati, a nužne su za njegovo funkcioniranje).

Otopine  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  standardizirane su klasičnim analitičkim volumetrijskim metodama, tj. koncentracija kalcija određena je titracijom sa standardnom otopinom EDTA ( $c(\text{EDTA}) = 0,1000 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a koncentracija oksalata sa standardnom otopinom  $\text{KMnO}_4$  ( $c(\text{KMnO}_4) = 0,0200 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

### 3.1.1. Priprava kalcijeva oksalata dihidrata, COD

Kalcijev oksalat dihidrat priređen je miješanjem otopina  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  uz dodatak  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Eksperimenti su rađeni pri konstantnoj početnoj koncentraciji,  $c_1(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 2,33 \text{ mmol dm}^{-3}$  te u rasponu početnih koncentracija  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ :  $9,0 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_1(\text{CaCl}_2) \leq 37,3 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0 \text{ mol dm}^{-3} \leq c_1(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \leq 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Omjer koncentracija konstitucijskih iona u otopini ( $c_1(\text{Ca}^{2+})/c_1(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ ) podešen je na 3,86 (niža početna prezasićenost,  $S_{\text{COD}} = 9,37$ ), 8,23 i 16,0 (viša početna prezasićenost,  $S_{\text{COD}} = 16,76 \pm 1,54$ ).

U svim eksperimentima pripreve kristalnog sjemena kalcijeva oksalata dihidrata (COD) korištena je staklena čaša volumena  $250 \text{ cm}^3$ . Eksperimenti su provedeni na sobnoj temperaturi ( $23 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Korištena su tri načina miješanja sustava: mehaničko, magnetsko i ultrazvuk. Mehaničko miješanje je postignuto uporabom propelera s dvije lopatice približne veličine oko 2 cm postavljene međusobno pod kutem od  $90^\circ$ . Magnetsko miješanje je postignuto korištenjem magneta duljine 20 mm i obloženog teflonskim slojem. Ultrazvučno miješanje je postignuto pomoću uređaja za ultrazvuk (Branson Sonifier 250 frekvencije 20 kHz) i sonde promjera 5 mm na vrhu (**slika 14**). Dubina urona sonde je bila identična u svim eksperimentima: 5 cm ispod površine tekućine. Parametar izlazne snage ultrazvuka je postavljen na 20 % što je rezultiralo neto potrošnjom od 40 W (teorijski) tijekom sonikacije. Pokusi su započeli ulijevanjem  $\text{CaCl}_2$  otopine u otopinu  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Ta je smjesa tijekom 30 sekundi homogenizirana miješanjem (mehanički, magnetski ili ultrazvučno), a potom je otopina  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  vrlo polagano dodavana (kap po kap) u tu smjesu. Sustav je ponovno homogeniziran miješanjem (mehanički, magnetski ili ultrazvučno tijekom 30 sekundi i potom ostavljen bez miješanja 20 minuta. Dobiveni je talog ispran malim količinama deionizirane vode kako bi se isprao suvišak  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  te je potom sušen u vakuumu jedan sat.



Slika 14. Shematski prikaz aparature za ultrazvučno miješanje.

### 3.1.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata

Eksperimenti spontanog taloženja rađeni su u tri sustava koji se međusobno razlikuju po kemijskoj kompleksnosti:

1. Jednostavan sustav: sustav sastavljen samo od konstitucijskih komponenti, kalcijevih i oksalatnih iona i pratećih iona (natrijevi i kloridni ioni)
2. NaCl sustav: sustav sastavljen od konstitucijskih komponenti, kalcijevih i oksalatnih iona, i pratećih co-iona (natrijevi i kloridni ioni) i dodatka NaCl čime je namještena ionska jakost na približno fiziološku vrijednost  $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ .
3. Sustav u umjetnom urinu: sustav sastavljen od konstitucijskih komponenti, kalcijevih i oksalatnih iona, uz dodatak drugih komponenti koje su u vrsti i količini poput sastava realnog urina (**tablica 7**). Komponente za pripravu umjetnog urina odabrane su prema Burns i Finlayson<sup>24</sup> referentnom umjetnom urinu (vidi Literaturni pregled, **tablicu 4**). Pritom,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  je izostavljen iz tog sastava iz razloga što pri uvjetima u kojima su izvedeni eksperimenti u ovoj disertaciji (eksperimenti pri  $\text{pH}_i = 9$ ) dolazi do taloženja fosfatnih soli. U sustavima umjetnog urina nisu dodavani citratni ioni budući da je iz literature poznato da oni promoviraju nastanak jednog hidratnog oblika kalcijeva oksalata, a to je COD. Dodatak u

sastavu umjetnog urina u istraživanjima u ovoj disertaciji u usporedbi s Burns i Finlayson referentnim umjetnim urinom je urea.

**Tablica 7.** Kemijski sastav sustava u umjetnom urinu.

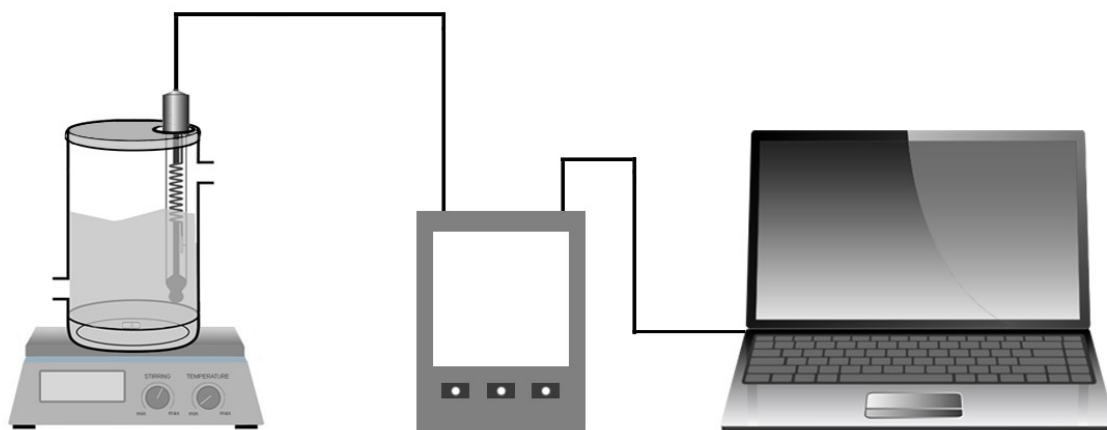
KEMIJSKI SPOJ	KONCENTRACIJA/ mmol dm <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,95
KCl	63,70
NH <sub>4</sub> Cl	45,50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,85
NaCl	105,50
Urea	291,40 <sup>a</sup>
<sup>a</sup> U ljudi i viših primata, izlučuje se većinom putem bubrega te je stoga dodana u sastav umjetnog urina	

Početna pH vrijednost, pH<sub>i</sub>, podešena je dodatkom standardiziranih otopina HCl i/ili NaOH na pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9 te je stoga koncentracija NH<sub>4</sub>Cl podešena na 45,50 mmol dm<sup>-3</sup>.

U svim sustavima koncentracija kalcija i oksalata izražena je u mmol dm<sup>-3</sup> te je varirana u širokom području: 2,0 mmol dm<sup>-3</sup> ≤ c<sub>i</sub>(Ca<sup>2+</sup>) ≤ 10 mmol dm<sup>-3</sup> i 0,6 mmol dm<sup>-3</sup> ≤ c<sub>i</sub>(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>) ≤ 8,0 mmol dm<sup>-3</sup>. Ovim koncentracijskim područjem obuhvaćeni su uvjeti hiperoksalurije<sup>32-37</sup> u kojima mogu nastati bubrežni kamenci. Za detaljnije proučavanje utjecaja aminokiselina na spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima primarne hiperoksalurije odabran je sustav c<sub>i</sub>(Ca<sup>2+</sup>) = 7,5 mmol dm<sup>-3</sup> i c<sub>i</sub>(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>) = 6,0 mmol dm<sup>-3</sup>. Koncentracija dodanih aminokiselina u svim sustavima je 30 mmol dm<sup>-3</sup>.

Svi eksperimenti spontanog taloženja izvedeni su u staklenoj reakcijskoj posudi volumena 400 mL i dvostrukih stijenki pri temperaturi 37 °C, održavanoj pomoću protočnog termostata (**slika 13**). Posuda je zatvorena pomoću čepa od teflona, a sustavi su miješani brzinom 400 - 420 okr/min pomoću magnetskog mješača obloženog teflonskim slojem (5 cm duljine i 0,5 cm širine). Eksperimenti spontanog taloženja izvedeni su miješanjem 200 cm<sup>3</sup> oksalatne (ili oksalat-NaCl ili oksalat-umjetni urin) otopine i 200 cm<sup>3</sup> kalcijeve (ili kalcij-NaCl ili kalcij-umjetni urin) otopine, pri čemu je kalcijeva otopina na dnu reakcijske posude, a oksalatna otopina se u nju ulijeva. Odgovarajuća koncentracija navedenih aminokiselina dodana je uvijek u oksalatnu otopinu prije miješanja s kalcijevom otopinom.

<sup>1</sup> Koncentracija kalcija i oksalata u biološkim sustavima izražava se na nekoliko načina: mmol, mmol mol<sup>-1</sup> Cr<sup>-1</sup> ili mmol/24-sata, međutim prema SI sustavu se ta koncentracija izražava u mmol dm<sup>-3</sup> ili mol dm<sup>-3</sup>



**Slika 13.** Shematski prikaz aparature za spontano taloženje kalcijeva oksalata.

Napredovanje reakcije praćeno je mjerenjem pH otopine kombiniranom staklenom/kalomel elektrodom (HI1131) koja je povezana s digitalnim pH-metrom HANNA HI 5522 spojenim na računalo. Po uspostavljanju približno stalne vrijednosti pH, eksperiment je zaustavljen, suspenzija filtrirana kroz membranski filter (Millipore) veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , a dobiveni talog ispran malim količinama deionizirane vode te sušen tijekom jednog sata pomoću vakuum pumpe.

### 3.2. Eksperimentalne metode

Za karakterizaciju kristalnog sjemena kalcij oksalat dihidrata i spontano istaloženih kalcijevih oksalata korištene su slijedeće metode: FT-IR spektroskopija, rentgenska difrakcijska analiza praha (PXRD), termogravimetrijska analiza (TG), mjerenje specifične površine (analiza B.E.T. metodom), mjerenje raspodjele broja i veličine čestica (elektroničko brojilo čestica, Coulter Counter, CC), elektrokinetička mjerenja te optička (OM) i pretražna elektronska mikroskopija (SEM). IR spektri snimljeni su pomoću Shimadzu FTIR 8400S spektrometra u valnom području od 400 do 4000  $\text{cm}^{-1}$  (rezolucija: 4  $\text{cm}^{-1}$ ) DRS tehnikom. Analizirani su spojevi u čvrstom stanju, za snimanje na FT-IR spektrometru korištena je DRIFT (eng. *diffuse reflectance infrared Fourier transform*) tehnika. Približno 1 mg krutog uzoraka pomiješan je s 100 mg KBr. Za snimanje spektara i obradu podataka korišten je računalni program IR Solution 1.30. Dobiveni rezultati FT-IR spektroskopije uspoređivali su se sa standardnim spektrima prikazani u dodatku 8.1.



Rentgenska difrakcijska analiza provedena je na dva instrumenta:

a) PANalytical X'PertPRO difraktometar. Korišteno je Cu K $\alpha$  zračenje pri 295 K i Bragg - Brentano geometrijom s X'Celerator detektorom. Mjerno područje bilo je  $2\theta = 10 - 60^\circ$  s korakom  $0,02^\circ$ . PANalytical HighScore Plus softver je korišten za analizu podataka.

b) Rigaku Ultima IV Multipurpose difraktometra (Cu K $\alpha$  zračenje, Ni filter,  $5^\circ$  Soller prorez i proporcionalni brojač) u Bragg - Brentano geometriji. Mjerno područje bilo je  $2\theta = 10 - 60^\circ$  s korakom  $0,02^\circ$ . Podaci su obrađeni na softveru Rigaku (PDXL 2).

Za analizu difrakcijskih slika korištena je baza podataka International Centre for Diffraction Data (ICDD Powder Diffraction File), Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). Kristalne faze i veličina kristalita određene su usporedbom položaja i intenziteta difrakcijskih maksimuma u rentgenskim difraktogramima uzoraka (Debye-Scherrer metoda) s podacima iz baze podataka pomoću Rigaku (PDXL 2) softvera. COM je uspoređen s karticom broj 20-231 i/ili karticom broj 14-768, COD s karticom broj 17-541, a COT s karticom broj 20-232. Kvantitativno određivanje faza određeno je metodom referentnog intenziteta (RIR). Dobiveni rezultati rentgenske difrakcijske analize uspoređivali su se sa standardnim podacima prikazani u dodatku 8.3.

TG analiza provedena je na dva instrumenta jednakom metodom: Mettler Toledo System 1 i Mettler TG 50 termalnoj vagi s TC 11 TA procesorom. Uzorci su ispitivani u atmosferi kisika, uz brzinu protoka plina  $200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , s korakom snimanja  $5^\circ \text{C min}^{-1}$  u temperaturnom području od  $30$  do  $300^\circ \text{C}$ . Rezultati su obrađeni pomoću računalnog programa STARE Software 10.0.<sup>135</sup> Dobiveni rezultati termogravimetrijske analize uspoređivali su se sa standardnim podacima prikazani u dodatku 8.2.

Specifična površina dobivenih taloga je određena B.E.T. metodom. Za mjerenja je korišten uređaj Gemini 2380 proizvođača Micromeritics. Preciznost uređaja je  $\pm 0,5\%$ . Kao adsorbat korišten je dušik pri temperaturi tekućeg dušika.

Broj i raspodjela veličine kristala određeni su elektroničkim brojiлом čestica (Coulter Multisizer II). Uzorci ( $m = 2-3 \text{ mg}$ ) su za potrebe mjerenja resuspendirani u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  CaCl<sub>2</sub> otopini. Korištene su mjerne cjevčice otvora  $50 \mu\text{m}$  i  $100 \mu\text{m}$  koje su prethodno kalibrirane standardnim monodisperznim lateksnim kuglicama odgovarajućih dimenzija.

Elektrokinetička svojstva kristalnog sjemena COD su određena korištenjem uređaja ZetaPlus instrument (Brookhaven Instruments Corporation). Uzorci osušenog COD ( $m = 10,0 \text{ mg}$ ) su resuspendirani u  $10 \text{ cm}^3$  otopini  $6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. U sustavima u koje su dodavane aminokiseline, koncentracija aminokiseline varirala je u rasponu:  $3,5 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{His}) \leq 50,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_i(\text{Gly, Ala, Phe, Ser}) = 10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . pH otopine Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> je podešen u

rasponu  $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$  dodatkom  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ili  $\text{NaOH}$ . Suspenzije su homogenizirane 30 sekundi u ultrazvučnoj kupelji. Homogenizirane suspenzije su prije mjerenja zeta potencijala kontinuirano miješane konstantnom brzinom pomoću magnetske miješalice. Sva su mjerenja provedena na sobnoj temperaturi i ponovljena su tri puta.

Za vizualnu identifikaciju taloga te za utvrđivanje morfoloških svojstava istaloženih faza, korišteni su svjetlosni mikroskop (Orthoplan photographic microscope, E. Leitz, Wetzlar) i pretražni elektronski mikroskop, SEM (FESEM, JEOL JSM-7000F). Kako bi se uzorci mogli proučavati pretražnom elektronskom mikroskopijom, malo suhog uzorka je bez dodatnog tretiranja (naparavanje zlatom) stavljeno na ugljikovu traku fiksiranu na aluminijski nosač.

Ukupna koncentracija citrata, u uzorcima sinteze COD, mjerena je metodom ionske kromatografije (Dionex ICS-1100).

### 3.3. Obrada eksperimentalnih podataka

Računanje sastava otopine kalcijeva oksalata i prezasićenosti temeljeno je na poznatim početnim parametrima: početni pH sustava,  $\text{pH}_i$ , početne koncentracije reaktanata ( $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) i početne koncentracije dodanih aditiva. Prezasićenost je izračunata pomoću računalnog programa VMINTEQ 3.1 (dostupnog na <https://vminteq.lwr.kth.se/>).

Početna prezasićenost sustava,  $S_i$ , izračunata je na temelju aktiviteta  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  iona te termodinamičkog produkta topljivosti:

$$S_i = (a(\text{Ca}^{2+}) \cdot a(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) / K_{\text{sp}}^\circ)^{1/2} \quad (8)$$

U eksperimentima spontanog taloženja prezasićenost je izražena kao prezasićenost u odnosu na COM,  $S_{\text{COM}}$ , a u računima je korišten  $K_{\text{sp}}$  (COM). U eksperimentima sinteze kalcijeva oksalata dihidrata prezasićenost je izražena kao prezasićenost u odnosu na COD,  $S_{\text{COD}}$ , a u računima je korišten  $K_{\text{sp}}$  (COD). Vrijednosti termodinamičkih produkata topljivosti dani su u **tablici 1**.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Priprava kalcijeva oksalata dihidrata, COD

U cilju taloženja čistog kalcijeva oksalata dihidrata, u ovom radu su primjenjena tri različita načina miješanja taložnog sustava: mehaničko miješanje (meh), magnetsko miješanje (mag) i miješanje putem djelovanja ultrazvuka (uzv). Za svaki način miješanja, variran je omjer koncentracije kalcija i oksalata,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  kao jedan od najvažnijih parametara u procesu taloženja kalcijevih oksalata. Omjer koncentracije konstitutivnih iona u otopini,  $(c_i(\text{Ca}^{2+})/c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}))$  podešen je na 3,86 (niža početna prezasićenost,  $S_{\text{COD}} = 9,37$ ), 8,23 ili 16,00 (viša početna prezasićenost,  $S_{\text{COD}} = 16,76 \pm 1,54$ ). U urinu osoba koje nisu sklone stvaranju kamenaca, omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  je veći od 5.<sup>136</sup> U ovom istraživanju, ispitan je širi omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  kako bi se obuhvatilo stanje urina kod pacijenata koji pate od hiperoksalurije ili urin tipičan za pacijente s hiperkalciurijom.

Računanje sastava otopine kalcijeva oksalata i prezasićenosti temeljeno je na poznatim početnim parametrima: početni pH sustava,  $\text{pH}_i$  i početne koncentracije reaktanata ( $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) i citrata, a detaljnije je pojašnjeno u Eksperimentalnom dijelu (vidi poglavlje 3.3). Dobiveni rezultati FT-IR, TG i PXRD analiza uspoređivani su sa standardima COM i COD prikazanih u dodatku 8.1, 8.2 i 8.3.

U **tablici 8** su prikazani rezultati taloženja za varirane eksperimentalne parametre. Maseni udjeli COD u uzorcima određeni su termogravimetrijskom i rentgenskom difrakcijskom analizom.

U svim eksperimentima u sustave je dodavan natrijev citrat,  $c(\text{citrat}) = 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . U preliminarno istraženim sustavima bez dodatka citrata, istaložio je samo COM bez primjese COD. U literaturi je opisano da prisutnost citrata pogoduje taloženju COD kristala.<sup>12,13,109</sup> Osim prisutnosti citratnih iona pokazano je da taloženju COD pogoduje visok omjer kalcija u odnosu na oksalate<sup>12,137</sup>, visoka ionska jakost<sup>19</sup>, povišena temperatura.<sup>13</sup>

Kao što je vidljivo iz **tablice 8**, pri višim omjerima koncentracije kalcija i oksalata,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8,23$  i  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,00$ , istaložio je 100 % COD bez obzira na način miješanja (izuzetak su 85 i 93 % COD uz mehaničko miješanje). To opažanje je u skladu s literaturnim spoznajama. Dominantni učinak tipa miješanja na fazni sastav taloga opažen je pri najmanjem omjeru,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ . Pri mehaničkom i magnetskom miješanju taloži COD u smjesi s COM (sadržaj COD u ovim sustavima iznosio je 75-76 %; **tablica 8**).

**Tablica 8.** Eksperimentalni parametri: način miješanja (uzv - miješanje putem djelovanja

ultrazvuka, mag - magnetsko miješanje, meh - mehaničko miješanje) i omjer koncentracije kalcija i oksalata,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ . Rezultati eksperimenata: ( $w$  - maseni udio COD).

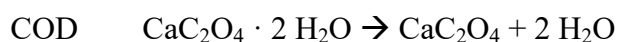
Tip miješanja	$c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$	$w$ (COD)/ %
meh	3,86	76
mag		75
uzv		100
meh	8,23	85
mag		100
uzv		100
meh	16,00	93
mag		100
uzv		100

Rezultati termogravimetrijske analize navedenih sustava mogu se vidjeti u **tablici 9**.

**Tablica 9.** Rezultati termogravimetrijske analize taloga izoliranog u eksperimentima pri  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  ( $t_0$  – početna temperatura,  $t_{\text{max}}$  – temperatura maksimuma,  $t_e$  – temperatura završetka,  $\Delta m$  – gubitak mase)

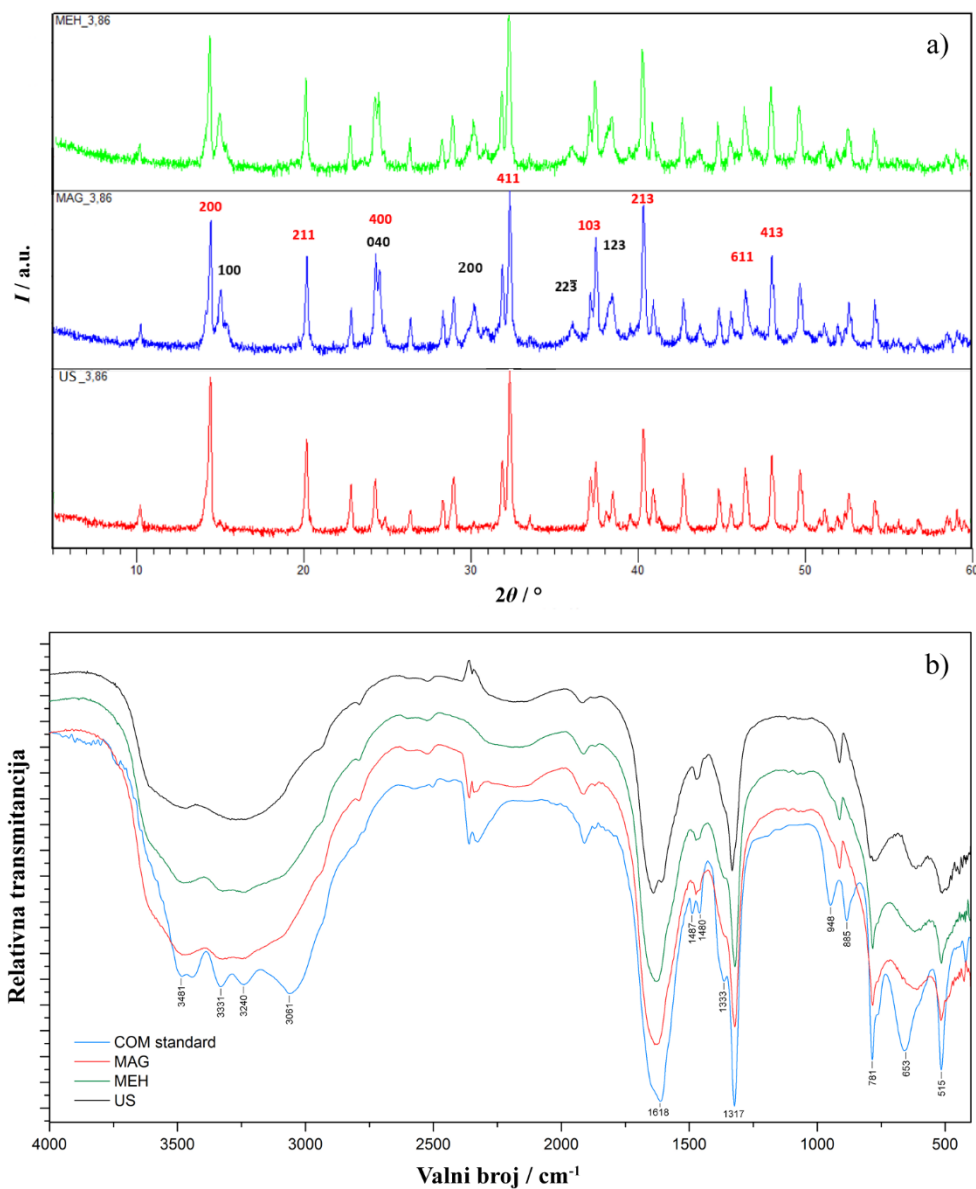
Tip miješanja	$t_0/^\circ\text{C}$	$t_{\text{max}}/^\circ\text{C}$	$t_e/^\circ\text{C}$	$\Delta m/ \text{mg}$	$\Delta m/ \%$
meh	94,31	140,92	192,96	1,02	19,05
mag	112,84	144,22	190,83	0,95	18,13
uzv	79,25	161,54	204,81	1,14	22,09

Teoretski gubitak mase za kristalnu vodu u čistom COM je 12,33 %, a u čistom COD je 21,96 %. Rezultati termogravimetrijske analize uzoraka pripremljenih u meh, mag i uzv sustavu pri  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  ukazuju na to da se gubitak mase dogodio tijekom samo jednog koraka (**tablica 9**).<sup>138-140</sup>



U uzv sustavu ukupni gubitak mase iznosio je 22,09 %, što odgovara gubitku dvije molekule vode iz COD, dok su uzorci u meh i mag sustavima izgubili oko 19,05 % i 18,13 %, što ukazuje na smjesu COD i COM.

Na **slici 15** prikazani su rentgenski difraktogrami (a) i FTIR spektri (b) taloga pripremljenih pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .

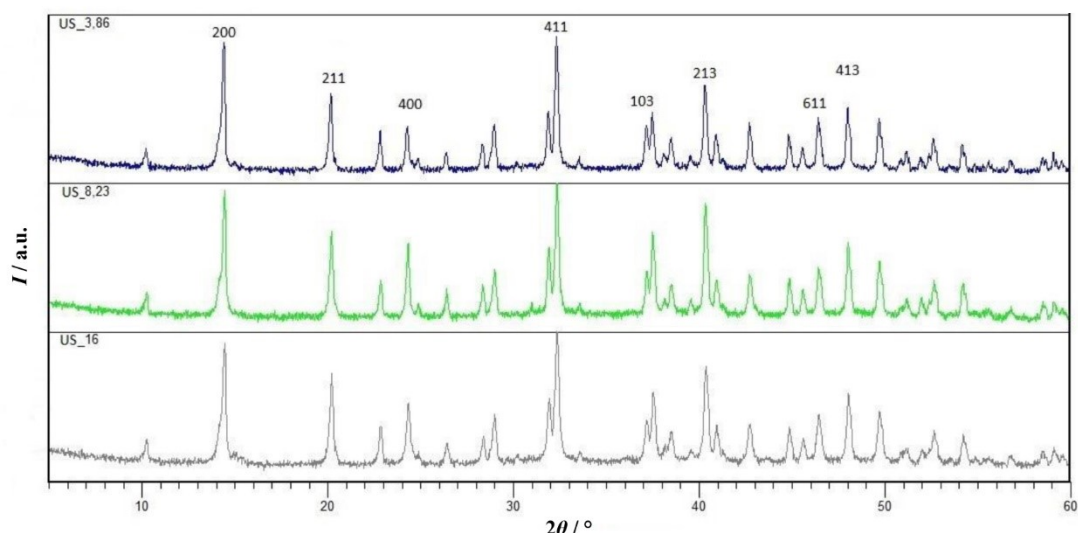


**Slika 15.** Analiza uzoraka u mag, meh i uzv sustavu pri  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ :  
**a)** rentgenski difraktogrami; Difraktogram prikazan zelenom bojom je od uzorka priređenog u meh sustavu, plavi u mag (crvenim Millerovim indeksima označeni su difrakcijski maksimumi od COD, a crnim od COM) a crveni u uzv i **b)** FT-IR spektri (prikazan je i standard COM s označenim karakterističnim transmissijskim vrpčama).

Na **slici 15a**, u difraktogramima uzoraka pripremljenih u sustavima miješanim meh i mag putem izraženi su difrakcijski maksimumi pri  $d = 0,618, 0,442, 0,277, 0,241, 0,224, 0,212, 0,196$  i  $0,190$  nm koji su dodijeljeni  $\{200\}, \{211\}, \{411\}, \{103\}, \{213\}, \{530\}, \{611\}$  i  $\{413\}$  ravninama COD kristala (JCPDS broj kartice 17-541) i difrakcijski maksimumi pri  $d = 0,593, 0,365, 0,296, 0,249$  i  $0,235$  nm, koji su dodijeljeni  $\{100\}, \{040\}, \{200\}, \{2\bar{2}3\}$  i  $\{123\}$  ravninama COM kristala (JCPDS broj kartice 20-231).<sup>141</sup> U FT-IR spektrima su izražene vrpce karakteristične za COM i COD (**slika 15b**). Prema literaturi, asimetrično karbonilno istezanje u oksalatima ( $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ ) za COM pojavljuje se pri  $1618 \text{ cm}^{-1}$ , a za COD pri  $1648 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>141</sup> Simetrično karbonilno istezanje i metal-karbonilno istezanje  $\nu_s(\text{COO}^-)$  ima apsorpcijsku vrpcu pri  $1317 \text{ cm}^{-1}$  za COM dok je za COD ona pomaknuta na  $1329 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>53,142-144</sup> Pomak od  $1317 \text{ cm}^{-1}$  na  $1329 \text{ cm}^{-1}$  i pomak od  $1618$  na  $1648 \text{ cm}^{-1}$  ovisi o udjelu COM i COD u smjesi. FT-IR spektar kalcijeva oksalata ima vrpce pri  $1632 \text{ cm}^{-1}$  i  $1321 \text{ cm}^{-1}$ , za uzorak sintetiziran u sustavu uz magnetsko miješanje, te pri  $1626 \text{ cm}^{-1}$  i  $1323 \text{ cm}^{-1}$  za uzorak iz sustava s mehaničkim miješanjem. U području od  $400 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ , sva tri sustava (mag, meh i uzv) pokazuju apsorpcijske vrpce pri  $914 \text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na prisutnost COD u uzorcima. U tom području, za mag i meh sustav vidljive su vrpce karakteristične za COM:  $948 \text{ cm}^{-1}$  ili  $941 \text{ cm}^{-1}$  i vrlo oštra vrpca pri  $783 \text{ cm}^{-1}$  ili  $781 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>141</sup> Iz standardnog COM spektra u vibracijskom području iznad  $3000 \text{ cm}^{-1}$  (**slika 15b**) vidljivo je da čisti COM pokazuje četiri oštre vrpce ( $3481, 3331, 3240$  i  $3061 \text{ cm}^{-1}$ ) koje se odnose na asimetrično i simetrično istezanje koordiniranih molekula vode.<sup>11,141</sup> Uzorak čistog COD (**slika 15b** uzorak iz uzv sustava) u tom području pokazuje jednu široku vrpcu. Rentgenski difraktogram istog uzorka sadrži samo linije karakteristične za COD (**slika 15a** crveno obojen difraktogram).

Pri višim omjerima,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8,23$  i  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,00$ , 100 % COD je istaložio u mag i uzv sustavu dok je u meh sustavu istaložio s udjelom 85 i 93 % COD. Druga istraživanja taloženja u mehaničko miješanim sustavima s različitim koncentracijama reaktanata i pri različitim temperaturama također su rezultirala taloženjem COD u smjesi s COM.<sup>13</sup>

Rentgenogrami COD istaloženog u uzv sustavu i pri svim omjerima  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  prikazani su na **slici 16**. U rentgenogramima su označene difrakcijske linije karakteristične za COD (JCPDS broj kartice 17-541).<sup>141</sup> Osim linija COD nema drugih linija što ukazuje na to da su uzorci 100 % COD.



**Slika 16.** Rentgenogrami uzoraka pripremljenih u uzv sustavu pri omjerima  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  (gore), 8,23 (sredina), i 16,00 (dolje). Označeni su Millerovi indeksi difrakcijskih linija za COD (prema JCPDS broj kartici 17-541).

U literaturi su prikazani rezultati istraživanja utjecaja koncentracije reaktanata, temperature, načina i brzine miješanja (ili nemiješanja) na veličinu COD kristala.<sup>13,38,59,145,146</sup> Dobiveni rezultati ukazuju na to da COD ima vrlo nizak stupanj nukleacije i da nastaje u nemiješanom sustavu, ali samo nakon dužeg indukcijskog perioda.<sup>19</sup> Brown i suradnici<sup>12</sup> utvrdili su da je taloženje COD vjerojatnije na 22 °C nego na 37 °C, te je favorizirano omjerom  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) > 4$ . Doherty i suradnici<sup>109</sup> pripremili su COD u prisutnosti citratnih iona u sustavu miješanom s magnetskom miješalicom i omjerom koncentracije konstituentnih iona u otopini,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \approx 8$ .

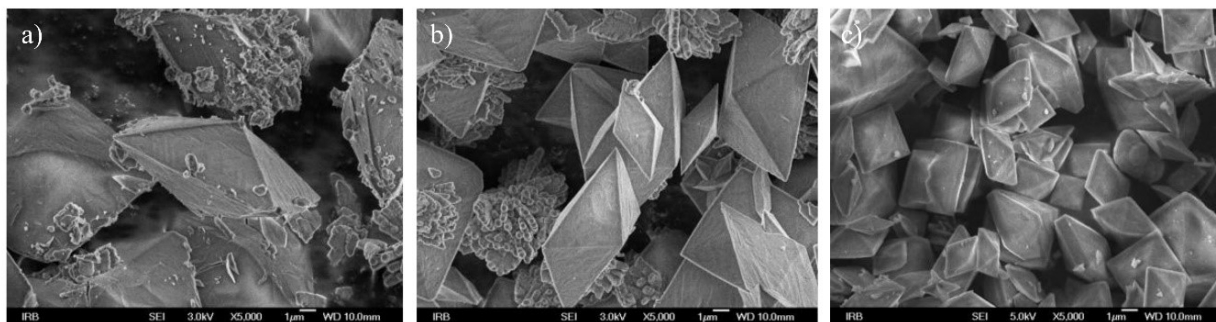
#### 4.1.1. Morfologija kristala kalcijeva oksalata dihidrata

Morfologija istaloženih COD kristala u mag, meh i uzv sustavu pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  prikazana je na **slici 17**.

Iz SEM slika mag i meh sustava vidljivo je da je COD u tim sustavima istaložio u kristalima oblika tetragonalne bipiramide, prosječne veličine oko 10 μm s vrlo oštrim rubovima (**slika 17a, b**). Ploha (101) tetragonalne bipiramide izgleda relativno grubo. U meh sustavu rubovi i kutevi (101) plohe su djelomično polomljeni, najvjerojatnije u sudaranju s mehaničkim propelerom. Tip miješanja utječe i na COM morfologiju kod mag i meh sustava. U meh sustavu COM taloži u obliku tetraedarskih kristala (1-2 μm) koji čine agregate (**slika 17a**) dok u mag sustavu taloži u obliku vrlo malih (500 nm) sferičnih kristalita (**slika 17b**). U uzv sustavu promijenjen je habitus COD kristala, te taloži u obliku tetragonalne bipiramide s

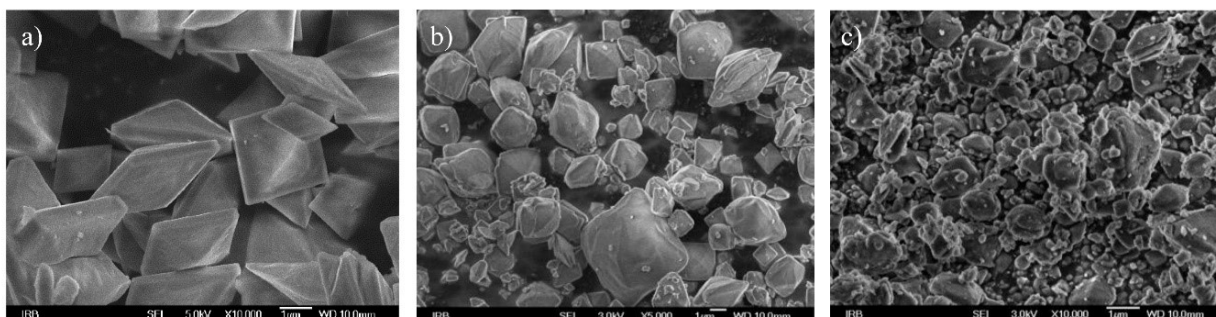


prizmom (**slika 17c**, vidi Literaturni pregled, **slika 5**). Kristali dobiveni u uzv sustavu, u usporedbi s ostala dva sustava, imaju glađe plohe, te zaobljene bridove i kuteve.



**Slika 17.** Učinak različitih načina miješanja na COD morfologiju u sustavima pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ : a) meh, b) mag, c) uzv.

Omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  pokazuje značajni efekt na veličinu COD kristala i njihovu morfologiju. **Slika 18** pokazuje SEM slike COD kristala pripremljenih u uzv sustavu s povećanjem omjera  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ . Kao što je već prikazano, pri najnižem omjeru,  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ , u uzv sustavu COD taloži u obliku uniformnih tetragonalnih bipiramida s prizmama veličine 4 µm (**slika 18a**). Pri višim omjerima, kristali su veličine od 1-7 µm (**slika 18b**). Osim u promjeni veličine, zamijećena je i značajna promjena u morfologiji COD kristala. Pri višem omjeru plohe su vrlo zaobljene. Također se zamjećuju i sraslaci. Pri najvišem omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,00$ , COD kristali su vrlo mali, agregirani i nepravilnog oblika (**slika 18c**). Efekti smanjenja veličine kristala s povišenjem  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  omjera, odnosno povećanjem prezasićenosti, zabilježeni su i pri mag i meh miješanju (vidi dodatak 8.4).



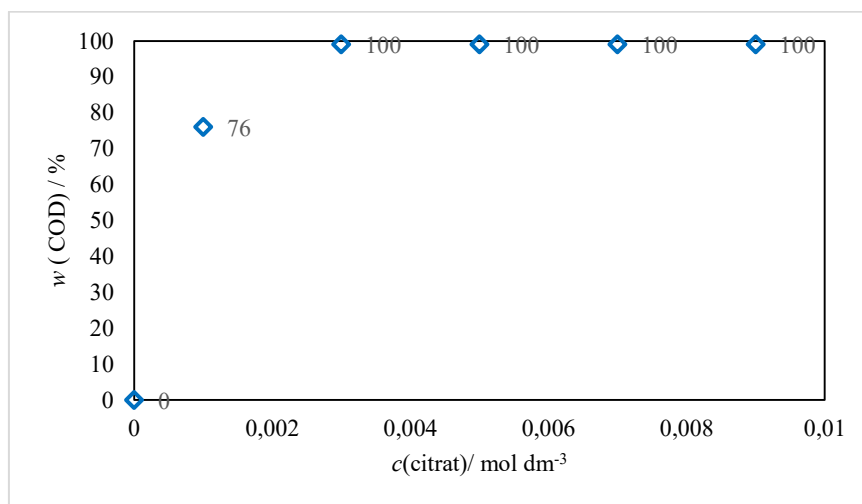
**Slika 18.** Utjecaj različitih omjera  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  na veličinu i morfologiju COD u uzv sustavu: a) 3,86, b) 8,23, c) 16,00.

Ovi rezultati su originalni doprinos ovog doktorskog rada budući da u literaturi do sad nije zabilježeno da specifična promjena tipa miješanja sustava, t.j. uporaba ultrazvuka uzrokuje morfološke promjene COD kristala iz tetragonalne bipiramide (mag i meh miješanje) u tetragonalnu bipiramidu s prizmom (uzv miješanje). Ultrazvučno zračenje prethodno je korišteno za pripremu širokog raspona krutih materijala<sup>67,147-149</sup>, no, prema našem saznanju, nema podataka o njegovoj primjeni u taloženju kalcijeva oksalata. Uporaba ultrazvuka u kemijskim procesima primjenjuje ultrazvučne valove u rasponu od 16 do 100 kHz, a energija se isporučuje u sustav formiranjem malih šupljina ili mikro-mjehurića koji se brzo raspadaju. Skup mikro-mjehurića stvara visoke lokalne temperature i tlakove, kao i velike sile smicanja.<sup>150</sup> Slijedom navedenog ultrazvučno miješanje može ubrzati ili usporiti taloženje<sup>151,152</sup> i promijeniti veličinu i morfologiju kristala.<sup>153,154</sup> Mnogi autori<sup>12,13,59,109</sup> sugeriraju da je priprema COD, bez prisustva drugih hidrata, teška i može biti ozbiljna prepreka za postizanje pouzdanih kristalizacijskih podataka. Neki autori su zaključili da suvišak kalcijevih iona može promovirati adsorpciju polimera na COD što uzrokuje izduženje (100) plohe.<sup>155</sup> Drugi autori su zabilježili da prisutnost nekih aditiva (dvostruko hidrofilni kopolimer<sup>155</sup>, oligo(L-glutaminska kiselina)<sup>156</sup>, negativno nabijene molekule SDS<sup>110</sup>, makromolekule s anionskom stranom lanca (poliakrilati<sup>81</sup>)) favoriziraju stvaranje COD s izduženom (100) plohom. Ovaj fenomen rezultira stvaranjem tetragonalne bipiramide s prizmom koja je izdužena u [001] smjeru. Na temelju gustoće ione u COD strukturi, {100} ravnine imaju mnogo višu gustoću kalcijevih iona (0,04395 iona/ Å<sup>2</sup>) nego {101} ravnine (0,0213 iona/ Å<sup>2</sup>)<sup>157</sup>, što ukazuje na mogućnost veće adsorpcije anionskih surfaktanata. Iz svega slijedi da je priprava dobro definiranog kristalnog sjemena COD poput ovog u okviru ove doktorske disertacije osnova za daljnje eksperimente kristalnog rasta uz dodatak različitih aditiva kao dobar *in vitro* model za proučavanje učinaka potencijalnih inhibitora na stvaranje bubrežnih kamenaca.

#### 4.1.2. Utjecaj citratnih iona na taloženje kalcijeva oksalata dihidrata

Za istraživanje utjecaja citratnih iona na taloženje COD odabran je sustav s miješanjem pomoću ultrazvučnog zračenja (uzv sustav) u kojem COD taloži kao dominantna faza bez prisustva drugih faza i koji je dobro definiranog habitusa. U odabranom sustavu omjer kalcijevih i oksalatnih iona je  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ , a koncentracija citratnih iona varirana je u području:  $0 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{citrat}) \leq 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Rezultati ovih istraživanja su pokazali da u sustavu bez citrata taloži samo COM, što se podudara s literaturnim

podacima.<sup>12,13,109</sup> Taloženje čistog COM u odsutnosti citrata potvrđeno je SEM, PXRD, TG i FT-IR analizama (vidi dodatak 8.1.1, 8.2.1 i 8.3.1). Nakon dodatka  $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  citrata, taloži COM u smjesi s COD (76 %) (**slika 19**). S povećanjem koncentracije citrata udio COD se povećava i 100 % istaloženog COD zabilježeno je pri koncentraciji  $c(\text{citrata}) \geq 3,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  (**slika 19**). Rezultati TG, PXRD i FT-IR analiza uzorka COD pripremljenog pri najvećoj koncentraciji citrata prezentirani su u **tablici 9** i **slici 15a i b**.

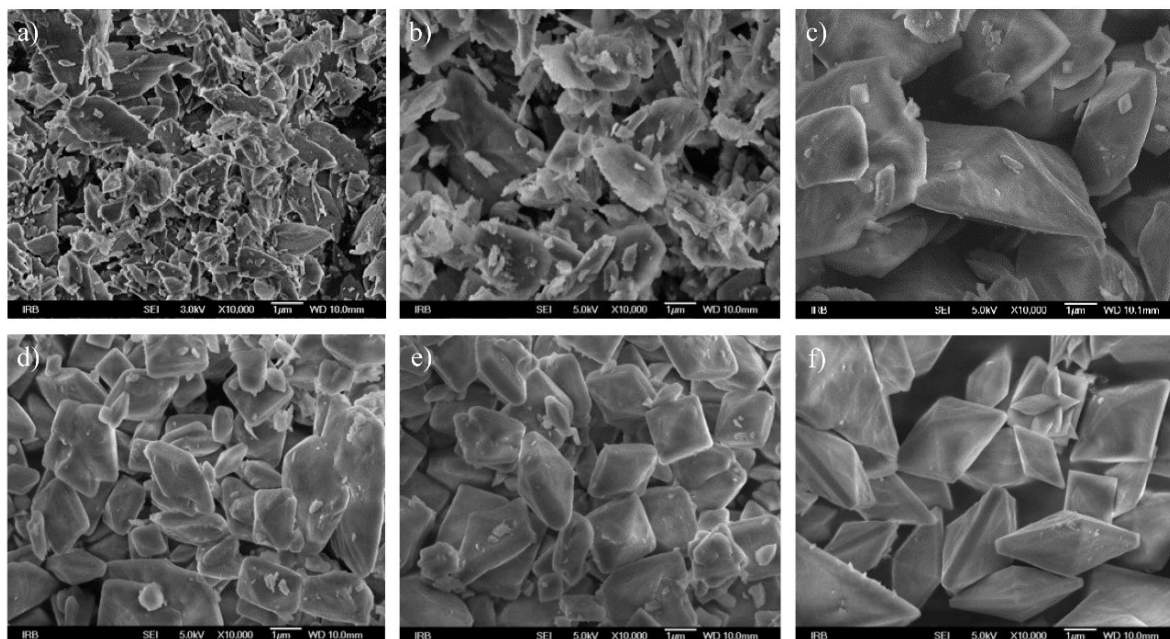


**Slika 19.** Utjecaj koncentracije citrata na udio istaloženog COD u uzv sustavu  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .

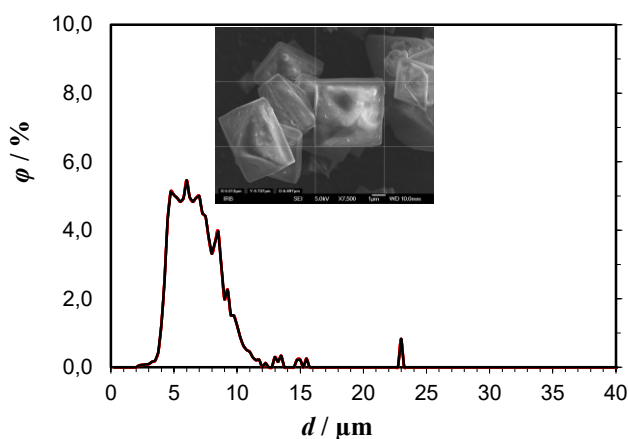
Na **slici 20** je prikazana morfologija kristala dobivenih u eksperimentima ispitivanja utjecaja citratnih iona. **Slika 20a** odgovara sustavu bez dodatka citratnih iona. U tom sustavu taloži samo COM nepravilne morfologije i visoke heterogenosti u veličini kristala. Dodatkom  $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  citrata, COM kristali poprimaju pravilniju pločastu strukturu, a pojavljuju se i „flower like“ COD kristali (**slika 20b**). Morfologija COD kristala značajno se mijenja s povećanjem koncentracije citrata od nepravilnih tetragonalnih bipiramida s prizmom (**slika 20c, d, e**) do pravilnih, lijepo formiranih tetragonalnih bipiramida s prizmom s dobro vidljivom (100) plohom (**slika 20f**). Veličina tih formiranih kristala COD kreće se u rasponu od  $4\text{-}6 \mu\text{m}$  (**slika 21**), a specifična površina je  $1,8 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Ovakvi rezultati istraživanja utjecaja koncentracije citrata u skladu su s literaturnim podacima koji pokazuju da povišenje koncentracije karboksilnih kiselina inhibira nastajanje COM i rezultira taloženjem COD.<sup>28,155,158</sup> Soli limunske kiseline, citrati, se već dugo koriste za sprečavanje urolitijaze.<sup>106</sup> Pri tome je inhibicija nukleacije kalcijevih oksalata citratnim ionima povezana s njihovim visokim afinitetom kompleksiranja za  $\text{Ca}^{2+}$  i time snižavanjem

relativne prezasićenosti urina.<sup>159</sup> Nadalje, citratni ioni inhibiraju rast i agregaciju već formiranih kristala, jakom adsorpcijom na njihovim površinama.<sup>160</sup>



**Slika 20.** Utjecaj koncentracije citrata na morfologiju COD u uzv sustavu  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3}$ : a) 0,0 b) 1,0 c) 3,0 d) 5,0 e) 7,0 f) 9,0.



**Slika 21.** Raspodjela veličine COD čestica istaloženih u uzv sustavu  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  i  $c(\text{citrat}) = 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Citratni ioni ne djeluju jednostavno samo kao kompleksirajući agensi, koji smanjuju prezasićenost, nego vjerojatno specifično djeluju zajedno s određenim čvrstim fazama, bilo inhibirajući ili promovirajući nukleaciju ili kristalni rast.<sup>13</sup> Treba naglasiti da je u taložnim sustavima u kojima je otopina u početku prezasićena s obzirom na nekoliko krutih faza (polimorfni ili hidratni), nukleacija manje stabilnih modifikacija kinetički favorizirana.

Računalno modeliranje potvrđuje strukturno podudaranje između molekula di- ili trikarboksilnih kiselina i razmaka kalcija u kristalnoj rešetki COM. Zapravo, smatra se da je afinitet vezanja ovih kiselina rezultat njihove sposobnosti da usvoje konformacije u kojima dvije ili više karboksilnih skupina mogu stupiti u interakciju s površinom kristala COM.<sup>28</sup>

#### 4.1.3. Elektrokinetička mjerenja kalcijeva okalata dihidrata

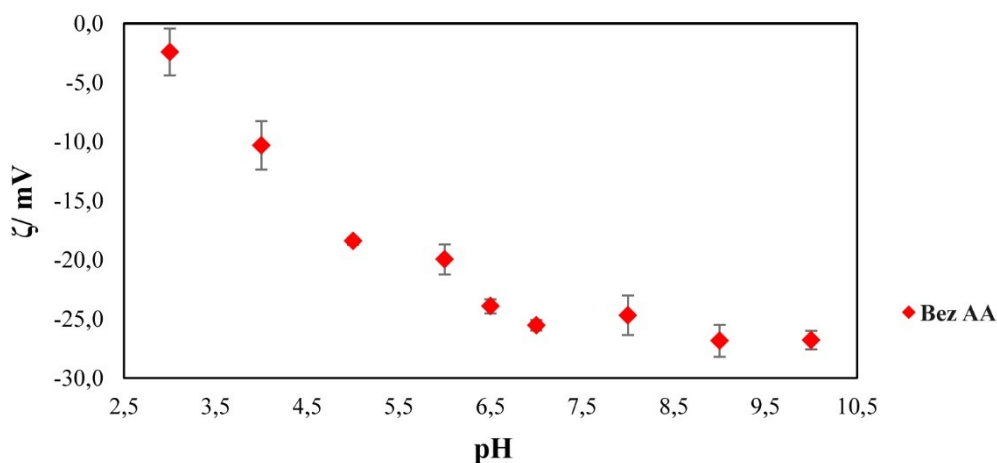
Pregled literature pokazuje da je nekoliko studija dostupno u vezi s mjerenjem zeta potencijala kalcijeva oksalata.<sup>59,110,145,161-165</sup> Ovi rezultati se ne mogu lako međusobno uspoređivati jer vrijednost zeta potencijala jako ovisi o vrsti otopine, pH, ionskoj jakosti, koncentraciji čestica i svojstvima same čestice. Iste čestice mogu pokazivati različite zeta potencijale u različitim eksperimentalnim uvjetima. Rezultati mjerenja zeta potencijala u ovom radu doprinose su literaturnim podacima s obzirom na utjecaj pH, a primarno su baza za istraživanja interakcija aminokiselina s COD.

Elektrokinetički (zeta,  $\zeta$ ) potencijal je parametar kojim se procjenjuje intenzitet uzajamnog odbijanja ili privlačenja među česticama. Kada čestice posjeduju veću gustoću površinskog naboja (veća apsolutna vrijednost zeta potencijala), one slabije agregiraju zbog visokog elektrostatskog odbijanja i stabilnosti, i obratno.<sup>166-168</sup>

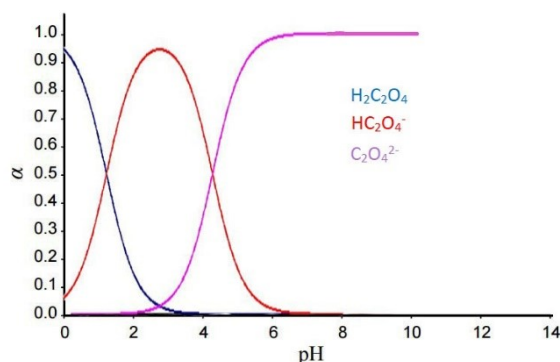
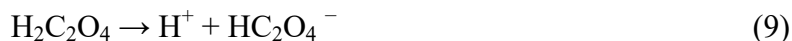
Veličina zeta potencijala pokazuje stupanj elektrostatskog odbijanja ili privlačenje između nabijenih čestica i to je jedan od važnih osnovnih parametara koji utječu na stabilnost čestica u otopini. Zeta potencijal može odražavati vrstu i količinu naboja na površini čestica.

Preliminarnim mjerenjima zeta potencijala COD u okviru ove disertacije određeno je da se u 30 minuti dostiže maksimum adsorpcije te je to vrijeme dalje korišteno za sva mjerenja pri različitim pH i različitim koncentracijama aminokiselina. Na **sluci 22** je prikazana ovisnost  $\zeta$ -potencijala COD dispergiranog u 6,0 mmol dm<sup>-3</sup> otopini Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, o pH. Mjerenja su provedena na morfološki dobro definiranom kristalnom sjemenu COD pripremljenom u uzv sustavu s omjerom  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  i  $c(\text{citrat}) = 9,0$  mmol dm<sup>-3</sup>. Ionskom kromatografijom je nađeno da nema adsorbiranog/ugrađenog citrata u COD. Mjerenja ukazuju da je za modelni sustav, bez aditiva, u cijelom istraživanom pH području ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$ ),  $\zeta$ -potencijal bio negativan. U literaturi se negativni naboj na površini COD kristala objašnjava putem {100} i {011} ravnina. Iz literature je poznato da bi {100} ravnina trebala biti pozitivnija od {011} ravnine zbog većeg omjera Ca<sup>2+</sup>/C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> po jedinici površine. Dakle, veća površina {100} ravnine ukazuje na nižu gustoću negativnog naboja kristalne površine i niži apsolutni zeta potencijal.<sup>110</sup> S promjenom pH otopine, negativni zeta potencijal smanjuje

se od  $-2,4 \pm 1,98$  mV do  $-23,9 \pm 0,60$  mV u području  $3,0 \leq \text{pH} \leq 6,5$ . Oksalna kiselina je jaka kiselina koja disocira u dva stupnja (jednadžba 9 i 10). U ovom rasponu pH, oksalna kiselina je u obliku  $\text{HC}_2\text{O}_4^-$  i  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  iona (**slika 23**). Kod  $\text{pH} = 6,5$  zeta potencijal je dostigao maksimalnu negativnu vrijednost ( $-23,9 \pm 0,60$  mV), koja se tek neznatno mijenja kada se pH poveća na  $\text{pH} = 10$  ( $-26,8 \pm 0,78$  mV). U navedenom pH rasponu  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  je dominantni ionski oblik oksalata u otopini (**slika 23**) koji se specifično adsorbira na površinu i doprinosi većim negativnim vrijednostima zeta potencijala.



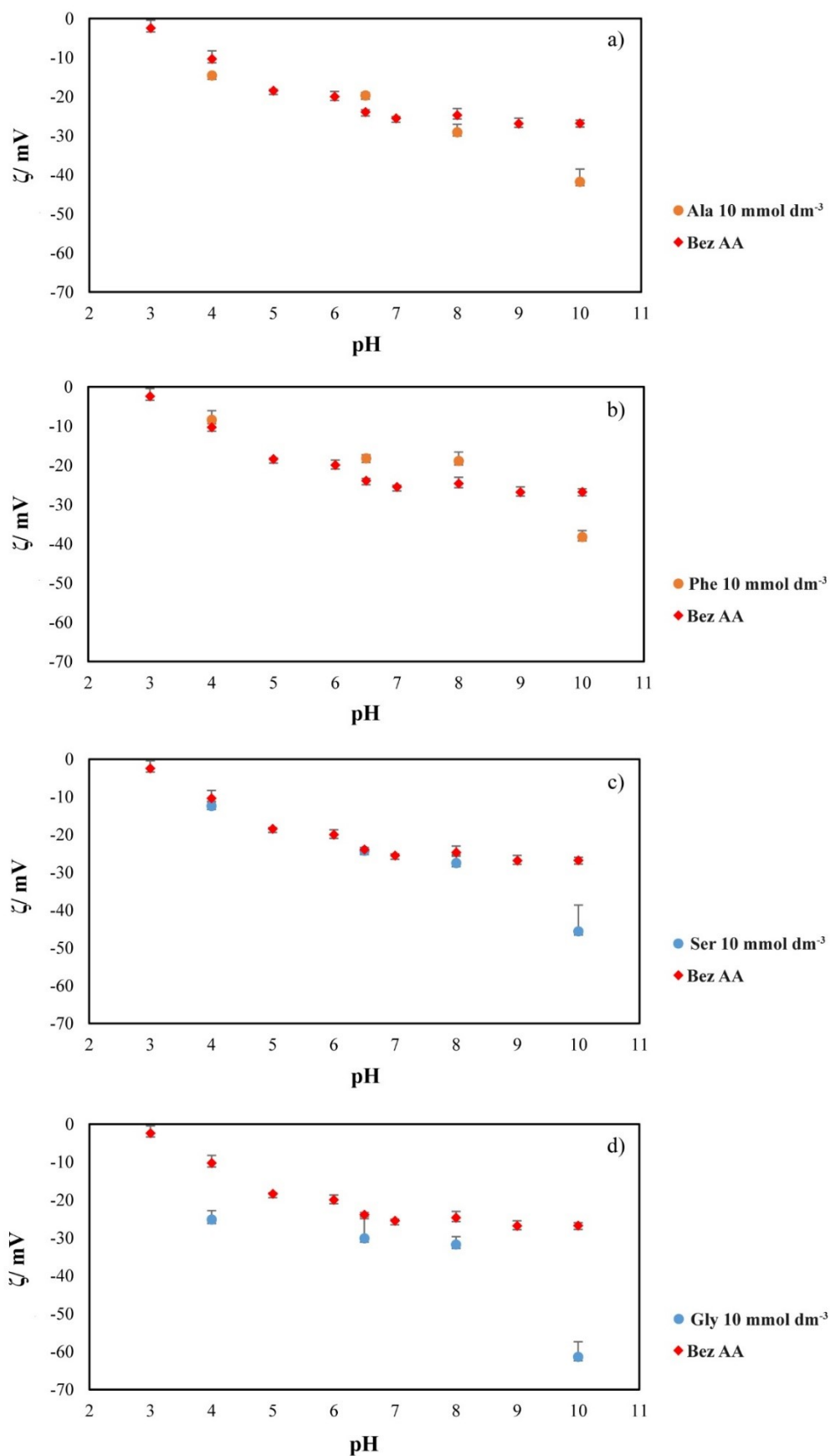
**Slika 22.** ζ-potencijal kristalnog sjemena COD u ovisnosti o pH; COD pripravljen u uzv sustavu s omjerom  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  i  $c(\text{citrat}) = 9,0$  mmol dm<sup>-3</sup>.



**Slika 23.** Distribucijski dijagram oksalne kiseline. U izračunu su korištene  $\text{p}K_1 = 1,27$ ,  $\text{p}K_2 = 4,27$  vrijednosti konstanti ravnoteže disocijacije.

Elektrokinetička mjerenja pripremljenog kristalnog sjemena COD napravljena su i uz prisustvo aminokiselina. Na **slici 24** prikazan je utjecaj aminokiselina (Ala, Phe, Ser i Gly)

koje se razlikuju po bočnim lancima (vidi Literaturni pregled, poglavlje 2.7.1, **slika 12**) na  $\zeta$ -potencijal pri različitim pH vrijednostima ( $4 \leq \text{pH} \leq 10$ ).



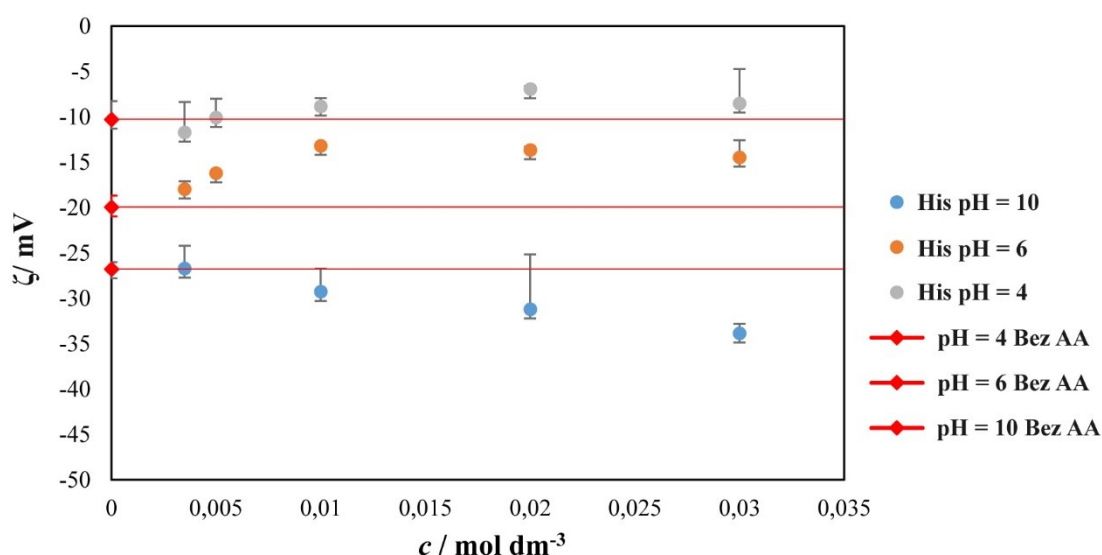
**Slika 24.**  $\zeta$ -potencijal kristalnog sjemena COD dispergirano u otopini Bez AA i u otopini uz dodatak 10,0 mmol dm<sup>-3</sup>: a) Ala, b) Phe, c) Ser i d) Gly, kao funkcija pH.



Ala, Phe, Ser i Gly u pH području od 4 do 8 prevladavaju u obliku zwitter-iona. Pretpostavka je da se amino dio zwitter-iona svih AA veže na  $C_2O_4^{2-}$  ione, a karboksilni dio zwitter-iona veže na  $Ca^{2+}$  ione na površini COD kristala te se  $\zeta$ -potencijal neznatno mijenja. Iznad  $pH \geq 8$  deprotonira se i amino skupina tih AA te su navedene AA u anionskoj formi (vidi Literaturni pregled, **tablica 5**). Iz **slike 24** vidljivo je da je pri  $pH = 10$  promjena  $\zeta$ -potencijala izražena prema slijedu: Gly > Ser > Ala > Phe.

AA se adsorbiraju najvjerojatnije elektrostatskim interakcijama svojih amino i karboksilnih skupina na  $C_2O_4^{2-}$  i  $Ca^{2+}$  ione na površini COD, a najveći efekt imaju polarne AA Gly i Ser pri  $pH = 10$ . Dobiveni rezultati mogu ukazivati na činjenicu da je dodatkom Gly i Ser došlo do stvaranja dodatnih vodikovih veza između bočnih lanca Gly (-H) i Ser (-OH) s površinom COD.

Na **slici 25** prikazan je utjecaj koncentracije His na promjenu  $\zeta$ -potencijala pri  $pH$  4, 6 i 10.



**Slika 25.** Ovisnost  $\zeta$ -potencijala kristalnog sjemena COD o koncentraciji His pri  $pH = 4, 6$  i  $10$ .

Pri  $pH = 4$  uočava se smanjenje negativnosti  $\zeta$ -potencijala s povećanjem koncentracije His. U tim uvjetima, samo je karboksilna skupina His deprotonirana, a imidazolni prsten i amino skupina su protonirani, zbog čega je ukupni naboj His pozitivan (vidi Literaturni pregled, **tablica 5**). Pretpostavka je da se karboksilna skupina elektrostatskim interakcijama veže za pozitivni dio COD kristala te je ukupni  $\zeta$ -potencijal pozitivniji u odnosu na sustav Bez AA. Elektrostatske veze opisuju međusobna privlačenja suprotno nabijenih iona (pozitivno nabijeni ioni  $Ca^{2+}$  na površini kristala i negativno nabijeni ioni kisika  $O^{2-}$  u karboksilnoj

skupini), odnosno slabe interakcije koje u datim uvjetima nastaju. Pri  $\text{pH} = 6$  His je u otopini zastupljen u dva oblika u omjeru približno 1:1 (vidi Literaturni pregled, **tablica 5**). U jednom obliku deprotonirana je karboksilna skupina, a u drugom karboksilna skupina i imidazolni prsten. Kod ovog  $\text{pH}$  vrijednost  $\zeta$ -potencijala je negativnija nego pri  $\text{pH} = 4$ , ali ukoliko se gleda sustav Bez AA, onda je  $\zeta$ -potencijal pozitivniji. Pretpostavka je da se His veže svojim negativnim dijelovima (karboksilni i imidazolni prsten) na pozitivni dio COD kristala i pridonosi pozitivnijem ukupnom  $\zeta$ -potencijalu. Povećanjem koncentracije His do  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  zabilježeno je smanjenje negativnosti  $\zeta$ -potencijala, zatim daljnjim povećanjem koncentracije bilježi se vrlo blago povećanje negativnosti. Pretpostavka je da je većina aktivnih (pozitivnih) mjesta na COD zauzeta pri većoj koncentraciji His u otopini te nema značajnije promjene  $\zeta$ -potencijala. Pri  $\text{pH} = 10$  His je također zastupljen u dva oblika i to u omjeru 9:1. U tom omjeru u otopini prevladava oblik koji ima deprotonirane amino i karboksilnu skupinu te imidazolni prsten. S povećanjem koncentracije His u promatranom području povećava se negativnost  $\zeta$ -potencijala.

Povećanjem  $\text{pH}$  vrijednosti ( $4 > 6 > 10$ ) His se gotovo potpuno deprotonira što rezultira povećanjem negativnosti  $\zeta$ -potencijala COD.

#### **4.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u jednostavnom sustavu i u umjetnom urinu**

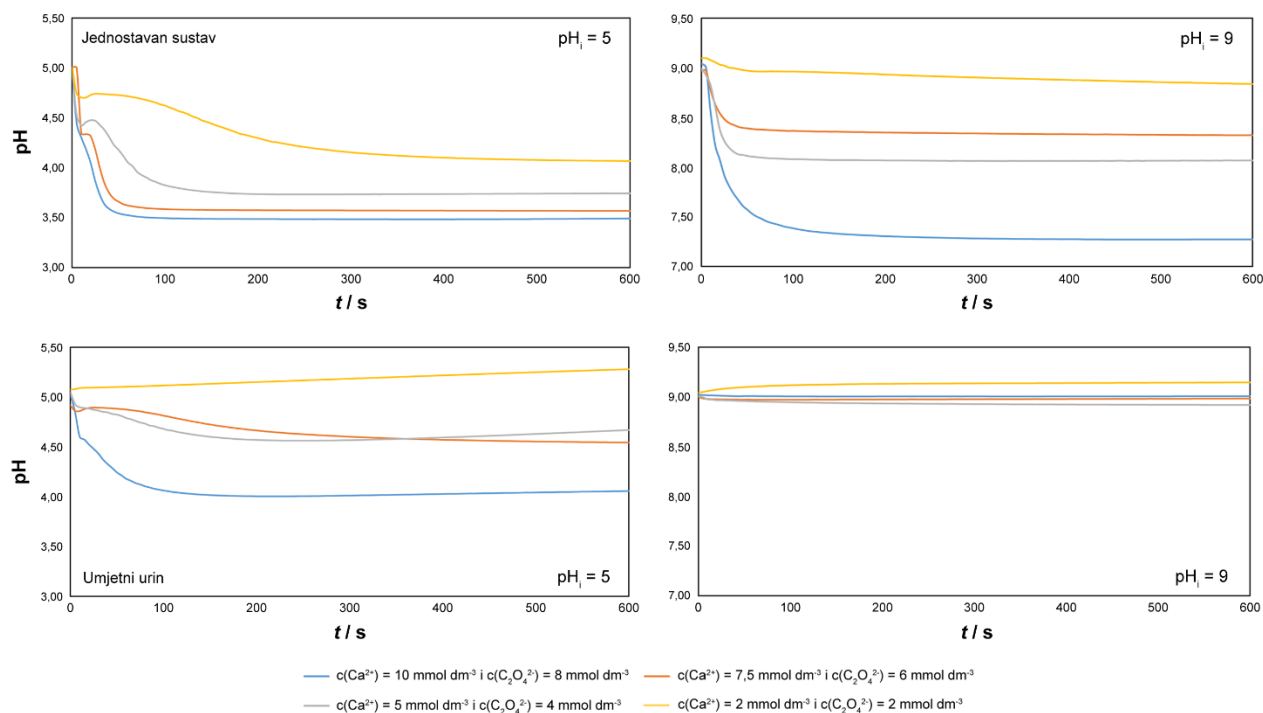
Pri proučavanju spontanog taloženja kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije pripremljeni su sustavi kako je opisano u Eksperimentalnom dijelu ovog rada (poglavlje 3.1.2). Istraživanja su provedena miješanjem otopine  $\text{CaCl}_2$  i otopine  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  otopina (jednostavan sustav) ili miješanjem otopine  $\text{CaCl}_2$  i otopine  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ /komponente urina (sustav umjetnog urina). Utjecaj  $\text{pH}$  kao vrlo važnog čimbenika taloženja kalcijeva oksalata, također je istražen. Promjene  $\text{pH}$  vrijednosti utječu na formiranju određenih vrsta kalcijeva oksalata. Kao što je u Uvodu navedeno, ljudski urin je slabo kiseo ( $\text{pH} = 6,0 - 6,5$ ), ali može varirati tijekom 24 sata<sup>112</sup> te biti i kiseliji ( $\text{pH} = 4,5$ ) ili bazičniji ( $\text{pH} = 8,0$ ), ovisno o prehrani, unosu lijekova, prisutnosti infekcija i mnogih bolesti. Određeni čimbenici i fiziološka stanja mogu povećati gornju granicu  $\text{pH}$  vrijednosti urina na  $\text{pH} \geq 8,0$ .<sup>169,170</sup> Kalcijev oksalat može se formirati u kiselom, neutralnom i lužnatom urinu. U ovoj disertaciji sva istraživanja spontanog taloženja kalcijeva oksalata u jednostavnom sustavu i sustavu umjetnog urina provedena su pri dva početna  $\text{pH}$ :  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

U **tablici 10** prikazane su početne koncentracije reaktanata u taložnim sustavima te izračunate početne prezasićenosti (vidi poglavlje 3.3). Sustav koji je označen zelenom bojom predstavlja sustav koji je detaljnije analiziran.

**Tablica 10.** Početne koncentracije reaktanata i izračunata prezasićenost s obzirom na COM,  $S_i$  (COM) u istraživanim taložnim sustavima.

Taložni sustav		Jednostavan sustav		Umjetni urin	
		pH <sub>i</sub> = 5	pH <sub>i</sub> = 9	pH <sub>i</sub> = 5	pH <sub>i</sub> = 9
$c(\text{CaCl}_2)_i / \text{mmol dm}^{-3}$	$c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4)_i / \text{mmol dm}^{-3}$	$S_i$ (COM)			
2,0	0,6	10,70	11,04	3,82	3,89
5,0		12,29	12,52	5,77	5,87
7,5		12,75	12,94	6,82	6,93
10,0		13,00	13,17	7,62	7,74
2,0	2,0	17,32	17,80	6,93	7,07
5,0		21,55	21,98	10,47	10,67
7,5		22,75	23,12	12,39	12,60
10,0		23,39	23,71	13,85	14,08
2,0	4,0	20,73	21,13	9,67	9,87
5,0		28,38	28,94	14,66	14,95
7,5		30,90	31,41	17,38	17,68
10,0		32,21	32,66	19,45	19,77
2,0	6,0	22,13	22,49	11,65	11,90
5,0		32,03	32,62	17,72	18,05
7,5		35,97	36,60	21,04	21,40
10,0		38,19	38,77	23,58	23,99
2,0	8,0	22,88	23,20	13,21	13,47
5,0		34,16	34,67	20,14	20,54
7,5		39,31	39,95	23,96	24,41
10,0		42,46	43,10	26,92	27,35

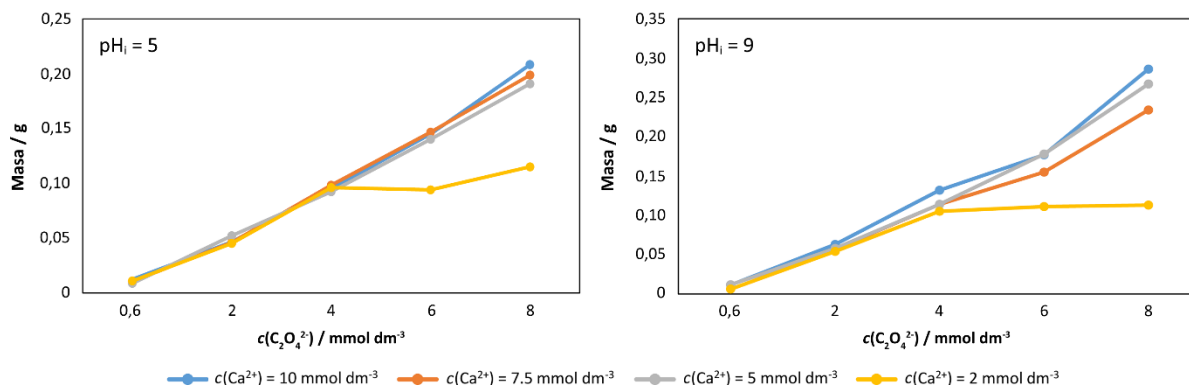
Tijek spontanog taloženja promatran je mjerenjem pH taložnog sustava. Na **slici 26** prikazani su odabrani sustavi koji prikazuju promjenu pH s vremenom tijekom spontanog taloženja kalcijeva oksalata pri različitim početnim koncentracijama reaktanata i različitim prezasićenostima u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu pri pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9.



**Slika 26.** Ovisnost pH o vremenu spontanog taloženja kalcijeva oksalata pri različitim početnim koncentracijama reaktanata u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

U svim promatranim sustavima, odmah po miješanju reaktanata zabilježeno je zamućenje, to jest trenutačno je došlo do taloženja. Pri tom u sustavima s nižom početnom koncentracijom i nižom početnom prezasićenosti zamućenje je bilo znatno slabije. Najslabije zamućenje i najmanja promjena pH u vremenu zabilježena je u jednostavnom sustavu s najnižom početnom koncentracijom reaktanata  $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $S_i \approx 17$ ) pri oba početna pH. U skladu s tim, najizraženije zamućenje i nagli pad pH u vremenu zabilježeni su u jednostavnom sustavu s najvećim početnim koncentracijama  $c(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $S_i \approx 42$ ).

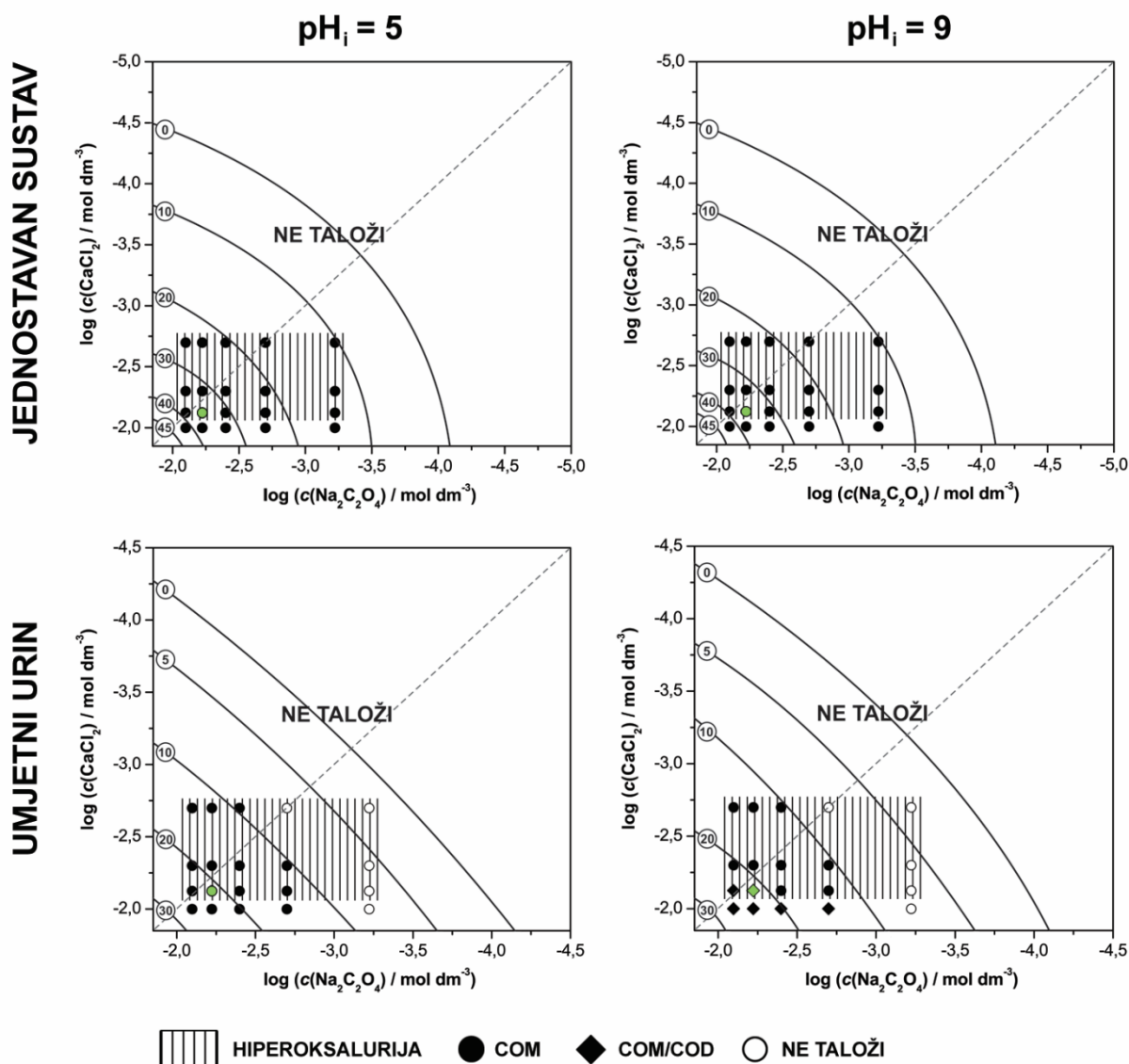
Što je bila značajnija promjena pH sustava, to je veća masa taloga izolirana. Na **slici 27** prikazano je povećanje mase istaloženog COM s povećanjem početne koncentracije oksalata i kalcija (povećanje početne prezasićenosti, **tablica 10**). Maksimalna izolirana masa bila je  $\approx 0,2 \text{ g/400 mL}$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\approx 0,3 \text{ g/400 mL}$  pri  $\text{pH}_i = 9$ .



**Slika 27.** Masa kalcijeva oksalata s obzirom na početnu koncentraciju oksalata i kalcija pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

Praćenje spontanog taloženja u sustavu umjetnog urina pokazalo je vrlo slične promjene pH u vremenu za slučaj sustava pri  $\text{pH}_i = 5$ . Značajnije razlike u odnosu na jednostavan sustav primjećene su za sustav umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 9$ . U navedenom sustavu, pri početnim prezasićenostima  $S_i \geq 15$ , došlo je do trenutačnog taloženja, ali je promjena pH s vremenom bila neznatna (**slika 26**). Pri oba početna pH u sustavu umjetnog urina pri najmanjoj početnoj koncentraciji  $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$  i pri najmanjoj početnoj prezasićenosti,  $S_i \approx 7$ , nije uopće zabilježeno taloženje u cijelom istraženom vremenu od 20 min.

Raspodjela čvrstih faza nastalih nakon 20 minuta taloženja u jednostavnom sustavu i u sustavu umjetnog urina u kojima se koncentracije reaktanata mijenjaju u području koje odgovara hiperoksaluriji prikazana je u taložnom dijagramu na **slici 28**. Taložni dijagrami daju važne informacije o vrsti i svojstvima taloga (sastav, topljivost, stabilnost, morfologiju...) koji nastaju pri određenom rasponu koncentracija reaktanata i u vremenu taloženja. Unutar taložnog dijagrama naznačuju se područja taloženja pojedinih čvrstih faza te granice prezasićenosti i granica topljivosti. Pune linije u taložnom dijagramu na **slici 28** označavaju granice prezasićenosti s obzirom na COM (vidi račun u poglavlju 3.3). Linija koja označava prezasićenost  $S_i = 0$  predstavlja granicu topljivosti za najstabilniju fazu COM. Isprekidana dijagonalna linija označava sustave s ekvimolarnim koncentracijama. Istaložene hidratne faze (COM i smjesa COM i COD) u dijagramu su prikazani različitim oblicima. Strukturne analize uzoraka i potvrde istaloženih faza u sustavima unutar taložnog dijagrama provedene su pomoću PXRD, FT-IR i TG analize (vidi FT-IR, TG i PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.1, 8.2 i 8.3).



**Slika 28.** Taložni dijagram u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu nakon 20 min taloženja. Granice prezasićenosti označene su tankim punim linijama (brojevi označavaju  $S_i$  vrijednost s obzirom na COM za promatrano područje). Okomitim linijama je označeno područje hiperoksalurije. Istaložene hidratne faze (COM i smjesa COM/COD) u dijagramu su prikazani različitim oblicima. Puni oblici označavaju sustave u kojima se pojavljuje talog koji je analiziran, a prazni krugovi sustave u kojima nije došlo do taloženja. Sustav označen zelenom bojom u nastavku je detaljnije analiziran.

U jednostavnom sustavu u cijelom ispitivanom području koncentracija kalcija i oksalata ( $10 \leq S_i \leq 43$ ; **slika 28, tablica 10**) pri oba  $\text{pH}_i$  taloži isključivo COM. Ispitivano područje koncentracija u sustavu umjetnog urina pri oba  $\text{pH}_i$  je područje prezasićenosti  $4 \leq S_i \leq 28$ . U tom sustavu pri oba  $\text{pH}_i$  i prezasićenosti  $S_i < 10$  nije zabilježeno taloženje u vremenu taloženja od 20 min (**slika 28** prazni krugovi, **tablica 10**). Pri  $\text{pH}_i = 9$  u svim sustavima s najvišom

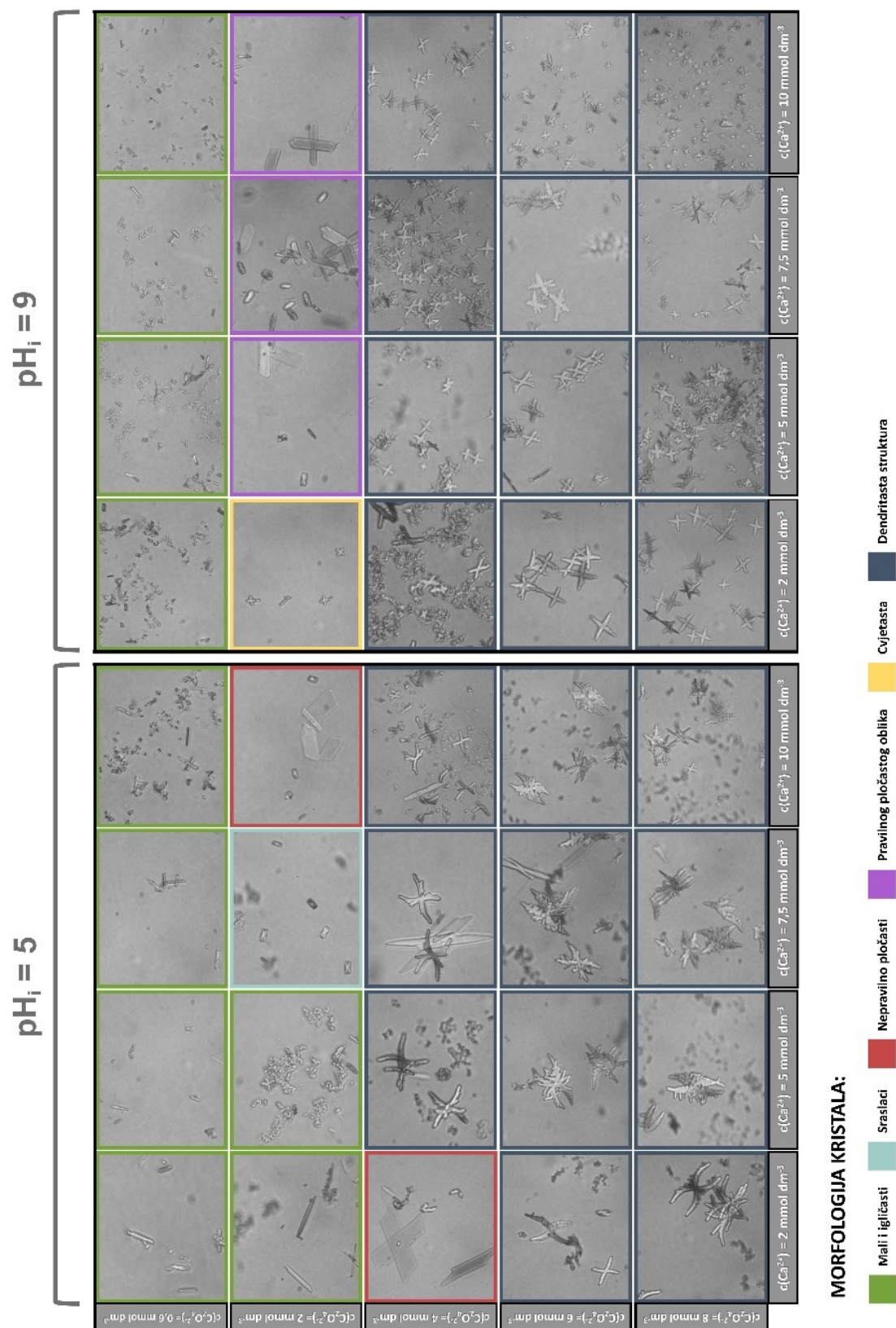
koncentracijom kalcija,  $c(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , te u sustavima s  $c(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \geq 6 \text{ mmol dm}^{-3}$  taloži COM u smjesi sa COD.

Ovi taložni dijagrami su prva takva sustavna istraživanja taloženja kalcijeva oksalata budući da pregledom literature nisu zabilježena istraživanja koja bi pri istim početnim uvjetima usporedila sustave s toliko različitom kemijskom kompleksnošću. Međutim, rezultate iz ove disertacije je moguće usporediti s taložnim dijagramom izrađenim u  $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl sustavu kao poveznici između jednostavnog i kompleksnijeg sustava.<sup>18</sup> U navedenom radu promatrano je taloženje kalcijeva oksalata u koncentracijskom području  $1 \cdot 10^{-5} \leq c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) / \text{mol dm}^{-3} \leq 1 \cdot 10^{-1}$  pri  $\text{pH} = 6,5$  u vremenu od 10 min do 30 dana. Primjećeno je da pri 10 min talože COM i COD, a stajanjem taloga do 30 dana dolazi do transformacije COD u stabilniji COM.

#### 4.2.1. Morfologija kalcijeva oksalata u jednostavnom sustavu

Na **slici 29** prikazane su morfologije istaloženog COM u širokom koncentracijskom području  $2 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{Ca}^{2+}) \leq 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,6 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \leq 8 \text{ mmol dm}^{-3}$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ . Pri najmanjoj početnoj koncentraciji oksalata,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $11 \leq S_i \leq 13$ ), morfologija istaloženog COM vrlo je slična za oba pH i kroz cijelo koncentracijsko područje  $\text{Ca}^{2+}$ . Prevladavaju vrlo sitni kristali, kristali oblika iglica ili gdje koji sitni prizmatički oblik (**slika 29**, zeleno obojeni kvadrati). Povećanjem koncentracije oksalata,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ , i povećanjem koncentracije kalcija,  $c(\text{Ca}^{2+}) \geq 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pri  $\text{pH}_i = 5$  uočena je promjena morfologije te su kristali nešto veći, nepravilnog pločastog oblika ili sraslaci. Pri  $\text{pH}_i = 9$  u istom koncentracijskom području zabilježena je pojava kristala cvjetaste morfologije te većih, pravilnih pločastih kristala. Daljnjim povišenjem koncentracije oksalata,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \geq 4 \text{ mmol dm}^{-3}$ , i prezasićenosti sustava,  $S_i \geq 28$ , pri oba pH uočena je pojava dendritne strukture kalcijeva oksalata (**slika 29**, tamno plavo obojeni kvadrati). Dendritna struktura je većinom oblika slova iks (X). Pri  $\text{pH}_i = 5$  „tijelo i krakovi“ su širi. Također se može primijetiti da su pojedinačni kristali u otopini nešto veći pri  $\text{pH}_i = 5$ .

Dendritni oblik COM zabilježen je u literaturi kod viših koncentracija oksalata i kalcija.<sup>82,103</sup> Wei i suradnici<sup>82</sup> istaložili su pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  u ekvimolarnom sustavu ( $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) dendritne, tanke, pločaste COM kristale sa nazubljenim rubovima. S porastom temperature na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , morfologija kristala se mijenjala. Kristali su postali manji i više nalikuju slovu X, a rubovi su postali manje nazubljeni. Također su primijetili da su ti kristali skloni agregaciji.

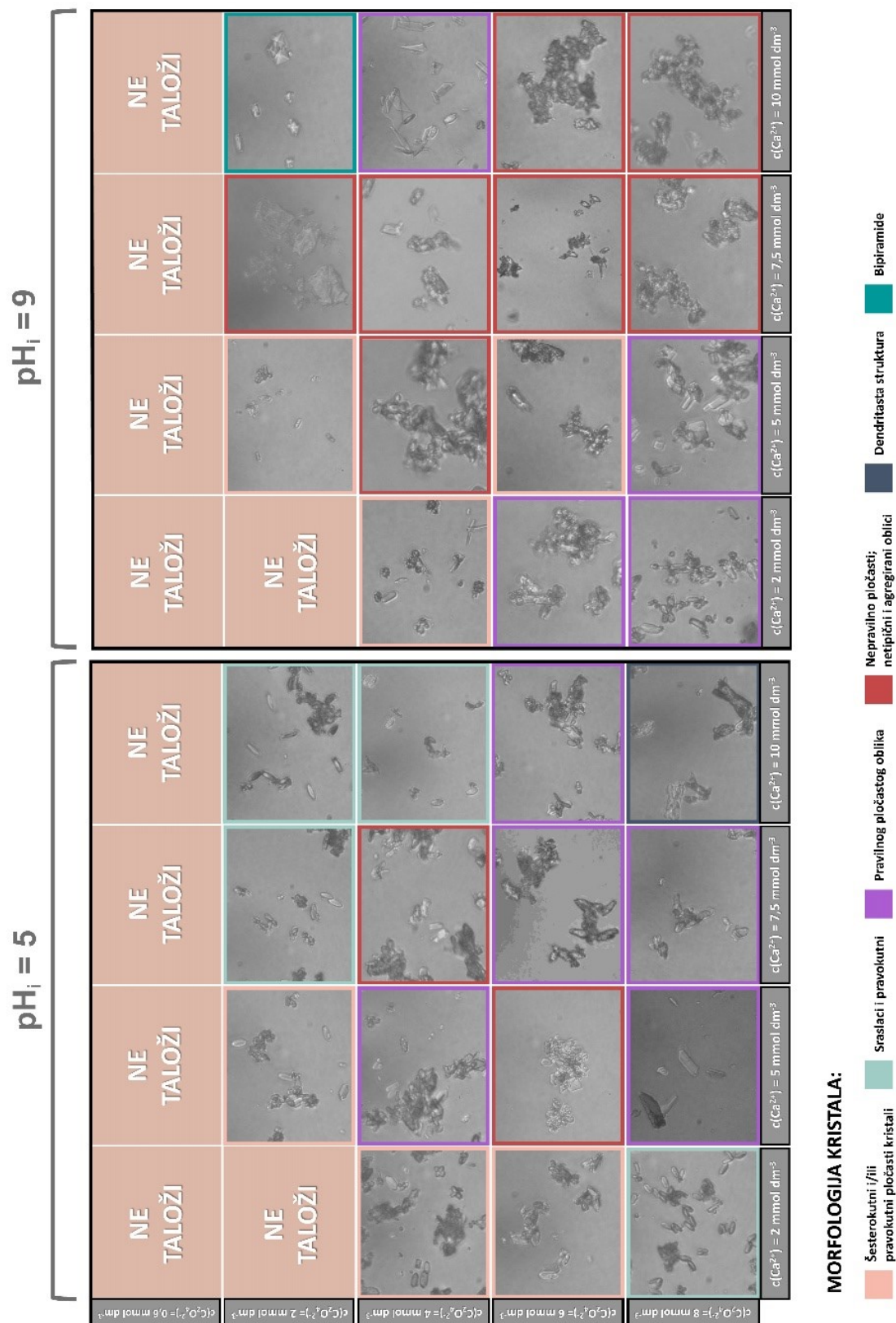


**Slika 29.** Morfologija taloga spontano istaloženih u jednostavnom sustavu u širokom koncentracijskom području ( $2 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{Ca}^{2+}) \leq 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,6 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \leq 8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .



#### 4.2.2. Morfologija kalcijeva oksalata u sustavu umjetnog urina

Na **slici 30** prikazane su morfologije istaloženog kalcijeva oksalata u širokom koncentracijskom području  $2 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{Ca}^{2+}) \leq 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,6 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \leq 8 \text{ mmol dm}^{-3}$  u umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ . Pri najnižoj koncentraciji oksalata ( $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i pri svim koncentracijama kalcija ( $2 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{Ca}^{2+}) \leq 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), dakle u sustavima s početnom prezasićenosti  $S_i \leq 10$ , nije zabilježen nastanak taloga (**slike 28 i 30, tablica 10**). Nastanak taloga također nije zabilježen ni pri koncentraciji oksalata  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$  i najnižoj koncentraciji kalcija  $c(\text{Ca}^{2+}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Morfologija kalcijeva oksalata istaloženog u umjetnom urinu (**slika 30**) pri navedenim uvjetima značajno se razlikuje od one u jednostavnom sustavu, kristali su pravilnijeg oblika i dosta agregirani. Pri  $\text{pH}_i = 5$  većinom su evidentirani pravilni šesterokutni, pločasti ili prizmatski kristali. Za razliku od toga, pri  $\text{pH}_i = 9$  većinom prevladavaju nepravilni, netipični i pločasti kristali. Također je za ovaj sustav karakteristična agregacija većih i manjih kristala. U sustavima pri  $\text{pH}_i = 9$  i s početnom koncentracijom kalcija  $c(\text{Ca}^{2+}) \geq 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  u smjesi s COM taloži i COD. No, usljed jake agregacije kristala otežano je karakterizirati njegovu morfologiju. U sustavu s najmanjom koncentracijom oksalata,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ , COD je taložio kao tetragonalna bipiramida. Rezultati istraživanja morfologije u jednostavnom sustavu i u sustavu umjetnog urina iz ove disertacije u skladu su sa zapažanjem Burns i Finlayson<sup>24</sup>, Carvalho i Vieira<sup>171</sup> i Robertson i suradnika.<sup>172</sup> U njihovim je radovima utvrđeno da je morfologija usko povezana sa prezasićenosti i omjerom koncentracije kalcija i oksalata. Burns i Finlayson<sup>24</sup> taložili su u jednostavnim puferskim otopinama, a Carvalho i Vieira<sup>171</sup> i Robertson i suradnici<sup>172</sup> u pravom urinu ( $S_i \approx 30$ ). Zaključeno je da se pri niskim prezasićenostima događa heterogena nukleacija na nespecifičnim nečistoćama.<sup>173,174</sup> Nađeno je da je brzina rasta kontrolirana nekim površinskim procesom.<sup>14,108,175</sup> Pri nižim prezasićenostima dobiveni su relativno kompaktni kristali COM i COD, poput ovih dobivenih u ovoj disertaciji (**slika 29 i 30**). Taloženje dendrita pri višim prezasićenostima ukazuje da je difuzija iona postala mehanizam kontrole brzine rasta.<sup>42</sup>



**Slika 30.** Morfologija taloga spontano istaloženih u sustavu umjetnog urina u širokom koncentracijskom području ( $2 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{Ca}^{2+}) \leq 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,6 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \leq 8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

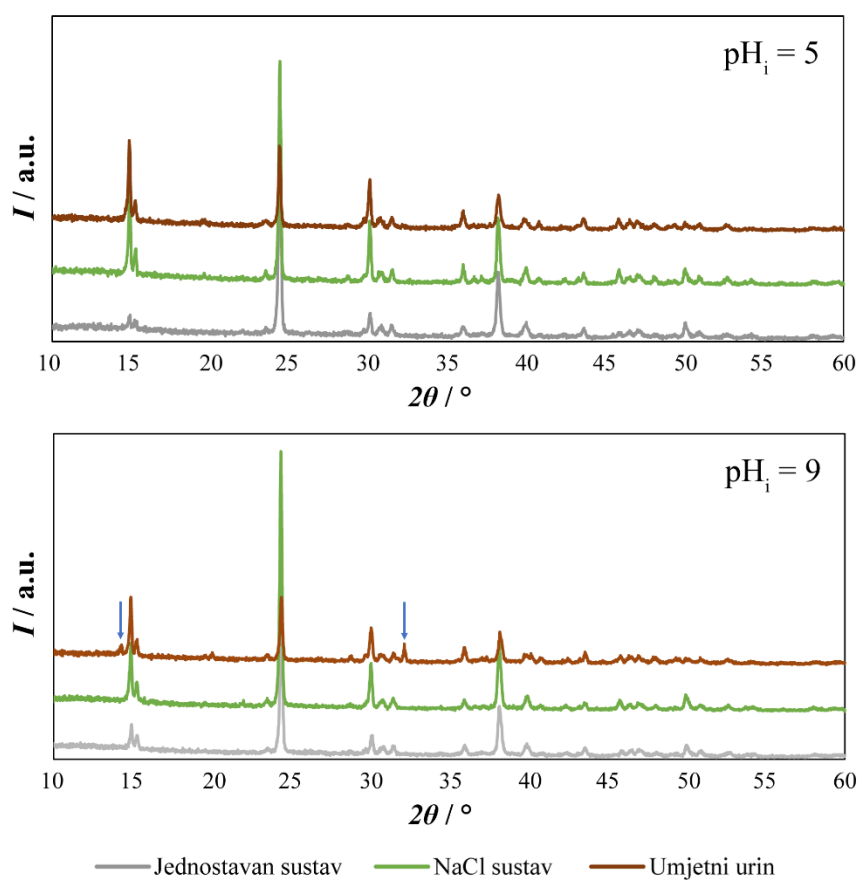
### 4.3. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije

Kako bi pojasnili razlike u zapažanjima između jednostavnog sustava i sustava umjetnog urina odabran je jedan sustav (modelni sustav označen zelenom bojom na **slici 26**) s kojim su napravljena dodatna istraživanja. Uz prethodno opisana dva sustava odabran je još jedan sustav u koji je uz reaktante dodan samo NaCl koncentracije ( $c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) kao u fiziološkoj otopini. Taj sustav osmišljen je kao poveznica između jednostavnog sustava u kojem su samo taložne komponente,  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , i umjetnog urina u kojem su brojne druge komponente urina. U tom sustavu početne koncentracije reaktanata su kao i u jednostavnom sustavu i u umjetnom urinu:  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Početna prezasićenost NaCl sustava pri oba pH je  $S_i \approx 24$ .

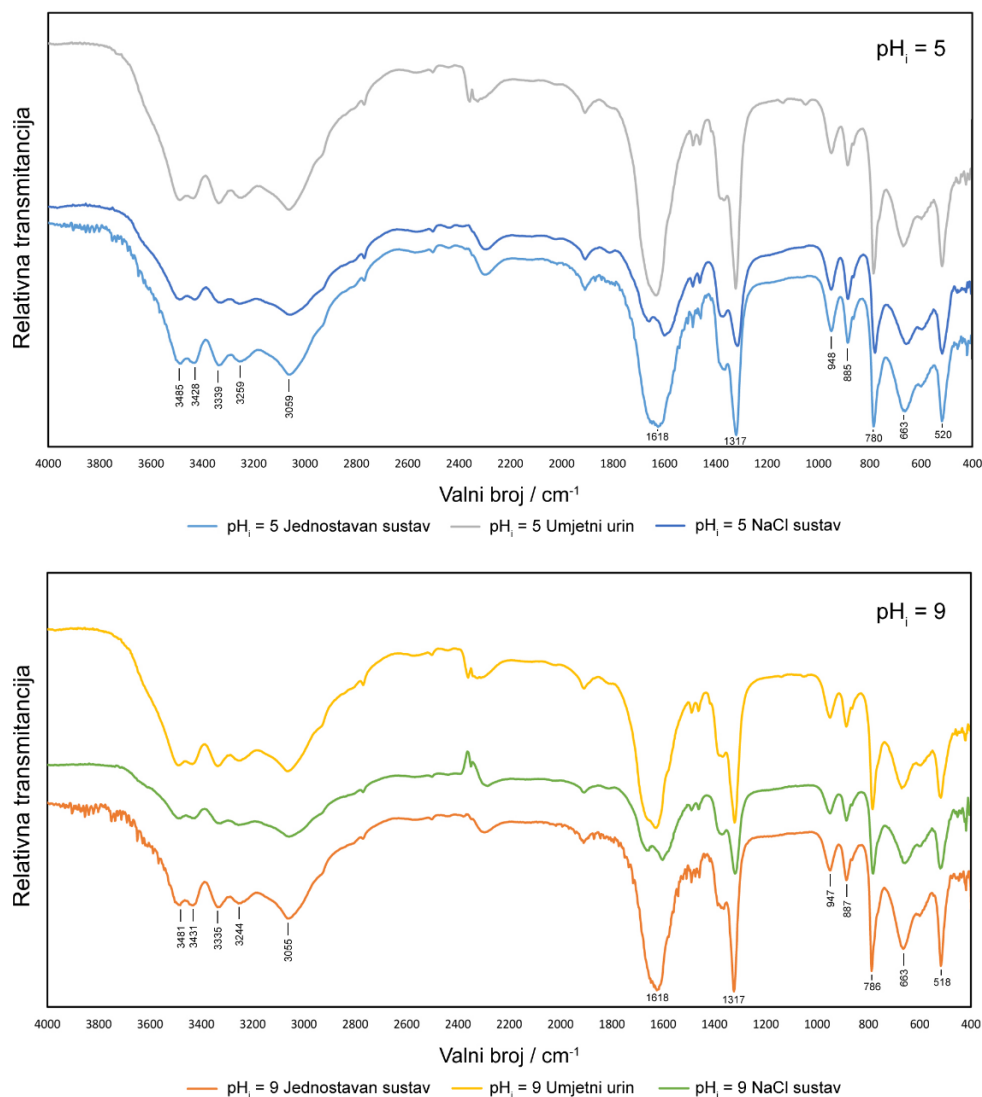
Strukturne analize modelnih sustava provedene su pomoću PXRD, FT-IR i TG analiza koje su uspoređivane sa standardima COM i COD (vidi FT-IR, TG i PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.1, 8.2 i 8.3). Rezultati TG analize ukazuju na to da se gubitak mase dogodio tijekom samo jednog koraka (**tablica 11**). U svim sustavima taloži samo COM. U sustavu umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 9$  ukupni gubitak mase iznosio je 12,45 % što ukazuje da osim COM u navedenom sustavu taloži i COD. Rezultati FT-IR analize (**slika 32**) ukazuju na taloženje COM. Obzirom da se FT-IR metoda smatra semikvantitativnom metodom za određivanje oksalata i nije precizna ukoliko je prisutan mali udio druge komponente ( $\leq 10 \%$ ) na **slici 32** nisu zabilježene značajnije razlike u spektrima.<sup>142</sup> **Slika 31** prikazuje rentgenske difrakcijske analize modelnog sustava. U svim uzorcima taloži isključivo COM osim pri  $\text{pH}_i = 9$  u umjetnom urinu. Kvantitativno određivanje tog uzorka pokazuje da je smjesa sadržavala oko 91 % COM i 9 % COD. Ovaj rezultat u slaganju je s rezultatima TG analize.

**Tablica 11.** Termogravimetrijske analize modelnog sustava ( $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) u jednostavnom sustavu, NaCl i umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  ( $t_0$  – početna temperatura,  $t_{\text{max}}$  – temperatura maksimuma,  $t_e$  – temperatura završetka,  $\Delta m$  – gubitak mase izražen u postotku, hidratni oblik koji taloži).

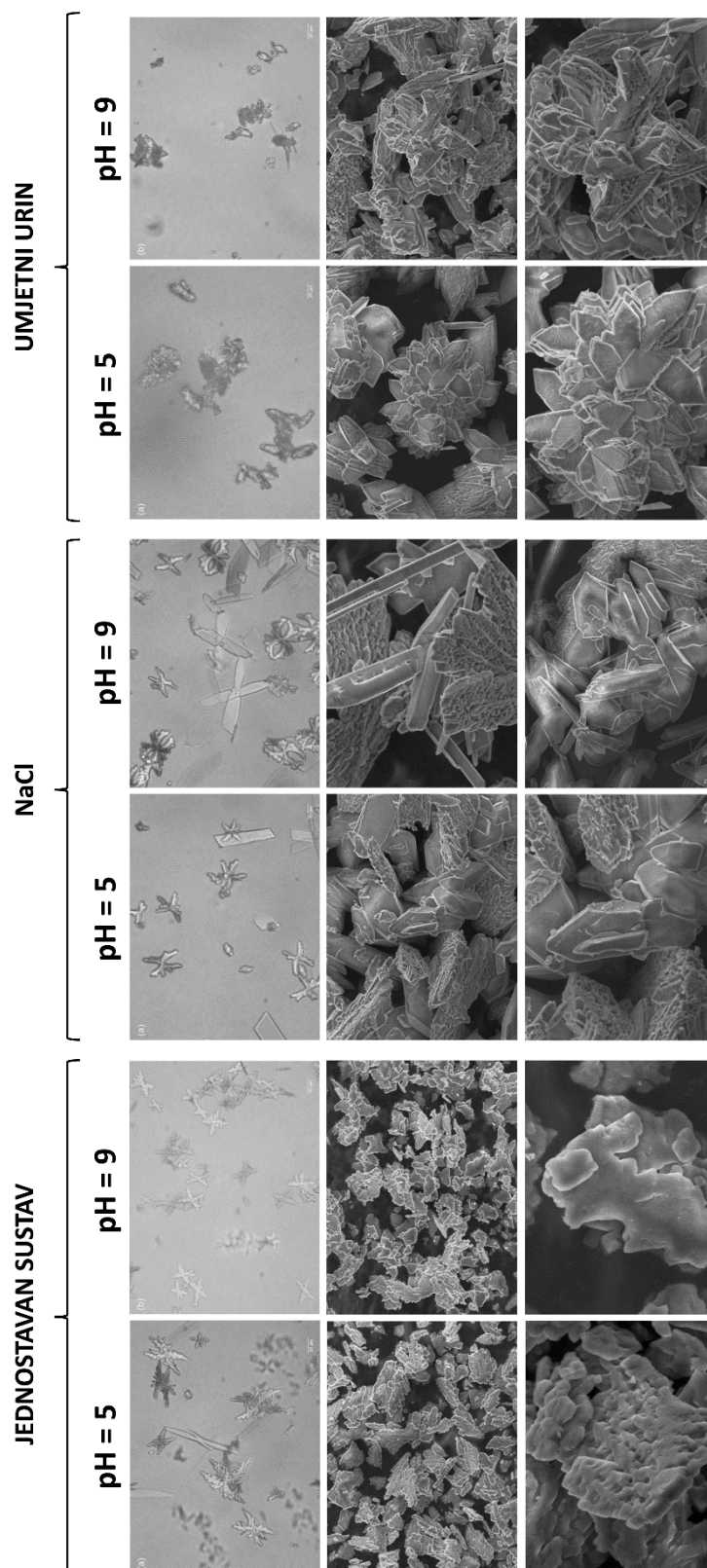
Sustav		$t_0 / ^\circ\text{C}$	$t_{\text{max}} / ^\circ\text{C}$	$t_e / ^\circ\text{C}$	$\Delta m / \%$	Faza
$\text{pH}_i = 5$	Jednostavan	89,96	152,49	193,45	12,12	COM
	NaCl	89,00	148,96	184,74	12,23	COM
	Umjetni urin	89,24	147,60	188,72	11,54	COM
$\text{pH}_i = 9$	Jednostavan	71,51	147,02	181,09	11,23	COM
	NaCl	89,12	145,70	177,86	11,59	COM
	Umjetni urin	86,47	143,49	184,35	12,45	COM/COD



**Slika 31.** Rentgenogrami uzoraka pripremljenih u modelnom sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  (plave strelice označavaju difrakcijske maksimume od COD).



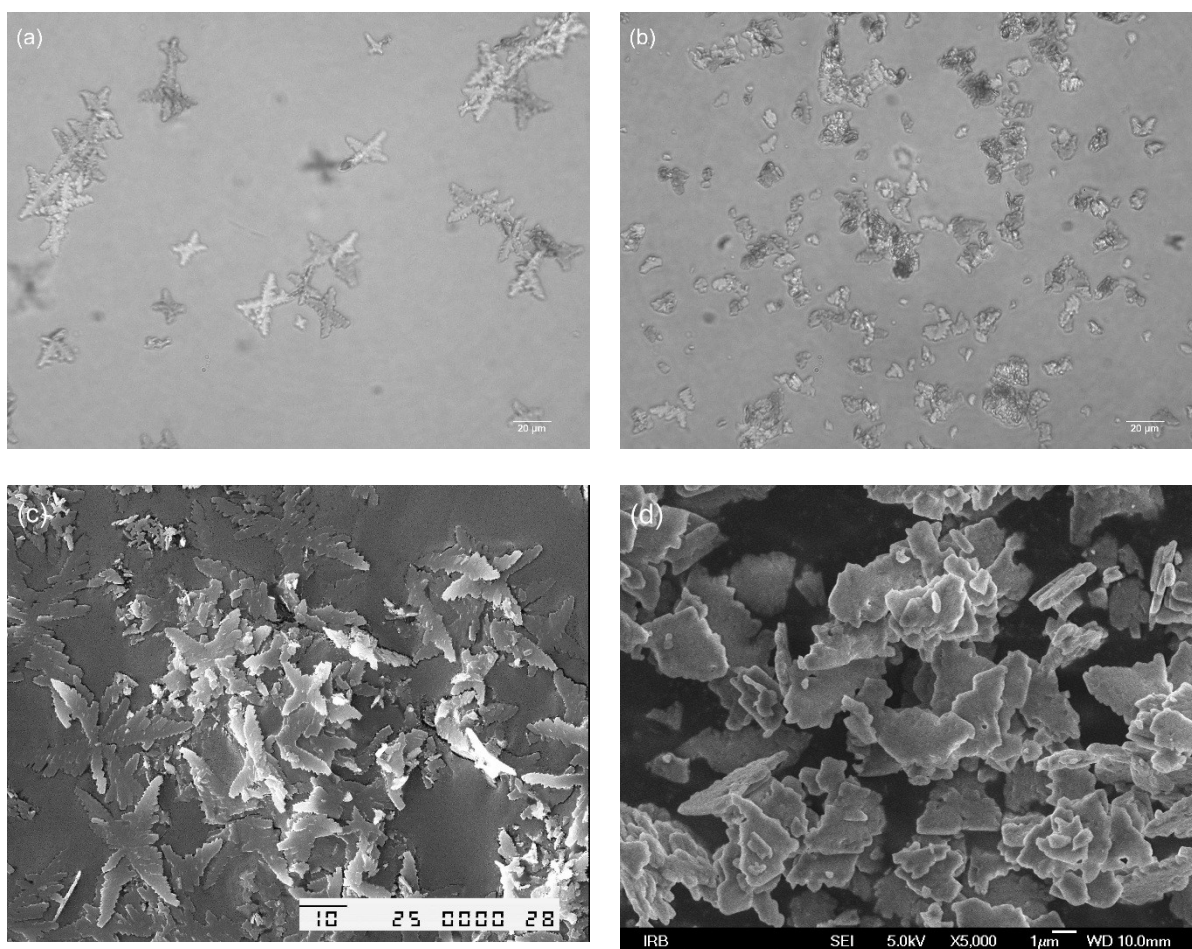
**Slika 32.** FT-IR spektri uzoraka pripremljenih u modelnom sustavu pri pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9.



**Slika 33.** Snimke svjetlosnim mikroskopom i SEM snimke uzoraka kalcijevih oksalata taloženih u modelnom sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

U jednostavnom i NaCl sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  izolirani su kristali slične dendritne morfologije. U umjetnom urinu vidljiva je značajna promjena morfologije (**slika 33**).

Osim dendritne strukture, u NaCl sustavu uočava se i pojava pločastih kristala koji se na SEM snimkama razaznaju u obliku šesterokuta koji karakteriziraju COM.<sup>10</sup> Dendritna struktura u otopini ima vrlo pravilan oblik slova iks (X) (**slika 34a i c**). Međutim, tijekom izolacije taloga (filtriranja, ispiranja i vakum-sušenja) uočeno je da je navedena struktura vrlo krhka i lomljiva te dolazi do pucanja (lom “krakova”) (**slika 34b i d**). Ovakvo zapažanje je bilo neočekivano budući da literaturni podaci navode da je dendritna struktura postojana i nakon ispiranja i sušenja.<sup>38,82,103</sup>



**Slika 34.** Dendritna struktura COM – u otopini a) snimke svjetlosnim mikroskopom, c) SEM snimke, nakon ispiranja i sušenja b) snimke svjetlosnim mikroskopom d) SEM snimke.

Umjesto dendritne strukture, u sustavu umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 9$  uočava se nepravilna, pločasta morfologija, a pri  $\text{pH}_i = 5$  šesterokutna morfologija (**slika 33**). Kao što se može vidjeti na **slici 33** u svim promatranim sustavima pri  $\text{pH}_i = 5$  kristali su izraženijih rubova i pravilnije morfologije dok su pri  $\text{pH}_i = 9$  rubovi zaobljeni i nepravilnije morfologije. Također

je za ovaj sustav karakteristična agregacija većih i manjih kristala. Do agregacije može doći uslijed djelovanja više faktora kao što su: starenje taloga, promjena koncentracije suspendirane faze, dodatak elektrolita, promjena temperature, pH, mehanički efekti, itd. COM je zbog velike sposobnosti agregacije, koja se najjače uočava u kiselom pH, patogen u stvaranju bubrežnih kamenaca.<sup>176,177</sup> Nekoliko ranijih istraživanja pokazalo je da se kristali kalcijeva oksalata lako mogu formirati unutar distalnih bubrežnih tubula i da je pH urina presudni čimbenik koji utječe na takvu kristalizaciju.<sup>178-180</sup>

Proučavanjem morfologije sustava različite kompleksnosti (jednostavan, NaCl i umjetni urin) pokazalo je da kako idemo prema kompleksnijem sustavu morfologije COM su međusobno sličnije što je posljedica smanjenja prezasićenosti. Također se uočava i agregacija manjih kristala.

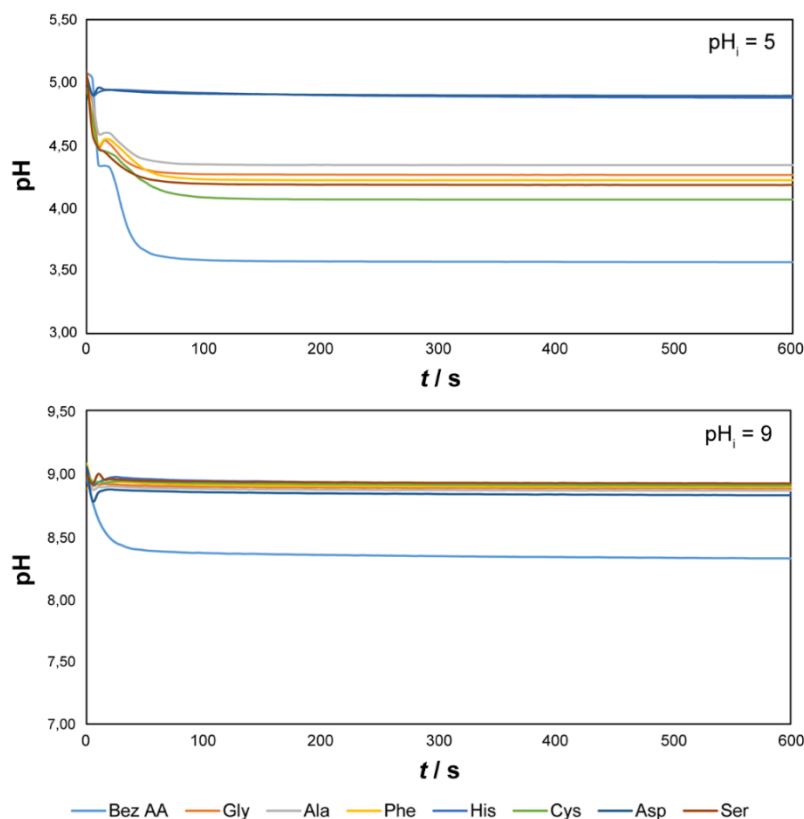
#### **4.3.1. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u jednostavnom sustavu s aminokiselinama**

Učinak aminokiselina na taloženje hidrata kalcijevih oksalata proučavan je od strane brojnih istraživača.<sup>28-35</sup> Međutim, podaci u literaturi su proturječni pa se tako bilježi učinak inhibicije taloženja<sup>32</sup>, promocije taloženja pri niskim koncentracijama i inhibicije pri visokim koncentracijama<sup>31</sup> te slab učinak ili njegov izostanak pri visokim koncentracijama aminokiselina.<sup>29</sup> Pri tome je kod jednih autora zapaženo da dodatak aminokiselina potiče stvaranje COM, a sprječava nastanak COT i COD<sup>31</sup>, dok kod drugih autora aminokiseline stimuliraju stvaranje COD, a inhibiraju nastanak COM.<sup>29</sup>

Utjecaj aminokiselina (AA) relevantnih za patološku biomineralizaciju proučavan je u ovoj disertaciji na modelnom sustavu:  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Početna prezasićenost odabranog sustava pri oba pH je  $S_i \approx 36$ . Tijek spontanog taloženja u jednostavnom sustavu praćen je promjenom pH u vremenu.

Na **slici 35** su prikazane krivulje napredovanja spontanog taloženja tijekom vremena (krivulje pH-vrijeme) dobivene u modelnom jednostavnom taložnom sustavu Bez AA te uz dodatak različitih AA. U svim sustavima istovremeno s miješanjem reaktanata dolazi do zamućenja/taloženja.





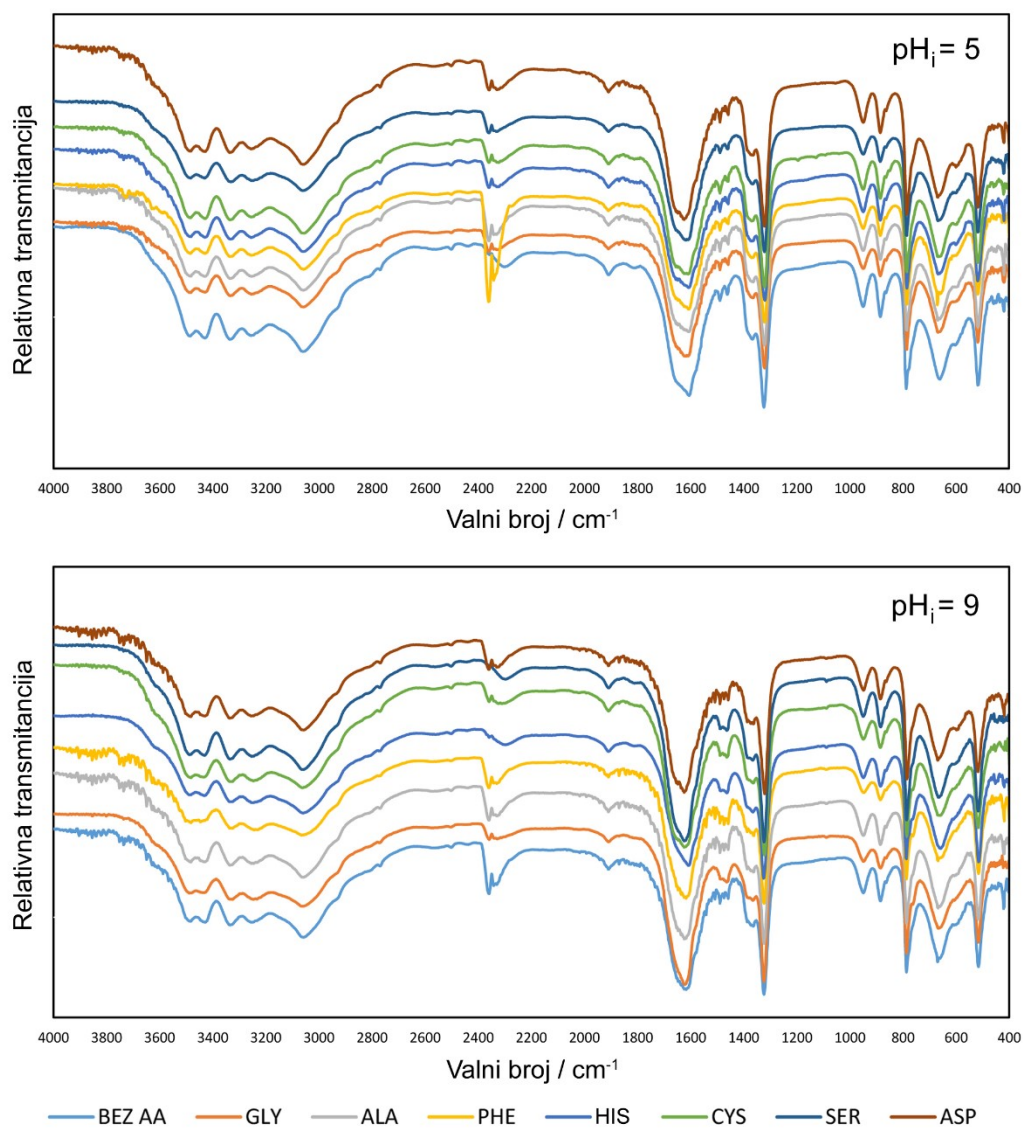
**Slika 35.** Ovisnost pH o vremenu spontanog taloženja kalcijeva oksalata u jednostavnom sustavu uz dodatak AA pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

Vidljivo je da se u sustavu Bez AA pH vrijednost naglo smanjuje ( $\text{pH}_i = 5$  ili  $\text{pH}_i = 9$ ) čim se otopine natrijeva oksalata i kalcijeva klorida pomiješaju, a nakon kratkog stabiliziranja pH vrijednost se nastavlja dalje naglo smanjivati sve do postizanja pH platoa. Na kraju procesa taloženja zabilježena je ukupna promjena pH,  $\Delta\text{pH} \approx -1,5$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\Delta\text{pH} \approx -0,7$  pri  $\text{pH}_i = 9$ , s tim da je pri  $\text{pH}_i = 9$  proces brži (nagliji pad pH) nego pri  $\text{pH}_i = 5$  što ukazuje na bržu kinetiku kristalnog rasta COM pri višem  $\text{pH}_i$ . Kao što je vidljivo na **slici 35**, dodatak AA utječe na promjenu nagiba krivulja pH-vrijeme i formiranja drugačijeg pH platoa. Ova zapažanja su posljedica triju procesa koji se istovremeno zbivaju u taložnom sustavu: kompleksiranje AA s  $\text{Ca}^{2+}$  ionima u otopini, spontano taloženje kalcijeva oksalata te neutralizacija AA u otopini. Između ta tri procesa, spontano taloženje COM, to jest kristalni rast COM i neutralizacija AA su dominantni procesi koji se događaju paralelno. Pri oba  $\text{pH}_i$  dodatak AA uzrokuje pojavu pH platoa pri višim pH vrijednostima ( $\text{pH} = 4,1 \dots 4,9$ ) u usporedbi s onim izmjerenim u sustavima Bez AA ( $\text{pH} = 3,6$ ). Pri tome je jači efekt zabilježen pri  $\text{pH}_i = 9$ . Zapažena promjena pH platoa može se objasniti činjenicom da tijekom spontanog taloženja COM dolazi do oslobađanja  $\text{H}^+$  iona (vidi jednadžbe 9 i 10 u poglavlju 4.4) uslijed

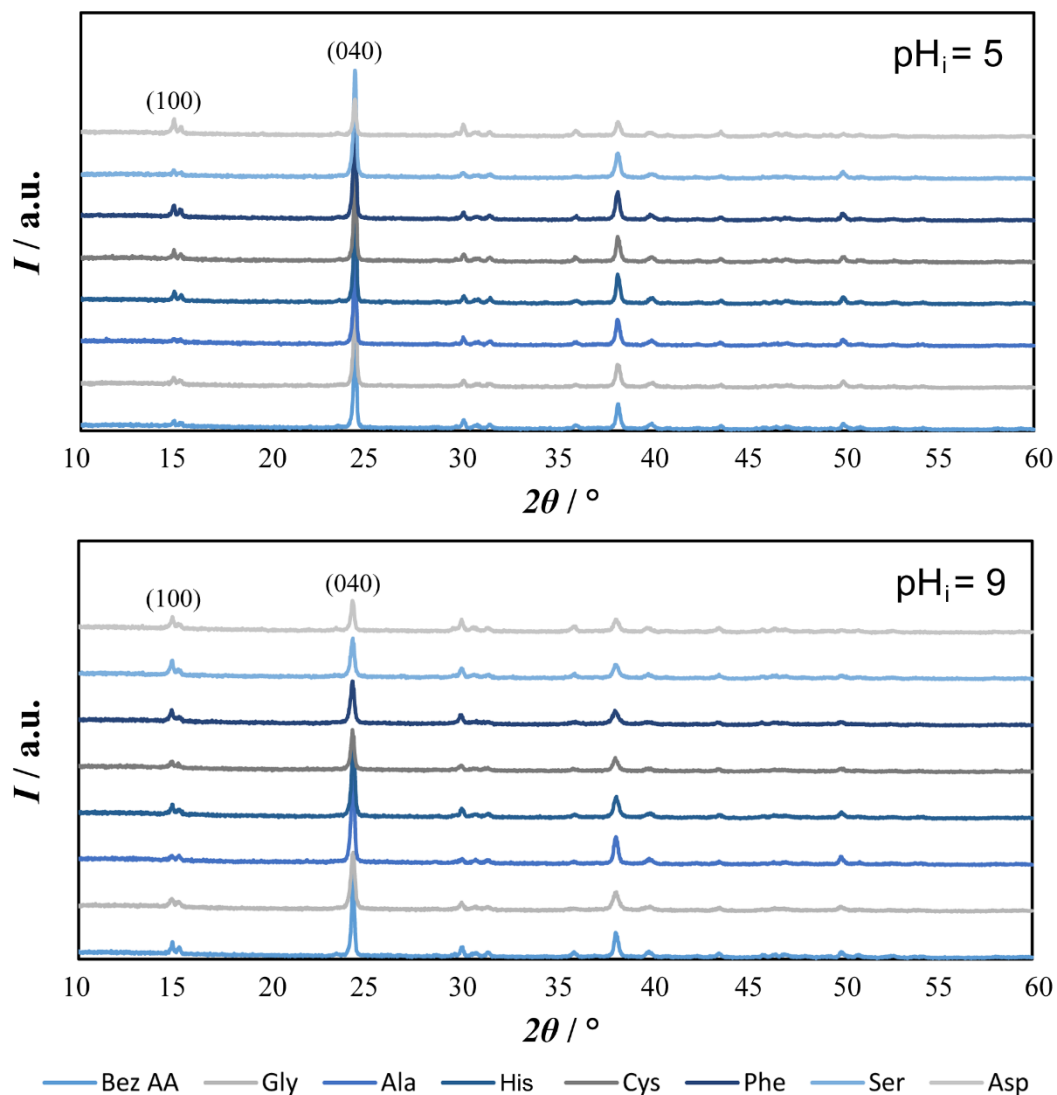
čega se događa naglo smanjenje pH sustava. U prisustvu AA, koje su amfoterne tvari, događa se titiranje AA s oslobođenim  $H^+$  ionima zbog čega je u tim sustavima pH plato pomaknut prema višim pH vrijednostima. U slučaju  $pH_i = 5$ , sve AA se nalaze u pretežito zwitter-ion formi u kojoj je  $\alpha$ -karboksilna skupina deprotonirana,  $\alpha-COO^-$ .  $H^+$  ioni nastali tijekom procesa taloženja asociraju s  $\alpha-COO^-$  skupinom AA u otopini i time se smanjuje  $c(H^+)$ , odnosno povećava se pH sustava (pH plato na krivulji pH-vrijeme). Pri tom je najveći efekt povećanja pH zamijećen uz dodatak Asp i His koje su nabijene AA te pri  $pH_i = 5$  osim deprotonirane  $\alpha-COO^-$  skupine imaju i velik udio deprotonirane skupine iz bočnog ogranka. Zbog toga se veća količina  $H^+$  iona nastalih tijekom procesa taloženja asocira s Asp i His te dolazi do značajno veće promjene  $c(H^+)$ , odnosno pH sustava u usporedbi sa sustavom Bez AA te sa sustavima uz dodatak polarnih i nepolarnih AA. Pri  $pH_i = 9$  sve AA imaju deprotoniranu i primarnu karboksilnu skupinu i primarnu amino skupinu, a Asp i His imaju djelomično deprotonirane i skupine iz bočnih ogranka. Sve te deprotonirane skupine asociraju s  $H^+$  ionima oslobođenim tijekom procesa taloženja te su zbog toga pri ovom pH kod svih AA najizraženije promjene pH platoa. Kao posljedica ovih efekata na kinetiku taloženja COM, zabilježena je i promjena mase nastalog COM u usporedbi s masom u sustavu Bez AA. Najveće povećanje mase izmjereno je za jednostavni sustav uz dodatak Asp pri oba  $pH_i$ :  $\Delta m = + 23 \%$ .

S obzirom da su AA u sustavima prisutne u koncentraciji,  $c(AA) = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ , one se nalaze u suvišku u odnosu na koncentraciju kalcija i oksalata ( $c(Ca^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(C_2O_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). U takvim uvjetima može se smatrati da je došlo samo do djelomične neutralizacije AA  $H^+$  ionima, te je ona većim dijelom ostala deprotonirana. Molekule AA koje nisu asocirale  $H^+$  ione ostale su u zwitter-ionskoj formi, odnosno deprotoniranim primarnim karboksilnim i amino skupinama te bočnim ograncima, ovisno o početnom pH, koje onda mogu imati interakciju s površinom kristala COM te tako utječu na kinetiku kristalnog rasta i svojstva nastalog COM.

Strukturne analize modelnog sustava provedene su pomoću FT-IR i PXRD analize (vidi FT-IR, TG i PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.1, 8.2 i 8.3). Na **slici 36** prikazani su FT-IR spektri, a na **slici 37** PXRD difraktogrami uzoraka istaloženih u modelnom sustavu uz dodatak AA.



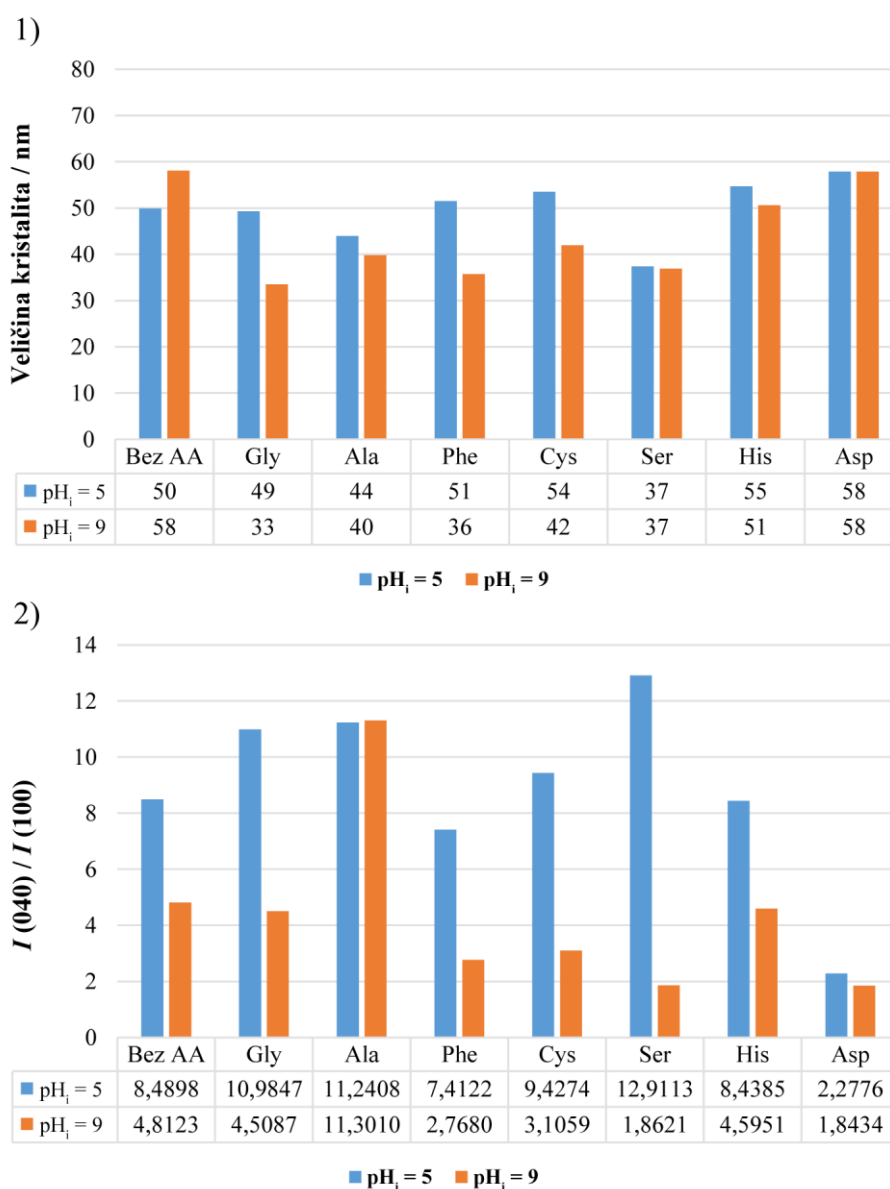
**Slika 36.** FT-IR spektri uzoraka istaloženih u jednostavnom sustavu pri pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9 uz dodatak AA.



**Slika 37.** PXRD difraktogrami uzoraka istaloženih u jednostavnom sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  uz dodatak AA.

Na temelju tih analiza, može se zaključiti da dodatak AA ne utječe na promjenu hidratne faze budući da je u svim sustavima detektirana isključivo jedna faza COM.

Kako bi se detaljnije proučio utjecaj aminokiselina na rast COM kristala pomoću rentgenske difrakcijske analize određena je veličina kristalita i omjer intenziteta dva najintenzivnija pika na rast ravnina (040) i/ili (100). Veličina kristalita COM u sustavu Bez AA pri oba pH iznosi  $54 \pm 4$  nm. U usporedbi s ovim veličinama, u sustavima uz dodatak AA uočava se promjena veličine kristalita. Pri tome su najveći efekti zabilježeni pri  $\text{pH}_i = 9$  gdje su izmjereni značajno manji kristaliti (33 - 42 nm) u sustavima s: Gly, Phe, Ser, Ala i Cys (**slika 38 1**). Pri  $\text{pH}_i = 5$  je zabilježen efekt u sustavima uz dodatak Ser i Ala gdje su izmjereni manji kristaliti (37 i 44 nm) u usporedbi s onima u sustavu Bez AA.



**Slika 38.** Utjecaj AA na rast COM kristala u jednostavnom sustavu: promjena veličine kristalita COM (1), omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika (2).

Na **slici 38 2)** prikazan je omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika u sustavu Bez AA te promjena tog omjera u sustavima uz dodatak AA. Omjer intenziteta  $I(040) / I(100)$  izmjeren u sustavu Bez AA pri  $\text{pH}_i = 5$  iznosi 8,49, a pri  $\text{pH}_i = 9$  iznosi 4,81. Ovakve vrijednosti ukazuju na to da je pri oba pH najsporiji rast kristala COM okomito na (040) ravninu. Efekt je izraženiji pri  $\text{pH}_i = 5$ . U sustavima uz dodatak polarnih (Gly, Ser, Cys) i nepolarnog Ala pri  $\text{pH}_i = 5$  zabilježeno je povećanje tog omjera u odnosu na omjer izmjeren u sustavu Bez AA, a najveći omjer je dobiven u sustava uz dodatak Ser ( $I(040) / I(100) = 12,91$ ). Ovo povećanje omjera ukazuje na to da je dodatkom polarnih AA i nepolarnog Ala

promoviran najsporiji rast COM okomito na (040) ravninu. Pri  $\text{pH}_i = 5$  sve AA su većinom u obliku zwitter-iona te su moguće interakcije pozitivnog dijela AA (protonirane amino skupine) za negativni dio COM kristala ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ) i usporavanje rasta COM okomito na (040) ravninu ili interakcije negativnog dijela AA (deprotonirane karboksilne skupine) za pozitivni dio COM kristala ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i usporavanje rasta COM okomito na (100) ravninu. Obzirom da je evidentiran najsporiji rast COM kristala okomito na (040) ravninu pretpostavka je da su interakcije pozitivnog dijela AA za negativni dio COM kristala dominantne u ovom sustavu. Efekt polarnih AA najvjerojatnije je izraženiji u odnosu na druge AA upravo zbog njihovog bočnog ogranka (vidi Literaturni pregled **slika 12**). Suprotno efektima povećanja omjera pri  $\text{pH}_i = 5$ , u sustavima uz dodatak svih testiranih AA (osim Ala) pri  $\text{pH}_i = 9$  zabilježeno je smanjenje omjera u usporedbi s omjerom izmjerenim u sustavu Bez AA što ukazuje da je najsporiji rast COM okomito na (100) ravninu. Pri  $\text{pH}_i = 9$  AA su većinom u anionskoj formi te se preferirano vežu svojim negativnim dijelom (deprotoniranom karboksilnom skupinom) za pozitivni dio COM kristala ( $\text{Ca}^{2+}$ ), kao što je prethodno pojašnjeno upravo ove interakcije stvaraju efekt usporenog rasta COM okomito na (100) ravninu. Najmanji omjeri  $I(040) / I(100) = 1,86$ , odnosno  $1,84$  izmjereni su za COM istaložen u sustavu uz dodatak Ser i Asp.

Dobiveni efekti u skladu su sa zapažanjima iz literature. Shen i suradnici<sup>181,182</sup> su promatrali utjecaj Asp, Tyr i Trp na taloženje kalcijeva oksalata, te su došli do zaključka da pH sustava i povećanje koncentracije AA utječu na promjenu omjera intenziteta  $I(020) / I(\bar{1}01)$  (vidi dodatak 8.4, **slika 70**). Kada je pH niži od izoelektrične točke promatranih AA omjer intenziteta se povećava te se isto uočava kao najsporiji rast COM kristala okomito na (020) ravninu, međutim kada je pH viši od izoelektrične točke uočava se najsporiji rast COM kristala okomito na ( $\bar{1}01$ ) ravninu. Ravnina ( $\bar{1}01$ ) ima najveću gustoću kalcijevih iona na površini ( $0,054 \text{ Ca}^{2+}/\text{\AA}^2$ ) te uslijed toga preferirano veže negativnije molekule/ione.<sup>183</sup> U ( $\bar{1}01$ ) ravnini površinski slojevi sadrže dva podsloja oksalatnih skupina; jedan je paralelan, a drugi je okomit na ravninu. Skupine oksalata na ravnini leže ispod najvišeg površinskog sloja (ne "strše") te upravo ova struktura čini ( $\bar{1}01$ ) ravninu bogatiju  $\text{Ca}^{2+}$  ionima.<sup>184,185</sup>

Morfologija čestica COM istaloženih u jednostavnim sustavima pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  bez i uz dodatak AA proučavana je svjetlosnom mikroskopijom i pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) te je prikazana na **slici 39**. U sustavu bez dodatka AA nastale su dendritne čestice COM. Usporedbom snimaka svjetlosnim mikroskopom čestica COM istaloženih u sustavu Bez AA vidljivo je da su značajnije veće čestice nastale u sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$ . Ovo zapažanje u slaganju je s izmjerenom specifičnom površinom tih uzoraka, (eng. *specific surface area* SSA, **tablica 12**):  $4,37 \pm 0,18 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $6,02 \pm 0,29 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  pri

$\text{pH}_i = 9$ . Osim razlike u veličini dendrita, SEM snimkama je evidentirana i razlika u teksturi površina i rubova tih čestica<sup>2</sup>. Uočeno je da čestice nastale pri  $\text{pH}_i = 5$  imaju ravniju, glađu površinu te da su im rubovi zaobljeni, a površinske brazde gušće i pravilno raspoređene. U usporedbi s ovakvom teksturom, COM dendritne čestice nastale pri  $\text{pH}_i = 9$  jesu slagaline kockastih i/ili izduženih primarnih kristalita s više ili manje „stršećih“ kristalita koje imaju naboranu površinu s efektom poroznosti, a rubovi su im jače nazubljeni. Analizom intenziteta dva najintenzivnija pika rentgenskom difrakcijskom (**slika 38 2**) ustanovljeno je da pri oba  $\text{pH}_i$  COM najsporije raste okomito na (040) ravninu, te da je efekt izraženiji pri  $\text{pH}_i = 5$ . Navedeno opažanje na **slici 39** uočava se znatnije većim COM kristalima pri  $\text{pH}_i = 5$  s dobro razvijenom (100) plohom. Dodatkom AA u sustave uočen je efekt na morfologiju COM dendritnih čestica, njihovu veličinu i specifičnu površinu te teksturu. Usporedbom snimaka svjetlosnim mikroskopom čestica COM istaloženih u sustavu s AA vidljivo je da su pojedinačni dendriti više razgranatiji pri  $\text{pH}_i = 5$  (osim Asp) te da su i dalje značajnije veći u odnosu na sustav  $\text{pH}_i = 9$ . Ovo zapažanje u slaganju je s izmjerenom specifičnom površinom tih uzoraka, (SSA, **tablica 12**):  $1,54 \pm 0,08 \dots 4,31 \pm 0,07 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $4,13 \pm 0,06 \dots 7,77 \pm 0,27 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  pri  $\text{pH}_i = 9$ .

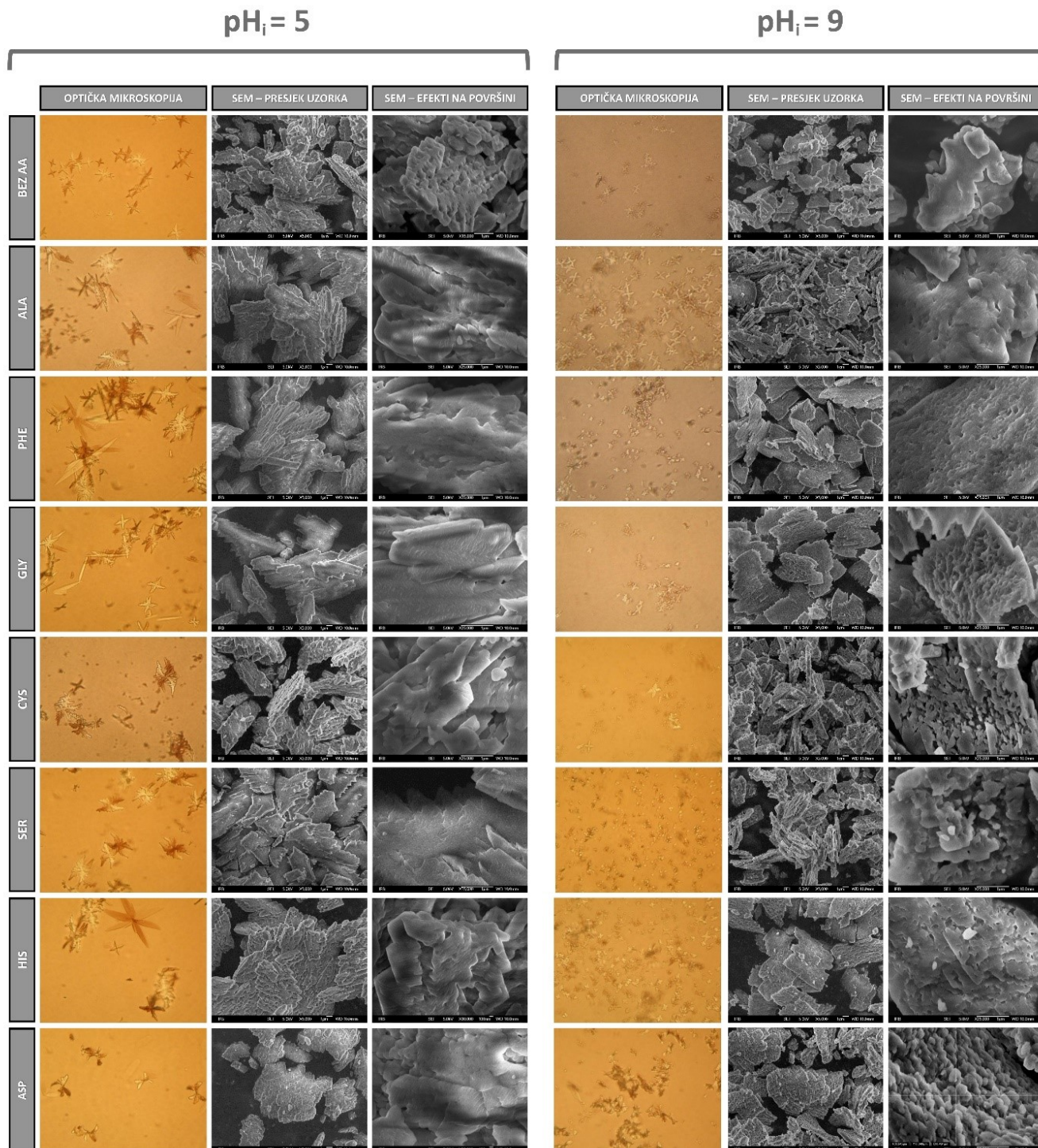
**Tablica 12.** Specifična površina i promjer uzoraka izoliranih nakon spontanog taloženja kalcijeva oksalata u jednostavnim sustavima pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

Uzorak	$\text{pH}_i = 5$		$\text{pH}_i = 9$	
	SSA / $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	$d^* / \mu\text{m}$	SSA / $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	$d^* / \mu\text{m}$
Bez AA	$4,37 \pm 0,18$	2,1	$6,02 \pm 0,29$	2,2
Ala	$2,54 \pm 0,09$	4,5	6,05	2,3
Phe	$4,31 \pm 0,07$	5,0	5,35	3,0
Gly	$2,27 \pm 0,08$	4,2	$6,25 \pm 0,24$	3,1
Ser	$1,54 \pm 0,08$	4,7	$4,13 \pm 0,06$	2,2
Cys	$2,93 \pm 0,13$	3,0	$6,17 \pm 0,13$	2,4
His	$3,36 \pm 0,26$	3,7	$6,02 \pm 0,07$	3,1
Asp	$4,08 \pm 0,09$	4,8	$7,77 \pm 0,27$	2,3 6,1

\* Prosječna veličina dendritnih čestica prikazana na SEM slikama (**slika 37**) nakon izolacije iz otopina

Prema **tablici 12** prosječna veličina COM čestica,  $d^*$ , za sustav pri  $\text{pH}_i = 5$  povećava se sljedećim redoslijedom: Bez AA < Cys < His < Gly < Ala < Ser < Asp < Phe.

čestice COM snimljene nakon izolacije (filtriranja, ispiranja i sušenja) iz otopina.<sup>2</sup>



**Slika 39.** Snimke svjetlosnim mikroskopom i SEM snimke uzorka kalcijevih oksalata istaloženih u jednostavnom sustavu uz dodatak AA pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

Promjena veličine bilježi se od 2,1 do 5,0  $\mu\text{m}$ . Za sustav pri  $\text{pH}_i = 9$  također je zabilježeno povećanje veličine čestica u odnosu na sustav Bez AA, ali u puno manjem rasponu (od 2,2 do 3,1  $\mu\text{m}$ , osim Asp kod koje su uočene dvije raspodjele 2,3  $\mu\text{m}$  i 6,1  $\mu\text{m}$ ) i drugačijim

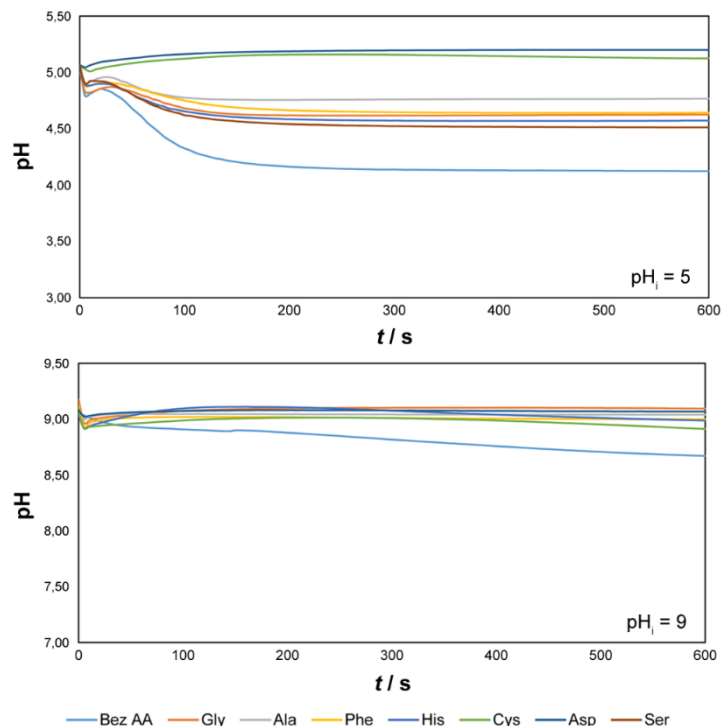


redosljedom: Bez AA < Ser < Asp < Ala < Cys < Phe < His < Gly < Asp. Specifična površina čestica značajnije se mijenja u sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  u odnosu na sustav Bez AA i to za slijedeće AA: Ser < Gly < Ala < Cys. Pri  $\text{pH}_i = 9$  najveća promjena SSA u odnosu na sustav Bez AA zabilježena je u sustavu uz dodatak Ser. Dodatkom AA zabilježena je promjena u teksturi COM dendrita u usporedbi sa dendritima u sustavu Bez AA. Te su promjene male pri  $\text{pH}_i = 5$ , a izraženije su pri  $\text{pH}_i = 9$  gdje čestice imaju naboranu površinu s efektom poroznosti, a rubovi su im jače nazubljeni. Analizom intenziteta dva najintenzivnija pika rentgenskom difrakcijskom (**slika 38 2**) ustanovljeno je da dodatkom AA pri  $\text{pH}_i = 5$  COM najsporije raste okomito na (040) ravninu, što se uočava na **slici 39** znatnije većim dendritnim česticama s dobro razvijenom (100) plohom, a pri  $\text{pH}_i = 9$  COM najsporije raste okomito na (100) ravninu te su ti kristaliti znatnije manji (vidi dodatak 8.4, **slika 70**). Najmanji efekti zamijećeni su kod COM dobivenog spontanom taloženjem pri oba pH sa His. U literaturi je pokazano da manji kristaliti COM (nanometarske veličine) imaju veću specifičnu površinu i lakše adsorbiraju tvari (i AA) s negativnim nabojem.<sup>157,186</sup>

Iz svih ovih zapažanja o utjecaju AA na morfologiju COM dendritnih čestica, njihovu veličinu i specifičnu površinu te teksturu možemo zaključiti da sve AA imaju izražen efekt.

### 4.3.2. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u NaCl sustavu s aminokiselinama

Tijek spontanog taloženja u NaCl sustavu praćen je promjenom pH u vremenu (**slika 40**).

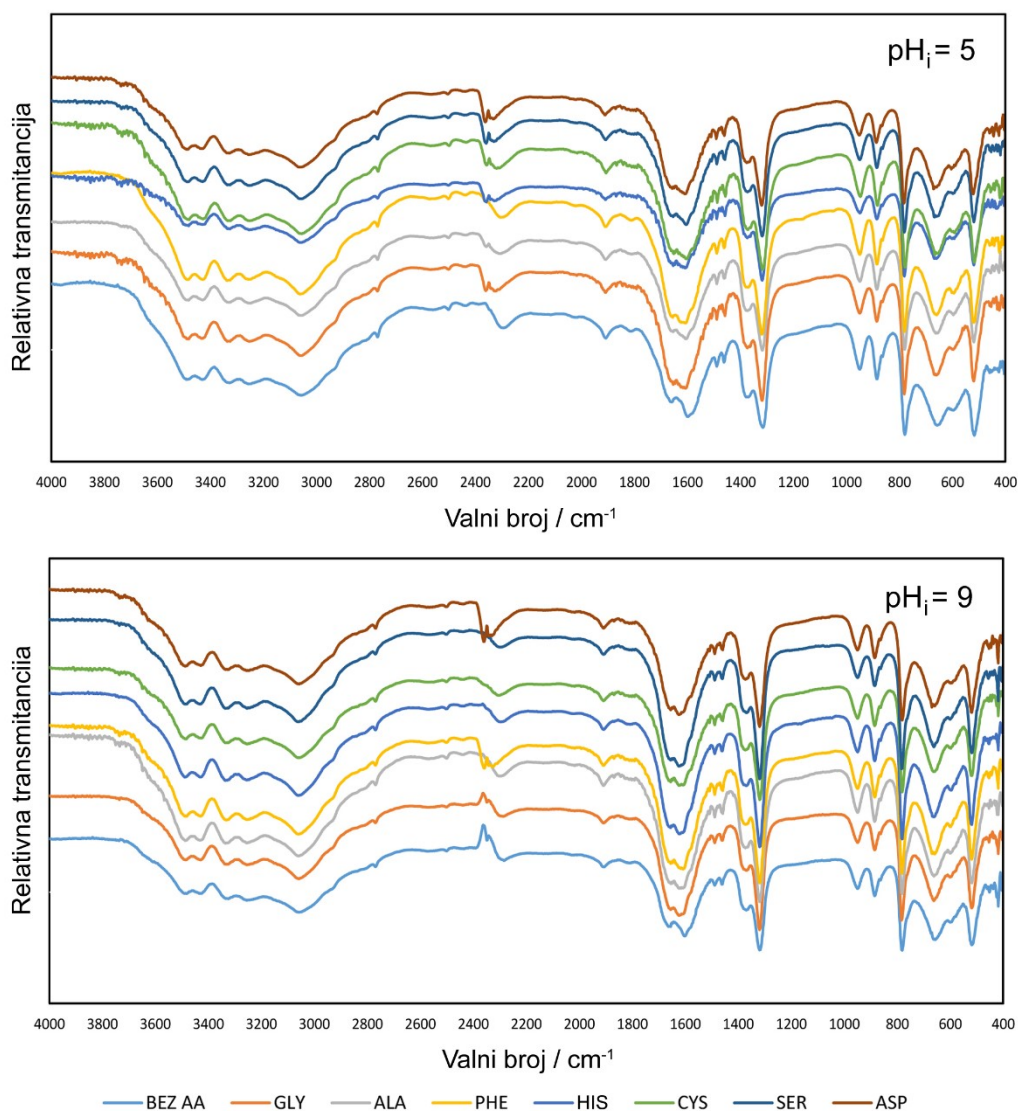


**Slika 40.** Ovisnost pH o vremenu spontanog taloženja kalcijeva oksalata u NaCl sustavu uz dodatak AA pri  $pH_i = 5$  i  $pH_i = 9$ .

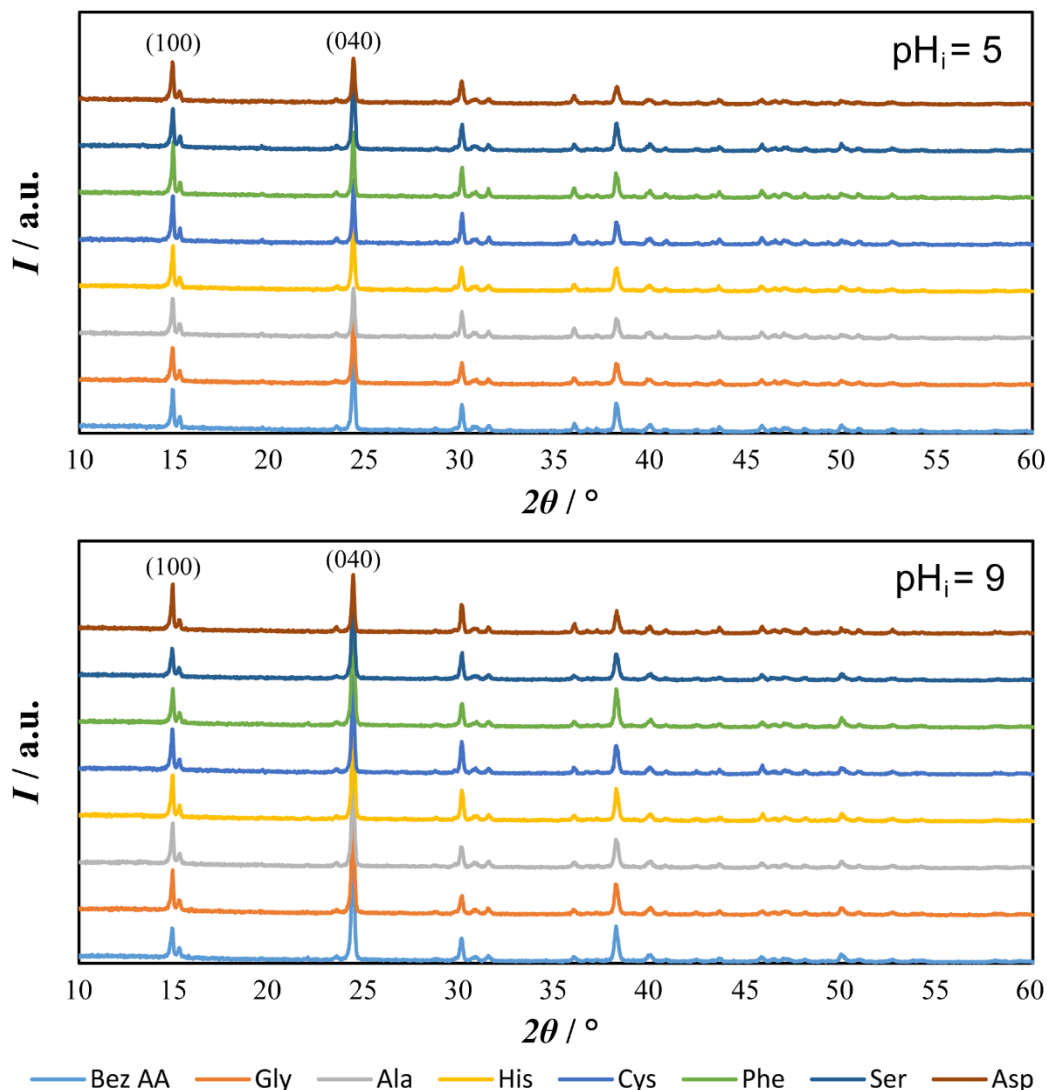
Na **slici 40** su prikazane krivulje napredovanja spontanog taloženja tijekom vremena (krivulje pH-vrijeme) dobivene u modelnom NaCl taložnom sustavu Bez AA te uz dodatak različitih AA. Kao i u jednostavnom sustavu, i u svim NaCl sustavima istovremeno s miješanjem reaktanata dolazi do zamućenja/taloženja. U usporedbi s jednostavnim sustavom Bez AA, u NaCl sustavu Bez AA pH vrijednost se smanjuje sporije (manji nagib krivulje u usporedbi s nagibom krivulje u jednostavnom sustavu) što je posljedica manje početne prezasićenosti sustava ( $S_i \approx 24$ ). Na kraju procesa taloženja zabilježena je ukupna promjena pH,  $\Delta pH \approx -0,8$  pri  $pH_i = 5$  i  $\Delta pH \approx -0,4$  pri  $pH_i = 9$ . Dodatak AA i u NaCl sustavu pri oba početna pH utječe na promjenu nagiba krivulja pH-vrijeme i formiranja drugačijeg pH platoa. Kao i u jednostavnom sustavu (vidi poglavlje 4.3.1), ova zapažanja se mogu objasniti činjenicom da se AA u sustavu ponašaju kao baze. One zato titiraju  $H^+$  ione oslobođene u procesu taloženja i ponovo se protoniraju, a kao posljedica nastaje smanjenje  $c(H^+)$  iona u sustavu, odnosno povećanje pH platoa pri kojem završava proces taloženja kalcijeva oksalata. Budući da je

primarna karboksilna skupina deprotonirana ( $\text{pH}_i = 5$ ), odnosno da su i primarna karboksilna skupina i primarna aminoskupina deprotonirane ( $\text{pH}_i = 9$ ) ovi efekti su izraženiji pri  $\text{pH}_i = 9$ . I u NaCl sustavu, kao i u jednostavnom sustavu, najveće promjene u krivulji pH-vrijeme zamijećene su uz dodatak Asp i His zbog dodatnog protoniranja njihovih deprotoniranih bočnih ogranaka.

Strukturne analize sustava provedene su pomoću FT-IR i PXRD analize (vidi FT-IR i PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.1 i 8.3). Na **slici 41** prikazani su FT-IR spektri, a na **slici 42** PXRD difraktogrami uzoraka istaloženih u modelnom sustavu uz dodatak AA.



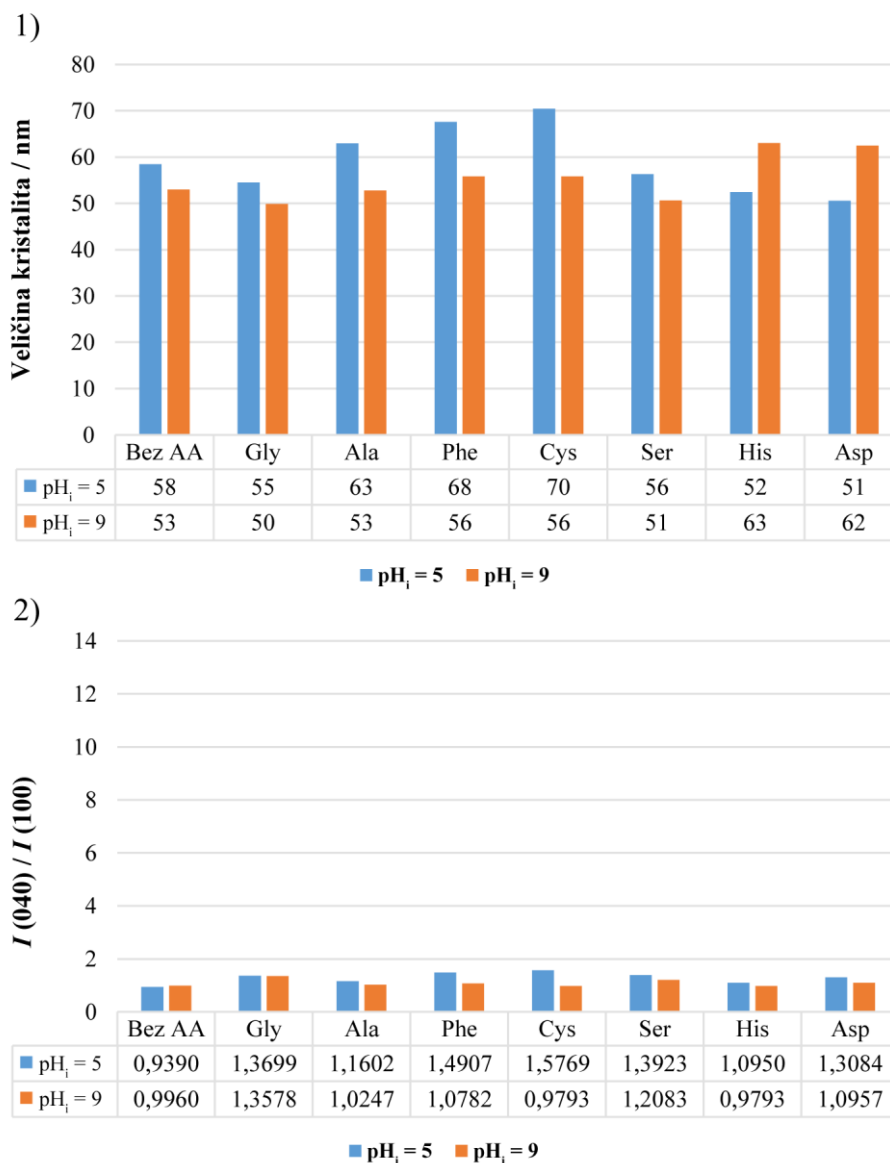
**Slika 41.** FTIR spektri uzoraka istaloženih u NaCl sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  uz dodatak AA.



**Slika 42.** PXRD difraktogrami uzoraka istaloženih u NaCl sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  uz dodatak AA.

Kao i u jednostavnom sustavu, dodatak aminokiselina ne mijenja sastav hidratne faze i taloži uvijek najstabilniji oblik, COM. Kako bi se detaljnije proučio utjecaj aminokiselina na rast COM pomoću rentgenske difrakcijske analize određena je veličina kristalita i utjecaj omjera intenziteta dva najintenzivnija pika (**slika 43 1), 2**). Veličina kristalita COM u sustavu Bez AA pri oba pH iznosi  $56 \pm 3$  nm. U usporedbi s ovim veličinama, u sustavima uz dodatak AA veličina kristalita se značajnije ne mijenja osim pri  $\text{pH}_i = 9$  gdje su izmjereni nešto veći kristaliti (62 i 63 nm) u sustavima s: Asp i His (**slika 43 1**). Pri  $\text{pH}_i = 5$  zabilježen je isti efekt u sustavima uz dodatak nepolarnih AA (Ala i Phe) i Cys (63 - 70 nm) u usporedbi s onima u

sustavu Bez AA. U odnosu na jednostavni sustav, u NaCl sustavu bilježi se značajnije veća veličina kristalita u sustavima nakon dodatka AA.



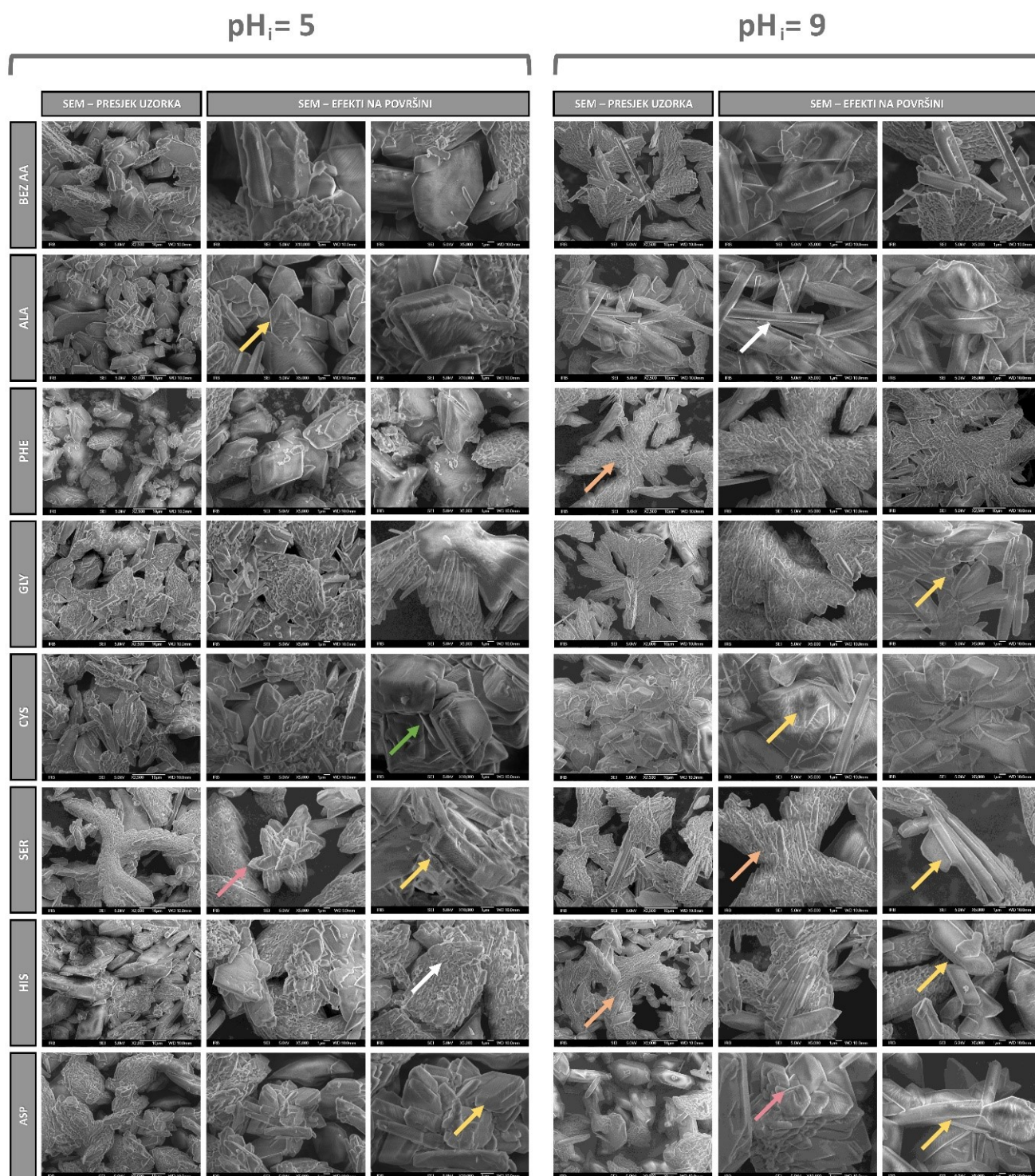
**Slika 43.** Utjecaj AA na rast kristala COM u NaCl sustavu: promjena veličine kristalita COM (1), omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika (2).

Na **slici 43 2)** prikazan je omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika u sustavu Bez AA te promjena tog omjera u sustavima uz dodatak AA. Omjer intenziteta  $I(040) / I(100)$  izmjeren u sustavu Bez AA pri  $\text{pH}_i = 5$  iznosi 0,94, a pri  $\text{pH}_i = 9$  iznosi 0,99. Ovakve vrijednosti ukazuju na to da je i pri  $\text{pH}_i = 5$  i pri  $\text{pH}_i = 9$  najsporiji rast kristala COM okomito na (100) ravninu. Dodatakom AA u oba promatrana sustava uočava se promjena efekta rasta COM, odnosno evidentiran je najsporiji rast COM okomito na (040) ravninu. U sustavima uz

Dodatak polarnih (Gly, Ser, Cys) i nepolarnog Phe pri  $\text{pH}_i = 5$  zabilježeno je povećanje tog omjera u odnosu na omjer izmjeren u sustavu Bez AA, a najveći omjer je dobiven u slučaju sustava uz dodatak Phe ( $I(040) / I(100) = 1,49$ ). Kao što je već detaljnije pojašnjeno u jednostavnom sustavu, pri  $\text{pH}_i = 5$  sve AA su većinom u obliku zwitter-iona, u ovom sustavu preferirano se vežu svojim pozitivnim dijelom za negativni dio COM kristala, te se stoga bilježi najsporiji rast COM kristala okomito na (040) ravninu. Efekt polarnih AA najvjerojatnije je izraženiji u odnosu na druge AA upravo zbog njihovog bočnog ogranka (vidi Literaturni pregled **slika 12**). Pri  $\text{pH}_i = 9$  također je najsporiji rast COM kristala okomito na (040) ravninu što je u suprotnosti u odnosu na rasta COM u jednostavnom sustavu. Ovi rezultati mogu se djelomično protumačiti visokom ionskom jakosti NaCl sustava ( $I_c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te prisutnosti značajnije koncentracije iona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  koji stvaraju dodatne interakcije s AA i s površinom COM.

Morfologija čestica COM istaloženih u NaCl sustavima pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  bez i uz dodatak AA proučavana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) te je prikazana na **slici 44**. U sustavu bez dodatka AA nastale su više ili manje pločaste čestice COM s još uvijek vidljivom dendritnom strukturom i prisutnom agregacijom manjih čestica. Smanjenje količine dendritne strukture i povećanje udjela pločastih čestica može se povezati sa značajnijim smanjenjem prezasićenosti ( $S_i \approx 24$ ) u odnosu na jednostavan sustav ( $S_i \approx 36$ ). SEM snimkama je evidentirana razlika u teksturi površina i rubova tih čestica. Uočeno je da pločaste čestice nastale pri  $\text{pH}_i = 5$  imaju ravniju, glađu površinu te da su im rubovi zaobljeni, a površinske brazde gušće i pravilno raspoređene. U usporedbi s ovakvom teksturom, COM pločaste čestice nastale pri  $\text{pH}_i = 9$  također imaju ravnu i glatku površinu, ali su im rubovi oštriji. Uočava se i dendritna struktura koju sačinjavaju slagaline izduženih primarnih kristalita s više ili manje „stršećih“ kristalita koje imaju naboranu površinu s efektom poroznosti, a rubovi su im jače nazubljeni. Analizom intenziteta dva najintenzivnija pika rentgenskom difrakcijskom (**slika 43 2**) ustanovljeno je da je pri oba pH najsporiji rast COM okomito na (040) ravninu, ali u puno slabijem intenzitetu u odnosu na jednostavni sustav što se može uočiti i na SEM snimkama. Dendritne pločice su značajnije manje u odnosu na jednostavni sustav i kristali poprimaju više ili manje pravilan šesterokutni oblik. Dodatkom AA u sustave uočen je značajniji efekt na morfologiju COM dendritnih čestica. U slučaju dodatka Phe, Ser i His pri  $\text{pH}_i = 9$  zapažen je efekt stabilizacije dendritne strukture (**slika 44** narančaste strelice). Efekt agregacije, više ili manje je prisutan u svim sustavima (**slika 44** zelena strelica). Ružičastim strelicama su označeni efekti rasta COM. Rast započinje na

prethodno stvorenim stepenicama, te se širi duž cijele (100) plohe (vidi dodatak 8.4, **slika 70**). Različiti habitusi COM kristala koji su posljedica rasta kristala označeni su žutim i bijelim strelicama. Žutim strelicama uočava se zadebljanje i zaobljavanje čestica COM te prividnim rastom u visinu (gubi se pločasta struktura) dok se bijelim strelicama uočava postojanje pločastih čestica COM. Specifičnu površinu uzoraka kalcijeva oksalata istaloženih u NaCl sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ , s obzirom na pločaste i agregirane čestice u usporedbi sa česticama u jednostavnom sustavu, moguće je procijeniti na vrijednost manju od  $2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  (točna vrijednost se nije mogla izmjeriti zbog male količine taloga koja je nastala u tim eksperimentima).

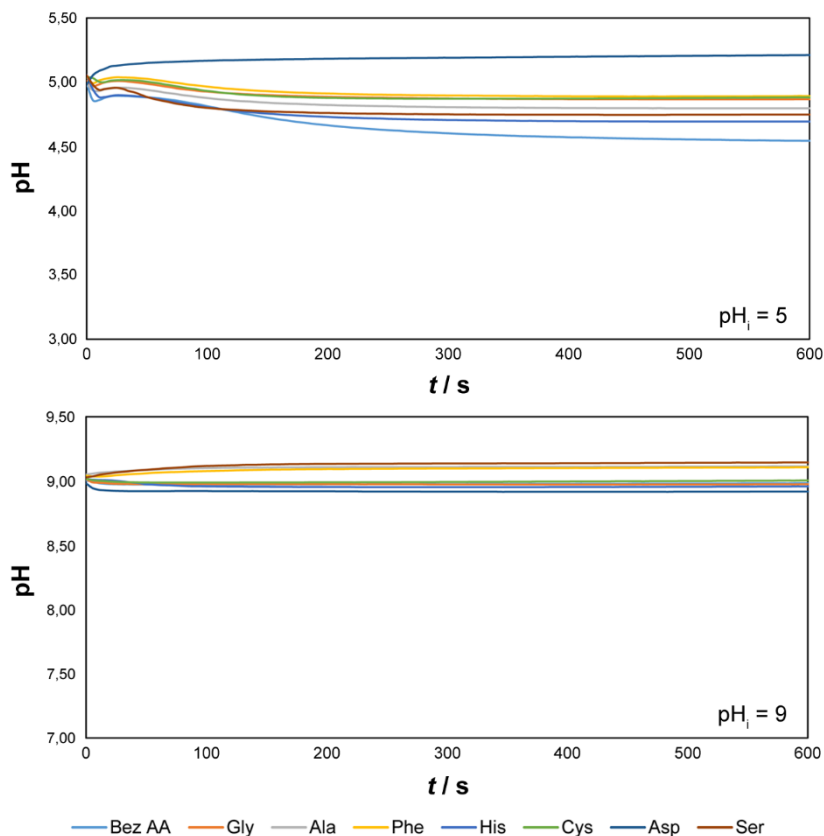


**Slika 44.** SEM snimke uzoraka kalcijevih oksalata taloženih u NaCl sustavu s dodatkom aminokiselina pri pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9. Žute i bijele strelice označavaju COM različitog habitusa. Narančaste strelice pokazuju dendritnu strukturu. Ružičaste strelice pokazuju rast COM, a zelena agregaciju.



### 4.3.3. Spontano taloženje kalcijeva oksalata u uvjetima hiperoksalurije u umjetnom urinu s aminokiselinama

Tijek spontanog taloženja u sustavu umjetnog urina praćen je promjenom pH u vremenu (slika 45).



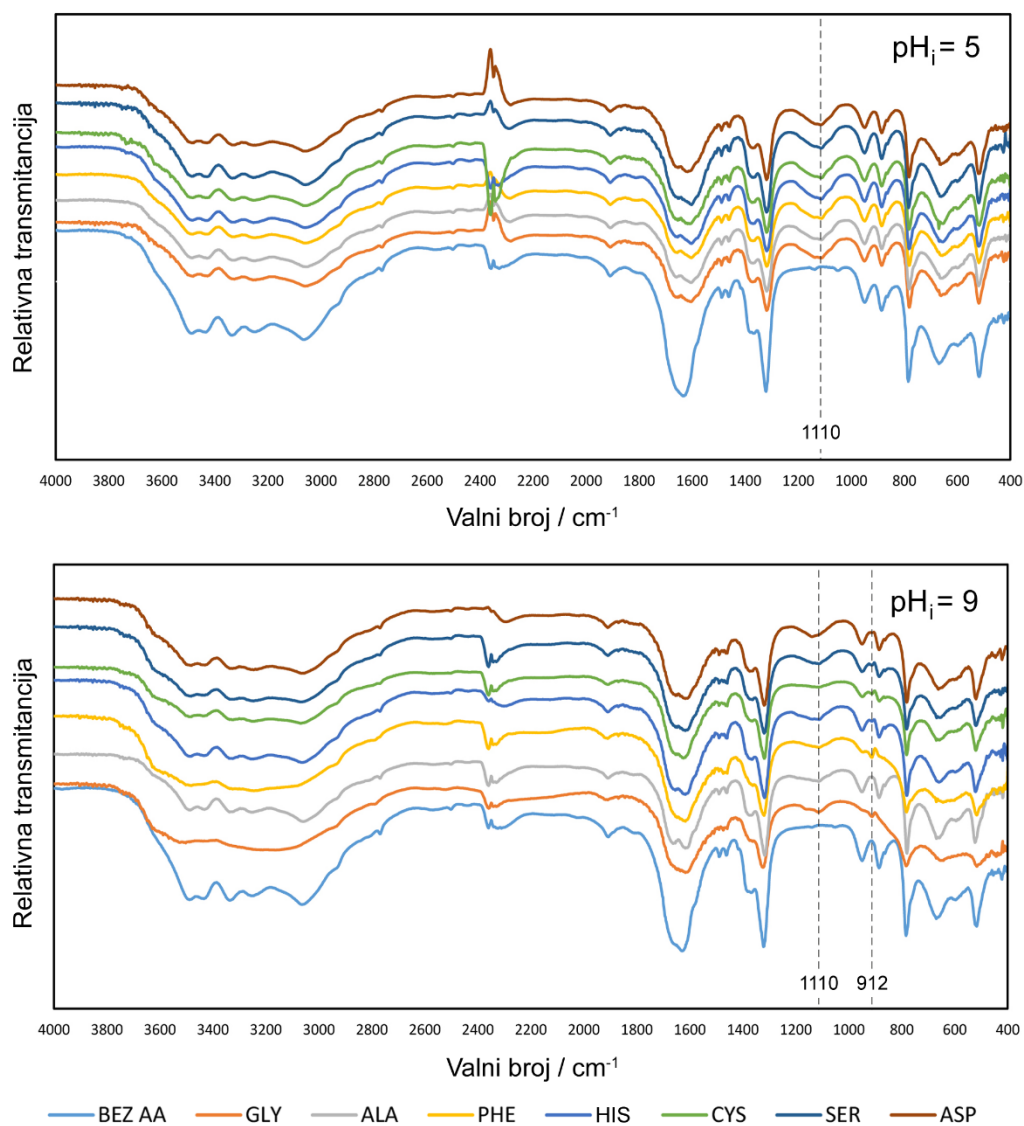
**Slika 45.** Ovisnost pH o vremenu spontanog taloženja kalcijeva oksalata u sustavu umjetnog urina uz dodatak AA pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ .

Na **slici 45** su prikazane krivulje napredovanja spontanog taloženja tijekom vremena (krivulje pH-vrijeme) dobivene u modelnom umjetni urin taložnom sustavu Bez AA te uz dodatak različitih AA. Krivulja pH-vrijeme u sustavu umjetni urin Bez AA pri oba početna pH ima još manji nagib i pH plato je postavljen pri još višim pH vrijednostima u usporedbi s krivuljom pH-vrijeme u NaCl sustavu Bez AA (vidi poglavlje 4.3.2). Sustav umjetnog urina ima najnižu početnu prezasićenosti ( $S_i \approx 21$ ) u usporedbi s NaCl sustavom ( $S_i \approx 24$ ) i jednostavnim sustavom ( $S_i \approx 36$ ). Također je kompleksnijeg sastava od NaCl sustava te osim NaCl sadrži i mnoge druge anorganske komponente (vidi Eksperimentalni dio, **tablica 7**). Na kraju procesa taloženja zabilježena je ukupna promjena pH,  $\Delta\text{pH} \approx -0,5$  pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\Delta\text{pH} \approx 0$  pri  $\text{pH}_i = 9$ . Dodatak AA i u sustavu umjetnog urina pokazuje učinak na formiranje drugačijeg pH platoa.

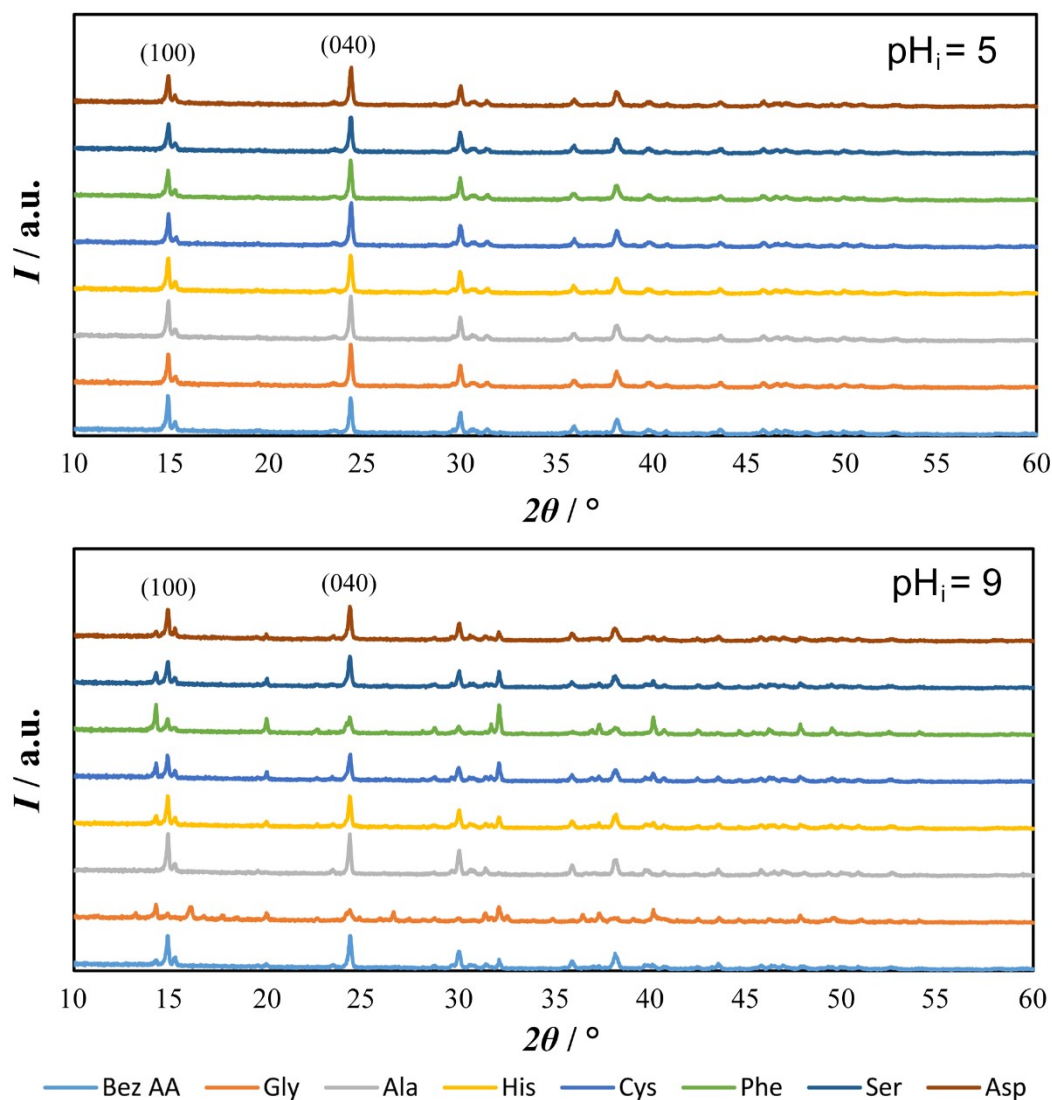
Objašnjenje se ponovno, kao i u jednostavnom i u NaCl sustavu (vidi poglavlja 4.3.1 i 4.3.2), može naći u činjenici da se uz spontano taloženje istovremeno događa i neutralizacija AA s  $H^+$  ionima, a dodatni efekt na promjenu pH prema većim vrijednostima uzrokuju i ostali prisutni ioni koji su komponente umjetnog urina. pH promjene koje se događaju u sustavu umjetnog urina zbog gore navedenih procesa ponovno rezultiraju jače izraženim efektom pri  $pH_i = 9$  budući da su u tim uvjetima sve AA u deprotoniranoj formi primarnih karboksilnih i amino skupina te bočnih ogranaka.

Strukturne analize sustava provedene su pomoću FT-IR i PXRD analize (vidi FT-IR i PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.1 i 8.3).

**Slika 46** prikazuje IR spektre uzoraka taloženih u prisustvu AA. U usporedbi sa sustavom u kojem nema AA, pojavio se apsorpcijski maksimum na približno  $1110\text{ cm}^{-1}$ , koji bi mogao biti vibracija C-OH veze AA, što ukazuje da AA mogu biti uklopljene u nakupine kristala tijekom kristalne agregacije ili adsorbirane na površini kristala.<sup>181,182</sup> Iz spektara uzoraka Bez AA za oba pH u vibracijskom području iznad  $3000\text{ cm}^{-1}$  vidljive su oštre vrpce koje se odnose na asimetrično i simetrično istezanje koordiniranih molekula vode dok je u svim sustavima uz dodatak AA navedeno područje šire, a oštre vrpce se manje ističu.<sup>11,141</sup> Te promjene mogu biti uzrokovane složenim vodikovim vezama između C=O skupina  $C_2O_4^{2-}$  i O-H veze u  $H_2O$ ,  $-NH_2$  ili  $-COOH$  skupinama AA.<sup>182</sup> Također se za uzorke Gly, Phe, Cys i Ser pri  $pH_i = 9$  na oko  $912\text{ cm}^{-1}$  uočava transmisijska vrpca, koja ukazuje na prisutnost višeg udjela COD u uzorcima, a područje iznad  $3000\text{ cm}^{-1}$  pokazuje jednu široku vrpcu. Ostali spektri su karakteristični za COM.

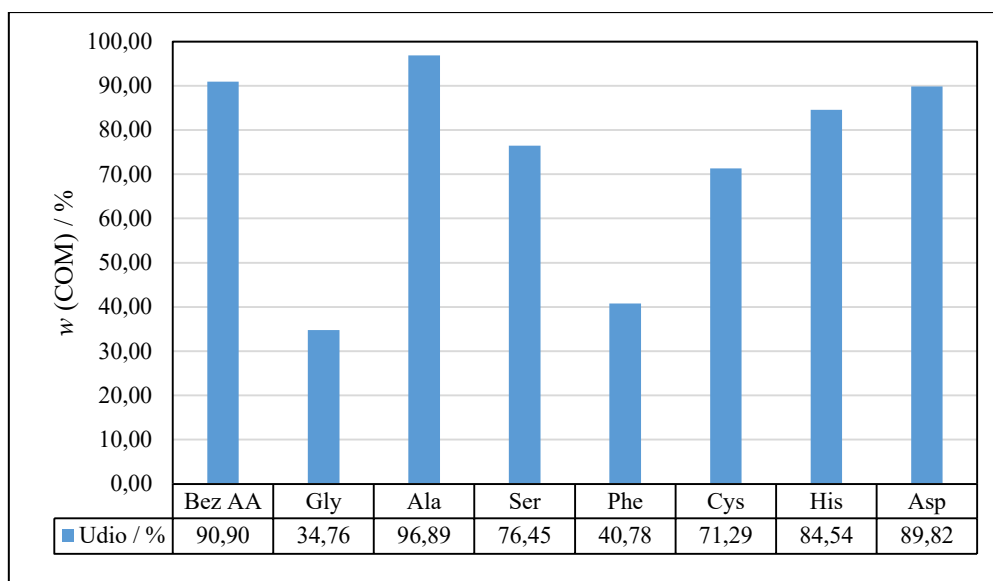


**Slika 46.** FTIR spektri uzoraka istaloženih u umjetnom urinu pri pH<sub>i</sub> = 5 i pH<sub>i</sub> = 9 uz dodatak AA.



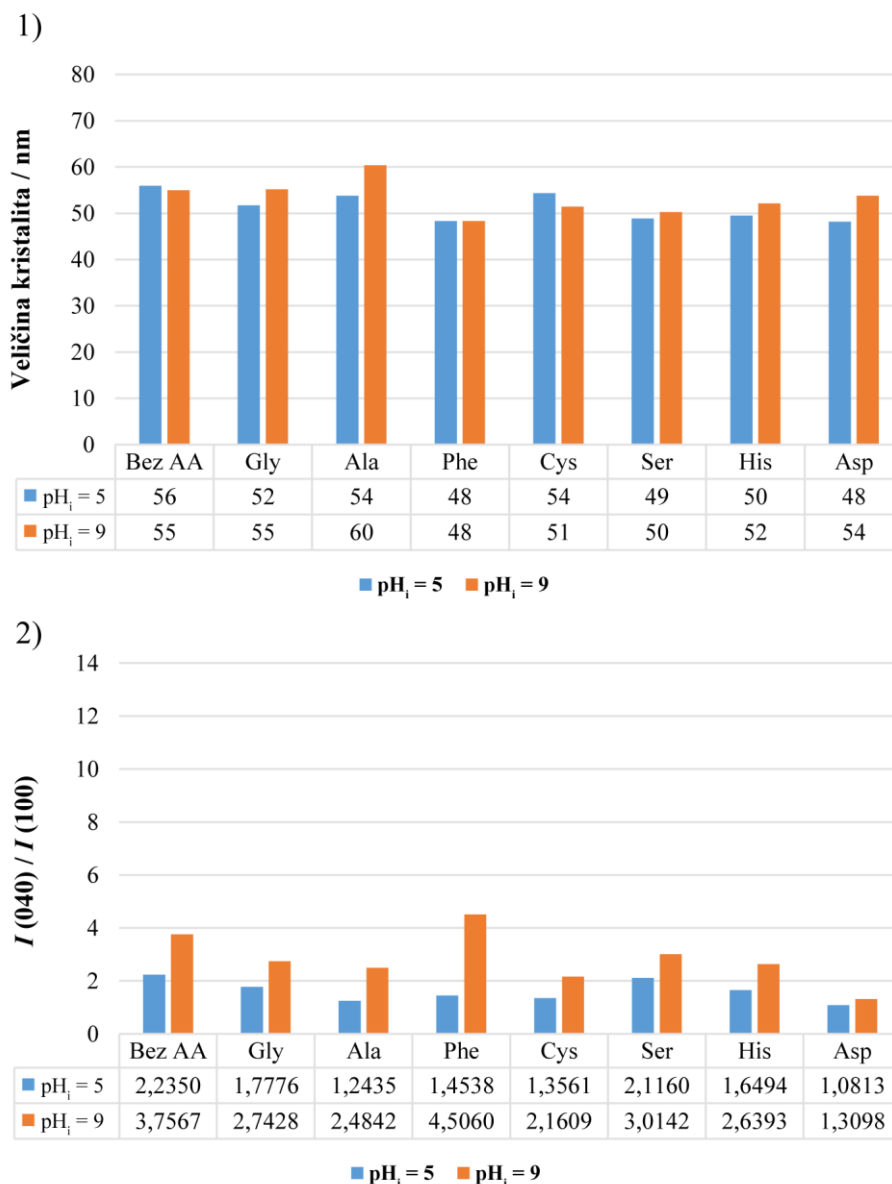
**Slika 47.** PXRD difraktogrami uzoraka istaloženih u umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  uz dodatak AA.

Sastav istaložene čvrste faze određen je rentgenskom difrakcijskom analizom što je prikazano na **slici 47**. U svim sustavima pri  $\text{pH}_i = 5$  taloži isključivo COM, međutim do značajnije promjene dolazi pri  $\text{pH}_i = 9$  gdje taloži COM u smjesi s COD (vidi PXRD analizu standarda COM i COD u dodatku 8.3). Kako bi se odredio udio pojedine hidratne faze u uzorcima izvršena je kvantitativna rentgenska difrakcijska analiza (**slika 48**).



**Slika 48.** Udio istaloženog COM u umjetnom urinu uz dodatak AA pri  $\text{pH}_i = 9$ .

Iz **slike 48** vidljivo je da polarne AA (Gly > Cys > Ser) imaju značajniji utjecaj na inhibiciju COM. Osim polarnih AA na inhibiciju COM utječe i Phe. Ovakav utjecaj je moguće objasniti time da su sve ove AA pri  $\text{pH}_i = 9$  u anionskoj formi te se elektrostatskim interakcijama uz dodatni doprinos vodikove veze preko bočnog ogranka, u okruženju ionima prisutnim u umjetnom urinu jače vežu na COM te inhibiraju njegov rast.



**Slika 49.** Utjecaj AA na rast kristala COM u umjetnom urinu: promjena veličine kristalita COM (1), omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika (2).

Veličina kristalita COM u sustavu Bez AA pri oba pH iznosi  $55 \pm 5$  nm. U usporedbi s ovim veličinama, u sustavima uz dodatak AA veličina kristalita se nije značajnije mijenjala.

Na **slici 49 2)** prikazan je omjer intenziteta dva najintenzivnija difrakcijska pika u sustavu Bez AA te promjena tog omjera u sustavima uz dodatak AA. Omjer intenziteta  $I(040) / I(100)$  izmjeren u sustavu Bez AA pri  $\text{pH}_i = 5$  iznosi 2,24, a pri  $\text{pH}_i = 9$  iznosi 3,76. Ovakve vrijednosti ukazuju na to da je i pri  $\text{pH}_i = 5$  i pri  $\text{pH}_i = 9$  najsporiji rast kristala COM okomito na (040) ravninu. Efekt je izraženiji u sustavu pri  $\text{pH}_i = 9$ . Dodatakom AA u oba promatrana

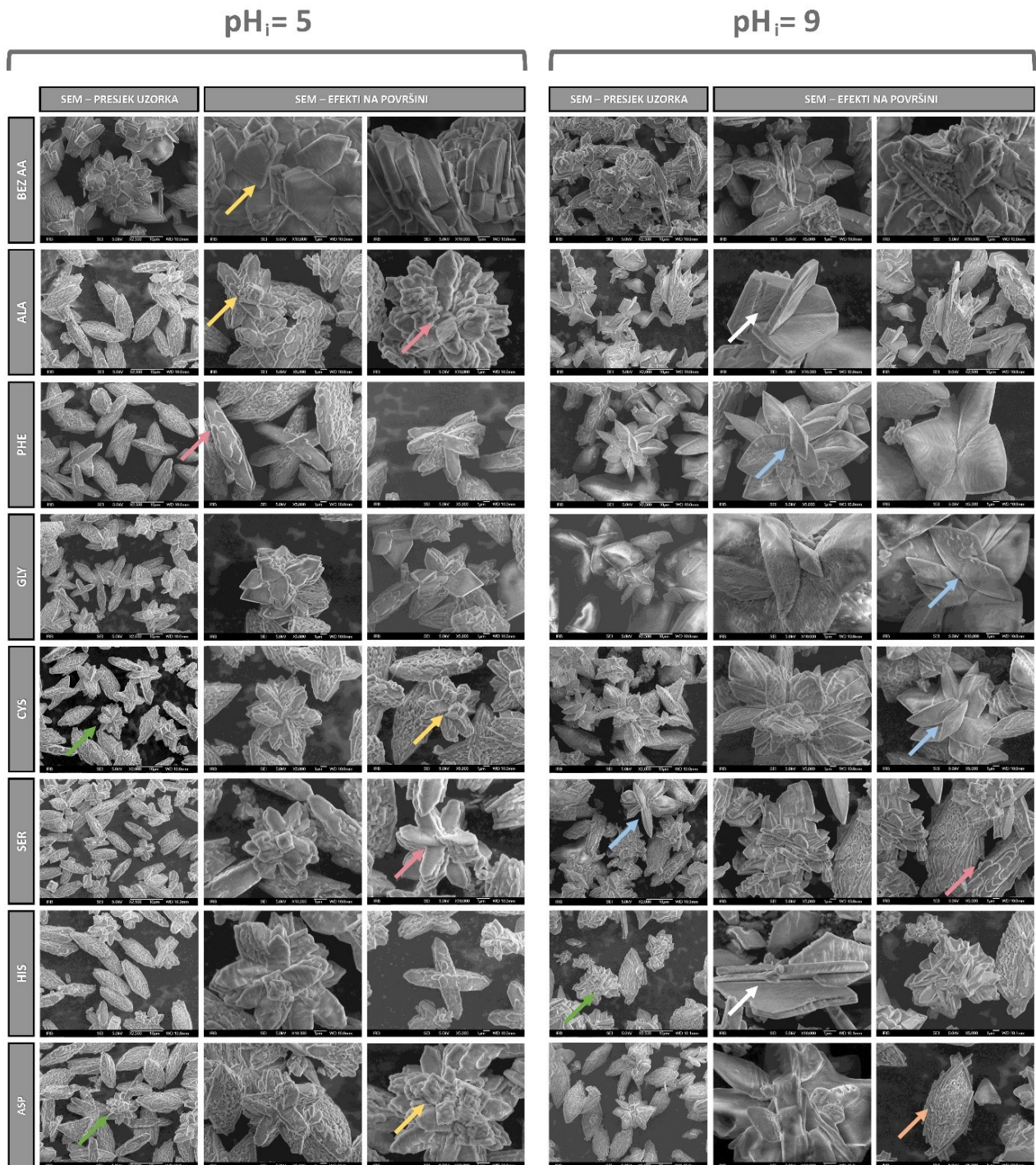
sustava promovira se najsporiji rast kristala COM okomito na (100) ravninu (osim za Phe pri  $\text{pH}_i = 9$  i Ser pri  $\text{pH}_i = 5$ ).

Kao što je već detaljnije pojašnjeno u jednostavnom i NaCl sustavu, pri  $\text{pH}_i = 5$  sve AA su većinom u obliku zwitter-iona te su moguće interakcije pozitivnog dijela AA (protonirane amino skupine) za negativni dio COM kristala ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ) i usporavanje rasta COM okomito na (040) ravninu ili interakcije negativnog dijela AA (deprotonirane karboksilne skupine) za pozitivni dio COM kristala ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i usporavanje rasta COM okomito na (100) ravninu. Pri  $\text{pH}_i = 9$  AA su većinom u anionskoj formi te se preferirano vežu svojim negativnim dijelom (deprotoniranom karboksilnom skupinom) za pozitivni dio COM kristala ( $\text{Ca}^{2+}$ ), kao što je prethodno pojašnjeno upravo ove interakcije stvaraju efekt najsporijeg rasta COM okomito na (100) ravninu.

Međutim, pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  u sustavu umjetnog urina dodatkom AA uočava se najsporiji rast kristala COM okomito na (100) ravninu što je u suprotnosti u odnosu na rast COM u jednostavnom (pri  $\text{pH}_i = 5$  (osim Phe i Asp)) i NaCl sustavu (pri oba pH). Pretpostavka navedenog efekta može se djelomično protumačiti visokom ionskom jakosti sustava, prisutnosti značajnije koncentracije drugih iona koji stvaraju dodatne interakcije s AA i s površinom COM, te moguće dominantnije interakcije negativnih dijelova AA za pozitivni dio COM kristala.

Ravnina (100) ima najveću gustoću kalcijevih iona na površini ( $0,054 \text{ Ca}^{2+}/\text{Å}^2$ ) te uslijed toga preferirano veže negativnije molekule/ione.<sup>183</sup> U (100) ravnini površinski slojevi sadrže dva pod sloja oksalatnih skupina; jedan je paralelan, a drugi okomit na ravninu (vidi Literaturni pregled, **slika 2**). Okomite skupine oksalata na ravnini leže ispod najvišeg površinskog sloja (ne "strše") te upravo ova struktura čini (100) ravninu bogatiju  $\text{Ca}^{2+}$  ionima.<sup>184,185</sup>

U literaturi<sup>181,182</sup> je pojašnjeno da pri pH nižem od izoelektirčne točke AA COM najsporije raste okomito na (040) ravninu, a pri pH višem od izoelektirčne točke najsporije raste okomito na (100) ravninu. Međutim, vrlo sustavnim i detaljnim proučavanjem taloženja kalcijeva oksalata u ovoj disertaciji možemo zaključiti da osim AA koje se nalaze u otopini, na rast COM kristala utječu i ostali ioni u otopini.



**Slika 50.** SEM snimke uzorka kalcijevih oksalata taloženih u umjetnom urinu s dodatkom aminokiselina pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$ . Plave strelice pokazuju COD kristale. Žute i bijele strelice pokazuju čestice COM različitog habitusa. Narančasta strelica pokazuje agregiranu pločastu strukturu. Ružičaste strelice pokazuju rast COM, a zelena agregaciju.

Morfologija čvrste faze dobivene spontanom taloženjem kalcijeva oksalata u umjetnom urinu pri oba pH prikazana je na **slici 50**. U sustavu Bez AA nastale su više ili manje pločaste



čestice COM bez vidljive dendritne strukture s izrazitom agregacijom manjih čestica. Ovo zapažanje u skladu je s procjenjenom specifičnom površinom tih čestica manjom od  $2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  (točna vrijednost se nije mogla izmjeriti budući da je raspoloživa masa za mjerenje specifične površine bila premala). Nestanak dendritnih čestica i povećanje udjela više ili manje pravilnijih čestica u usporedbi s NaCl sustavom može se povezati sa činjenicom da je umjetni urin sustav s nešto manjom prezasićenosti ( $S_i \approx 21$ ) u usporedbi s NaCl sustavom ( $S_i \approx 24$ ). Time su stvoreni uvjeti još značajnijeg smanjenja početne prezasićenosti u usporedbi s jednostavnim sustavom ( $S_i \approx 36$ ) pa time i inhibicija dendritnog rasta kristala. SEM snimkama je evidentirana razlika u teksturi površina i rubova tih čestica. Uočeno je da COM kristali nastali pri  $\text{pH}_i = 5$  kao i u prethodna dva sustava imaju ravniju, glađu površinu te su im rubovi zaobljeni, a površinske brazde gušće i pravilno raspoređene. U usporedbi s ovakvom teksturom, COM čestice nastale pri  $\text{pH}_i = 9$  također imaju ravnu i glatku površinu, ali se uočavaju i slagaline izduženih primarnih kristalita s više ili manje „stršećih“ kristalita koje imaju naboranu površinu s efektom poroznosti. Rentgenskom difrakcijskom analizom dva najintenzivnija pika (**slika 43 2**) ustanovljeno je da je pri oba pH u sustavu Bez AA najsporiji rast COM okomito na (100) ravninu. Kristali poprimaju više ili manje pravilan šesterokutni oblik s dobro razvijenim postranih plohami ((010) i (021), vidi dodatak 8.4, **slika 70**). Dodatkom AA u sustave uočen je značajniji efekt na morfologiju COM. Efekt agregacije prisutan je u svim sustavima (**slika 44** zelene strelice). Ružičastim strelicama su označeni efekti rasta COM. Vidljiva su dva tipa rasta. Jedan, kao i u NaCl sustavu, započinje na prethodno stvorenim stepenicama, te se širi uniformno duž cijele plohe (primjer Ser pri oba pH) dok drugi način rasta započinje na nekoliko mjesta na istoj plohi (primjer Phe pri  $\text{pH}_i = 5$ ). Posljedica rasta COM kristala (žute i bijele strelice) uočava se promjenom habitusa, tj. zadebljanjem i zaobljavanjem čestica COM te prividnim rastom u visinu (gubi se pločasta struktura) ili razvojem pločastih čestica COM. Pločice u nekim sustavima izgledaju kao agregirana struktura manjih kristalita koji se pravilno slažu (narančasta strelica) i koje su vrlo kompaktne. Za razliku od prethodna dva promatrana sustava, u sustavu umjetnog urina uočava se promocija taloženja COD pri  $\text{pH}_i = 9$  (plave strelice) za AA Phe, Gly, Cys i Ser. Također je i u ostalim sustavim pri  $\text{pH}_i = 9$  zabilježen manji udio COD međutim na SEM slikama se ne uočava vjerojatno jer je agregiran.

Aminokiselina u urinu može se adsorbirati na površinu kristala kalcijeva oksalata, čime utječe na rast, agregaciju i transformaciju.<sup>156</sup> Ovisno u kojem obliku se nalaze u otopini mogu se vezati na  $\text{Ca}^{2+}$  i/ili  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  na površini kalcijeva oksalata. Poznato je da su karboksilne kiseline

i njihove soli inhibitori rasta.<sup>162</sup> Elektrostatska/ionska interakcija mogu dovesti do značajne promjene morfologije.<sup>165</sup>

Jedno od nedovoljno proučavanih pitanja je učinak aditiva, posebno organskih, na proces agregacije tijekom kristalizacije. U literaturi su navodi kontradiktorni. Neki autori smatraju da organski spojevi djeluju kao ljepilo koje olakšava adheziju pri sudaru kristala.<sup>14</sup> Prema ostalim istraživačima, organski aditivi, u pravilu, sprečavaju agregaciju.<sup>187</sup> Dakle, ovo pitanje je bitno za razumijevanje mehanizama litogeneze i zahtijeva daljnju istragu. U NaCl sustavu, neovisno o dodatku AA vidljiv je početak agregacije, dok u sustavu umjetnog urina dolazi do izražene agregacije također neovisno o dodatku AA, te se može zaključiti da sam medij u kojem se taloži ima značajan utjecaj na agregaciju. U literaturi se kao zaključak sa stajališta gore navedenog predlaže opis formirajućeg mehanizma bubrežnih kamenaca s agregatnom strukturom.<sup>187</sup> Visoka prezasićenost u fiziološkoj otopini uzrokuje visoku koncentraciju kristalnih čestica (što se može dokazati kristalurijom - čestim suputnikom urolitijaze). Sitne čestice agregiraju u veće čestice tijekom taloženja te se taj proces događa autokatalitički, a kao rezultat nastaju veliki agregati.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenih istraživanja spontanog taloženja kalcijeva oksalata u širokom koncentracijskom području koje obuhvaća područje hiperoksalurije ( $7,5 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{Ca}^{2+}) \leq 10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $0,6 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \leq 8,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  tijekom 20 minuta izvedeni su sljedeći zaključci:

1. U ispitivanom koncentracijskom području hiperoksalurije prezasićenost sustava se mijenja; u jednostavnom sustavu  $10,70 \leq S_i \leq 39,94$ , a u umjetnom urinu  $3,81 \leq S_i \leq 24,40$ .
2. U ispitivanom koncentracijskom području u oba istraživana sustava i pri oba  $\text{pH}_i$  zabilježeno je trenutačno taloženje odmah po miješanju reaktanata. U jednostavnom sustavu do taloženja dolazi u cijelom ispitivanom koncentracijskom području pri oba  $\text{pH}_i$ , a u umjetnom urinu taloži u koncentracijskom području prezasićenosti  $S_i \geq 10$ . Pri  $S_i < 10$  (sustavi  $c_i(\text{Ca}^{2+}) \leq 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$  i ekvimolarni sustav  $c_i(\text{Ca}^{2+}) = c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pri oba  $\text{pH}_i$  u umjetnom urinu nije zabilježeno taloženje.
3. U jednostavnom sustavu pri oba istraživana  $\text{pH}_i$  u cijelom ispitivanom koncentracijskom području nema promjene sastava čvrste faze dok u sustavu umjetnog urina dolazi do promjene. U jednostavnom sustavu pri oba  $\text{pH}_i$  taloži isključivo COM. U sustavu umjetnog urina pri  $\text{pH}_i = 5$  taloži COM, dok pri  $\text{pH}_i = 9$  taloži COM i smjesa COM i COD (pri višim koncentracijama kalcija ( $c(\text{Ca}^{2+}) \geq 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Maseni udio COD u takvoj smjesi je  $w(\text{COD}) \leq 10 \%$ .
4. U jednostavnom sustavu pri oba istraživana  $\text{pH}_i$  taložile su veće čestice u odnosu na sustav umjetnog urina. Razlika u veličini čestica vidljiva je i unutar sustava pri oba istraživana  $\text{pH}$  (pri  $\text{pH}_i = 5$  talože veće čestice).
5. Dendritna morfologija karakteristična je za jednostavan sustav (sustav više prezasićenosti  $S_i \geq 28$ ), dok se u sustavu umjetnog urina pojavljuju više ili manje pravilni šesterokutni COM kristali, te je izražena agregacija. U sustavu s najmanjom koncentracijom oksalata,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ , COD je taložio kao tetragonalna bipiramida.

Na temelju rezultata sustavnih istraživanja spontanog taloženja kalcijeva oksalata u području hiperoksalurije ( $c_i(\text{Ca}^{2+}) = 7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_i(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) uz dodatak AA (Ala, Phe, Gly, Cys, Ser, His, Asp;  $c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i povećavajući kompleksnost kemijskog sastava sustava (jednostavan sustav, NaCl sustav i sustav umjetnog urina) pri  $\text{pH}_i = 5$  i  $\text{pH}_i = 9$  izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Dodatak AA u svim ispitivanim sustavima pri oba  $\text{pH}_i$  ne utječe na induksijsko vrijeme, to jest u svim sustavima uz dodatak AA dolazi do trenutnog taloženja odmah po miješanju reaktanata kao i u sustavima Bez AA. U svim sustavima Bez AA  $\text{pH}$  vrijednost sustava se naglo smanjuje s vremenom do postizanja  $\text{pH}$  platoa. Dodatak svih AA utječe na promjenu nagiba krivulja  $\text{pH}$ -vrijeme i formiranje drugačijeg  $\text{pH}$  platoa i taj je efekt ovisan o kompleksnosti sustava,  $\text{pH}_i$  i tipu AA. Jači efekt zabilježen je pri  $\text{pH}_i = 9$  i postaje sve izraženiji kako se povećava kompleksnost kemijskog sastava sustava jednostavan < NaCl < umjetni urin.
2. Dodatak AA ne utječe na sastav čvrste faze u jednostavnom i NaCl sustavu, a u umjetnom urinu utječe.

U jednostavnom i NaCl sustavu pri oba  $\text{pH}_i$  i u umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 5$  uz dodatak svih AA taloži se samo COM. U umjetnom urinu pri  $\text{pH}_i = 9$  je zabilježeno povećanje udjela COD u smjesi sa COM u usporedbi sa sustavom Bez AA ( $w(\text{COD}) \leq 10 \%$ ). Najveći udio COD dobiven je u sustavima uz dodatak polarnih AA i Phe pri  $\text{pH}_i = 9$  ( $w(\text{COD}) = \text{Gly } 65,2 \% > \text{Phe } 59,2 \% > \text{Cys } 28,7 \% > \text{Ser } 23,5 \%$ ). Ovakav utjecaj je moguće objasniti time da su sve ove AA pri  $\text{pH}_i = 9$  u anionskoj formi te se elektrostatskim interakcijama uz dodatni doprinos vodikove veze preko bočnog ogranka, u okruženju ionima prisutnim u umjetnom urinu jače vežu na COM te inhibiraju njegov rast.

3. Dodatak AA utječe na veličinu kristalita COM; najizraženiji utjecaj je u jednostavnom sustavu

Veličina kristalita COM u sva tri istraživana sustava (jednostavan, NaCl sustav i umjetni urin) Bez AA pri oba  $\text{pH}$  iznosi  $55 \pm 5 \text{ nm}$ . U jednostavnom sustavu najveći

efekti dodatka AA na veličinu kristalita zabilježeni su pri  $\text{pH}_i = 9$  gdje su izmjereni značajno manji kristaliti (33 - 42 nm) u sustavima s: Gly, Phe, Ser, Ala i Cys. Pri  $\text{pH}_i = 5$  je zabilježen efekt u sustavima uz dodatak Ser i Ala gdje su izmjereni također manji kristaliti (37 i 44 nm). U NaCl sustavu bilježi se povećanje veličine kristalita pri  $\text{pH}_i = 9$  (62 i 63 nm) u sustavima s: Asp i His. Pri  $\text{pH}_i = 5$  zabilježen je isti efekt u sustavima uz dodatak nepolarnih AA (Ala i Phe) i Cys (63 - 70 nm). U sustavu umjetnog urina dodatak AA nije značajnije utjecao na veličinu kristalita.

a. dodatak AA utječe na rast COM kristala

U jednostavnom sustavu i umjetnom urinu bez dodatka AA pri oba  $\text{pH}_i$  najsporiji rast COM kristala je okomito na ravninu (040), a u NaCl sustavu na (100) ravninu. Najizraženiji efekti su zabilježeni u jednostavnom sustavu i umjetnom urinu. U jednostavnom sustavu pri  $\text{pH}_i = 5$  dodatkom polarnih AA (Ser > Gly > Cys) i nepolarnog Ala promoviran je efekt najsporijeg rasta okomito na (040) ravninu. Pri  $\text{pH}_i = 9$  uz dodatak svih testiranih AA (osim Ala) zabilježen je najsporiji rast COM okomito na (100) ravninu. U sustavu umjetnog urina pri oba  $\text{pH}_i$  taj je efekt zabilježen kod svih AA. Pri  $\text{pH}_i = 9$  su efekti izraženiji budući da su AA u anionskoj formi te se bolje adsorbiraju na (100) ravninu zbog njenog izraženijeg pozitivnog naboja (veće gustoće kalcijevih iona na površini). Najizraženiji efekti su zabilježeni u slučaju dodatka Asp. Najizraženiji efekt Asp, kako u jednostavnom sustavu tako i u umjetnom urinu, moguće je objasniti postojanjem dvije deprotonirane karboksilne skupine (primarna i bočni ogranak) zbog čega se jače adsorbira i veže na površinu COM.

4. Dodatak AA utječe na promjenu morfologije COM kristala.

U jednostavnom sustavu bez dodatka AA talože isključivo dendritne čestice COM kristala, dok u NaCl sustavu i umjetnom urinu talože više ili manje pravilni kristali. U NaCl sustavu i umjetnom urinu izražena je pojava agregacije kristala. Dodatak AA utječe na morfološke promjene čestica COM. Pri  $\text{pH}_i = 5$  u sva tri sustava (jednostavan, NaCl i umjetni urin) u usporedbi sa sustavom Bez AA, COM kristali zadržavaju relativno ravnu i glatku površinu, ali su im rubovi zaobljeniji i površinske brazde gušće i pravilno raspoređene. Pri  $\text{pH}_i = 9$  s dodatkom AA površina COM kristala izgleda naborano i s efektom poroznosti, a struktura se prikazuje kao slagalina izduženih primarnih kristalita s više ili manje „stršećih“ kristalita.

Ovim istraživanjem je prvi puta upotrebjeno miješanje ultrazvučnim zračenjem u kalcij oksalatnom sustavu. Tako je pripremljen čisti i morfološki dobro definiran kalcijev oksalat dihidrat, COD.

Na temelju ovih istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Način miješanja, omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  i  $c(\text{citrat})$  utječu na taloženje i morfologiju COD kristala.
2. Habitus kristala COD u obliku pravilnih tetragonalnih bipiramida s prizmom pripremljen je u ultrazvučno miješanom sustavu sastava:  $c(\text{Ca}^{2+}) = 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 2,33 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c(\text{citrat}) = 9,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a omjer  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .
3. Elektrokinetička mjerenja COD pokazala su da je  $\zeta$ -potencijal negativan (od  $-2,40 \pm 1,98 \text{ mV}$  do  $-26,80 \pm 0,78 \text{ mV}$ ) u cijelom promatranom pH području ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$ ).
4. Dodatak polarnih (Gly i Ser) i nepolarnih AA (Phe i Ala) utječe na  $\zeta$ -potencijal COD. U području  $\text{pH}_i \leq 7,0$  AA su u zwitter-ionskoj formi i ne mijenjaju značajnije  $\zeta$ -potencijal, dok su pri  $\text{pH} = 10,0$  u anionskoj formi i povećavaju negativnost  $\zeta$ -potencijala. Pri tom najveći efekt pokazuju polarne AA (Gly i Ser).
5.  $\zeta$ -potencijal COD mijenja se s koncentracijom AA što je zapaženo u istraživanjima na primjeru His. Pri  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 6$  nisu zabilježene značajnije promjene dok je pri  $\text{pH} = 10$  zabilježeno povećanje negativnosti  $\zeta$ -potencijala s povećanjem koncentracije His što ukazuje na jaču adsorpciju His u tim uvjetima.

Ostvareni rezultati doprinose boljem razumijevanju uloge kompleksnosti kemijskog sastava na taloženje u kalcij oksalatnom sustavu i daju uvid u interakcije između aminokiselina relevantnih za patološku biomineralizaciju i kristala kalcijeva oksalata, COM i COD u uvjetima hiperoksalurije.

## **6. LITERATURA**



1. H. Füredi-Milhofer, *Croat. Chem. Acta* **56** (1983) 721-740.
2. E. D. Eans, *Dynamics of Calcium Phosphate Precipitation u; Calcification in Biological Systems*, E. Bonnucci (ur.) (1992) 1-17.
3. B. Hess, R. L. R., J. Kavanagh, S. R. Khan, D. J. Kok, A. L. Rodgers i H. G. Tiselius, *Eur. Urol.* **40** (2001) 220-230.
4. V. Romero, M. Haluk Akpınar i D. G. Assimos, *Rev. Urol.* **12** (2010) 86-96.
5. M. Robert, A. M Boularan, O. Delbos, L. Monnier i D. Grasset, *Eur. Urol.* **29** (1996) 456-461.
6. C. Y. C. Pak, *Lancet.* **351** (1998) 1797-1801.
7. H. G. Tiselius, B. Hess i E. Boeve, *Eur. Urol.* **41** (2002) 1-11.
8. J. I. Scheinman, *Kidney Int.* **40** (1991) 389-399.
9. A. S. Bramley, M. J. Hounslow i R. L. Ryall, *Chem. Eng. Sci.* **52** (1997) 747-757.
10. K. Pitt, G. P. Mitchell, A. Ray, B. R. Heywood i M. J. Hounslow, *J. Cryst. Growth* **361** (2012) 176-188.
11. C. Conti, M. Casati, C. Colombo, M. Realini, L. Brambilla i G. Zerbi, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **128** (2014) 413-419.
12. P. Brown, D. Ackermann i B. Finlayson, *J. Cryst. Growth* **98** (1989) 285-292.
13. A. Šter, S. Šafranko, K. Bilić, B. Marković i D. Kralj, *Urolithiasis on line* (doi 10.1007/s00240-017-0991-0)
14. D. Škrtić, M. Marković, Lj. Komunjer i H. Füredi-Milhofer, *J. Cryst. Growth* **66** (1984) 431-440.
15. D. Škrtić, H. Füredi-Milhofer i M. Marković, *J. Cryst. Growth* **80** (1987) 113-120.
16. J. Garside, Lj. Brečević i J. W. Mullin, *J. Cryst. Growth* **57** (1982) 233-240.
17. Lj. Brečević, D. Škrtić i J. Garside, *J. Cryst. Growth* **74** (1986) 399-408.
18. V. Babić-Ivančić, H. Füredi-Milhofer, B. Purgarić, N. Brničević i Z. Despotović, *J. Cryst. Growth* **71** (1985) 655-663.
19. Lj. Brečević, D. Kralj i J. Garside, *J. Cryst. Growth* **97** (1989) 460-468.
20. R. C. Walton, J. P. Kavanagh, B. R. Heywood i P. N. Rao, *J. Cryst. Growth* **284** (2005) 517-529.
21. J. M. Baumann, B. Affolter i H. - P. Siegrist, *Scanning Microscopy* **13** (1999) 291-298.
22. M. Robert, A. M. Boularan, C. Colette, M. Averous i L. Monnier, *British J. Urol.* **73** (1994) 358-361.
23. K. G. Christmas, L. B. Gower, S. R. Khan i H. El-Shall, *J. Colloid Interface Sci.* **256** (2002) 168-174.
24. J. R. Burns i B. Finlayson, *Invest. Urol.* **18** (1980) 167-169.
25. W. C. Thomas, M. H. Malagodi i O. M. Rennert, u; *Urolithiasis, Clinical and Basic Research*, L. H. Smith, W. G. Robertson i B. Finlayson, 1981, str. 77-80.
26. L. Cheng, *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **4** (1980) 317-349.
27. K. Kohri, M. Takada, Y. Katoh, K. Kataoka, M. Iguchi i T. Kurita, *Int. Urol. Nephrol.* **21** (1989) 9-16.
28. D. E. Fleming, W. Van Bronswijk i R. L. Ryall, *Clinical Sci.* **101** (2001) 159-168.
29. G. Shouwu, D. W. Michael i A. Jeffrey, *J. Langmuir* **18** (2002) 4284-4291.
30. D. Škrtić, M. Marković i Lj. Komunjer, *J. Cryst. Growth* **79** (1986) 791-796.
31. M. Marković, Lj. Komunjer, H. Füredi-Milhofer i D. Škrtić, *J. Cryst. Growth* **88** (1988) 118-124.
32. F. Grases, J. G. March, F. Bibiloni i E. Amat, *J. Cryst. Growth* **87** (1988) 299-304.
33. N. Laube, B. Mohr i A. Hesse, *J. Cryst. Growth* **233** (2001) 367-374.
34. O. A. Golovanova, YU.O. Punin, A. S. Vystoskiy i V. R. Khannanov, *Chem. Sustain. Dev.* **19** (2011) 463-470.

35. O. A. Golovanova, E. Yu. Achkasova, Yu. O. Punin i E. V. Zhelyaev, *Kristallografiya*, **51** (2006) 376-392.
36. A. R. Izatulina, O. A. Golovanova i Yu. O. Punin, *Chem. Sustain. Dev.* **16** (2008) 163-167.
37. A. E. Pierratos, H. Khalaff, P. T. Cheng, K. Psihramis i M. A. Jewett, *J. Urol.* **151** (1994) 571-584.
38. V. Thongboonkerd, T. Semangoen i S. Chutipongtanate, *Clin. Chim. Acta* **367** (2006) 120-131.
39. A. E. Nielsen, *Croat. Chem. Acta* **42** (1970) 319-333.
40. Lj. Brečević i D. Kralj, *Kinetics and Mechanisms of Crystal Growth in Aqueous Systems*, u: N. Kallay (ur.), *Interfacial Dynamics, Surfactant Science Series*, Marcel Dekker, New York, 2000, str. 435-474.
41. S. Mann, *Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001.
42. H. Füredi-Milhofer i A. G. Walton, *Principles of Precipitation of Fine Particles in Dispersion of Powders in Liquids*, 3<sup>rd</sup> Publishers, London, 1981, str. 203-272.
43. H. Füredi-Milhofer i S. Sarig, *Prog. Cryst. Growth and Charact.* **32** (1996) 45-74.
44. V. R. Franceschi i H.T. Horner, Jr., *Botanical Review* **46** (1980) 361-427.
45. M. A. Webb, *Plant Cell* **11** (1999) 751-761.
46. V. R. Franceschi i P. A. Nakata, *Annu Rev. Plant. Biol.* **56** (2005) 41-71.
47. G. Martin, M. Guggiari, D. Bravo, J. Zopfi; G. Cailleau, M. Aragno, D. Job; E. Verrecchia i P. Junier, *Environ. Microb.* **14** (2012) 2960-2970.
48. R. H. Doremus, S. Teich i P. X. Silvis, *Invest. Urol.* **15** (1978) 469-472.
49. G. Hamarsten, *Etiologic Factors in Renal Lithiasis*, A. J. Butt (ur.), Springfield: Ches. C. Thomas, 1956, str. 89.
50. G. L. Gardner, *J. Cryst. Growth*, **30** (1975) 158-164.
51. S. Deganello, *Zeitschrift für Kristallographie*, **152** (1980) 247-252.
52. F. Grases, O. Söhnle, A. Millán, A. Costa-Bauzá i A. Conte, *Cryst. Growth Res.* **1** (1994) 367-389.
53. G. Mandel, N. Mandel, In: *Kidney Stones: Medical and Surgical Management*, F. L. Coe, M. J. Favus, C.Y.C. Pak, J. H. Parks i G. M. Preminger (ur.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
54. A. Thomas, *Biomimetic Growth and Morphology Control of Calcium Oxalates*, Doktorski rad, TU Dresden, Njemačka, 2009., str. 4.
55. C. Sterling, *Acta Cryst.* **18** (1965) 917-921.
56. V. Tazzoli i C. Domenegheti, *Am. Mineralogist*, **65** (1980) 327-334.
57. F. Grases, A. Millan i A. Conte, *Urol. Res.* **18** (1990) 17-20.
58. H. Yu, R. Sheikholeslami i W.O.S. Doherty, *Powder Technol.* **160** (2005) 2-6.
59. X.-Y. Sun, J.-M. Ouyang, A.-J. Liu, Y.-M. Ding i Q.-Z. Gan, *Mater. Sci. Eng. C* **57** (2015) 147-156.
60. S. Deganello, A. R. Kampf i P. B. Moore, *Am. Mineralogist*. **66** (1981) 859-865.
61. H.A. Lowenstam i S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
62. S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 3392-3406.
63. H. Cölfen i L. Qi, *Chem. Eur. J.* **7** (2001) 106-116.
64. I. Buljan Meić, J. Kontrec, D. Domazet Jurašin, B. Njegić Džakula, L. Štajner, D. M. Lyons, M. Dutour Sikirić i D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **17** (2017) 1103-1117.
65. S. Fermani, B. Njegić Džakula, M. Reggi, G. Falini i D. Kralj, *CrystEngComm* **19** (2017) 2451-2455.

66. G. Falini, S. Fermani, M. Reggi, B. Njegić Džakula i D. Kralj, *Chem. Commun.* **50** (2014) 15370-15373.
67. B. Njegić Džakula, J. Kontrec, M. Ukrainczyk, S. Sviben i D. Kralj, *Cryst. Res. Tech.* **49** (2014) 244-256.
68. B. Njegić-Džakula, M. Reggi, G. Falini, I. Weber, Lj. Brečević i D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 39-47.
69. B. Njegić-Džakula, Lj. Brečević, G. Falini i D. Kralj, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 2425-2434.
70. A. Bigi, E. Boanini, D. Walsh i S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 2163-2166.
71. A. Selmani, I. Cocha, K. Magdić, B. Čolović, V. Jokanović, S. Šegota, S. Gajović, A. Gajović, D. Jurašin i M. Dutour Sikirić, *CrystEngComm* (2015) 8529-8548.
72. M. Marković, B. O. Fowler, M. S. Tung, E. S. Lagergren, *Composition and Solubility Product of a Synthetic Hydroxyapatite*, In: *Mineral and Scale Formation and Inhibition*, Z. Amjad (ur.), Plenum Press, New York, 1995, str. 271-281.
73. J. M. Antonucci, D. Škrtić, E. D. Eanes, *Bioactive Polymeric Dental Materials Based on Amorphous Calcium Phosphate*, In: *Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplication*, R. M. Ottenbrite, S.J. Huang, K. Park (ur.), American Chemical Society, Washington DC, 1996, str. 243-254.
74. S. J. Al-Sanabani, A. A. Madfa, i F. A. Al-Sanabani, *Inter. J. Biomater.* **2013** (2013) *on line*.
75. S. Mann, *Nature* **332** (1988) 119-124.
76. S. Mann, D. D. Archibald, J. M. Didymus, T. Douglas, B. R. Heywood, F. C. Meldrum, N. J. Reeves, *Science* **261** (1993) 1286-1292.
77. S. Mann, *Nature* **365** (1993) 499-504.
78. R. Kniep i P. Simon, *Top. Curr. Chem.* **270** (2007) 73-125.
79. R. Kniep i S. Busch, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **35** (1996) 2623-2626.
80. S. Busch, U. Schwarz i R. Kniep, *Chem. Mater.* **13** (2001) 3260-3271.
81. A. Thomas, E. Rosseeva, O. Hochrein, W. Carrillo-Cabrera, P. Simon, P. Duchstein, D. Zahn i D. Kniep, *J. Chem. Eur.* **18** (2012) 4000-4009.
82. X. Wei, J. Yang, Z. Li, Y. Su i D. Wang, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **401** (2012) 107-115.
83. B. Grohe, S. Hug, A. Langdon, J. Jalkanen, K. A. Rogers, H. A. Goldberg, M. Karttunen i G. K. Hunter, *Langmuir* **28** (2012) 12182-12190.
84. L. Wang, S. R. Qiu, W. Zachowicz, X. Guan, J.J. DeYoreo, G. H. Nancollas i J. R. Hoyer, *Langmuir* **22** (2006) 7279-7285.
85. E. Sokol, E. Nigmatulina, N. Maksimova i A. Chiglintsev, *Eur. J. Mineral.* **17** (2005) 285-295.
86. F. J. Opalko i S. R. Khan, *J. Cryst. Growth* **181** (1997) 410-417.
87. F. Grases, A. Costa-Bauza, L. Garcia-Ferragut, *Adv. Colloid. Interface Sci.* **74** (1998) 169-194.
88. L. H. Smith, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **113** (2002) 1-20.
89. G. Schubert, *Urol. Res.* **34** (2006) 146-150.
90. P. Saetun, T. Semangoen i V. Thongboonkerd, *Am. J Physiol Renal Physiol.* **296** (2009) 1346-1354.
91. V. Thongboonkerd, *Contrib. Nephrol.* **160** (2008) 142-158.
92. A. Vinaiphath i V. Thongboonkerd, *Expert Rev. Proteomics* **14** (2017) 185-187.
93. K. Sakhaee, N. M. Maalouf i B. Sinnott, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97** (2012) 1847-1860.

94. M. L. Giannossi i V. Summa, *A review of pathological biomineral analysis techniques and classification schemes*, C. Aydinalp (ur.), *An introduction to the study of mineralogy*, In Tech Europe, Rijeka, Croatia, 2012, str. 123-146.
95. J. M. Ouyang, *Mat. Sci. Eng. C* **26** (2006) 679-682.
96. J. M. Ouyang, S. P. Deng, N. Zhou i B. Tieke, *Colloids Surf. A* **256** (2005) 21-27.
97. R. L. Ryall, R. M. Harnett, V. R. Marshall, *Clin. Chim. Acta* **112** (1981) 349-356.
98. J.I. Scheinman, *Kidney Int.* **40** (1991) 389-399.
99. N. Mamizadeh, N. Hooman, H. Otukesh, R. Hosieni, A. Nickavar i M. Goldasteh, *J. Ped. Nephrology* **3** (2015) 121-123.
100. C.J. Danpure, *Primary hyperoxaluria, The Molecular and metabolic basis of inherited disease*, New York, McGraw-hill., 1995, str. 2385-2424.
101. F. L. Coe, J.H. Parks i J.R. Asplin, *N. Engl. J. Med.* **327** (1992) 1141-1152.
102. D. Milošević, C. Rinat, D. Batinic i Y. Frishberg, *Pediatr Nephrol.* **17** (2002) 896-898.
103. K. Pachana, A. Wattanakornsiri i J. Nanuam, *ScienceAsia* **36** (2010) 165-168.
104. P. C. Hallson, G.A. Rose, S. Sulaiman, *Urol. Int.* **38** (1983) 179-181.
105. D. J. Kok, S.E. Papapoulos i O.L. Bijvoet, *Lancet* **1** (1986) 1056-1058.
106. D. Mattle i B. Hess, *Urol Res* **33** (2005) 73-79.
107. J. L. Meyer i L.H. Smith, *Invest. Urol.* **13** (1975) 36-39.
108. G. H. Nancollas i G.L. Gardner, *J. Cryst. Growth* **21** (1974) 267-276.
109. W. O. S. Doherty, E. Senogles i O. L. Crees, *Cryst. Res. Technol.* **29** (1994) 517-524.
110. X.-Y. Sun, J.-M. Ouyang i M. Xu, *CrystEngComm* **18** (2016) 5463-5473.
111. W.-B. Liang, W.-Y. Zhu, F.-X. Wang, J.-M. Ouyang, *Adv. Mater. Res.* **652** (2013) 254-257.
112. J. Manissorn, K. Fong-Ngern, P. Peerapen i V. Thongboonkerd, *Scientific Reports* **7** (2017) 1798-1801.
113. F. Grases, A. Costa-Bauza i R. M. Prieto, *Nutr. J.* **5** (2006) 23-30.
114. C. Barbas, A. Garcia, L. Saavedra i M Muros, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781** (2002) 433-455.
115. A. Welch, A. Mulligan, S.A. Bingham i K. T. Khaw, *J. Nutr.* **99** (2008) 1335-1343.
116. V. Thongboonkerd, S. Mungdee i W. Chiangjong, *J. Proteome. Res.* **8** (2009) 3206-3211.
117. H. Ide, E. Kikuchi, M. Hagiwara, N. Hayakawa, H. Hongo, A. Miyajima, M. Oya, *Ann. Surg. Oncol.* **23** (2016) 1029-1038.
118. G. Bihl i Meyers, *Lancet* **358** (2001) 651-656.
119. H. G. Tiselius, *Urol. Res.* **39** (2011) 231-243.
120. H. Han, A. M. Segal, J. L. Seifter i J. T. Dwyer, *Clin. Nutr. Res.* **4** (2015) 137-152.
121. V. N. Ratkalkar i J. G. Kleinman, *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **9** (2011) 187-197.
122. L. L. Hamm i K. S. Hering-Smith, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **31** (2002) 885-893.
123. R. Siener, *Urolithiasis*, **44** (2016) 51-56.
124. Lj. Brečević, H. Füredi-Milhofer, *Calcif. Tissue Res.* **10** (1972) 82-90.
125. R.Despotović, N. Filipović, H. Füredi-Milhofer, *Calcif. Tissue Res.* **18** (1975) 13-26.
126. S. R. Khan, *Nephron Exp. Nephrol.* **98** (2004) 55-60.
127. V. Kumar, G. Farell i J. C. Lieske, *J. Urol.* **170** (2003) 221-225.
128. V. Kumar i J. C. Lieske, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **15** (2006) 374-380.
129. L. C. Isaacson, *Invest. Urol.* **6** (1969) 356-363.
130. J. D. Miller, A. D. Randolph i G. W. Drach, *J. Urol.* **117** (1977) 342-345.

131. L. M. Barker, S. L. Pallante, H. Eisenberg, J. A. Joule, G. L. Becker i J. E. Howard, *J. Urol.* **12** (1974) 79-81.
132. M.B. Rose, *Invest.Urol.* **12** (1975) 428-433.
133. P. Karšlon, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1993.
134. L. Strayer, *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1991.
135. STARE, *Software* 10.0 (2009), Mettler-Toledo GmbH.
136. J.C. Lieske, W.J. Tremaine, C. De Simone, H. M. O'Connor, X. Li, E.J. Bergstralh i D.S. Goldfarb, *Kidney Int.* **78** (2010) 1178-1185.
137. T. Jung, W.-S. Kim i C. K. Choi, *Mater. Sci. Eng. C* **24** (2004) 31-33.
138. J. Kaloustian, T. F. El-Moselhy i H. Portugal, *Clin. Chim. Acta* **334** (2003) 117-129.
139. T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shmizu, T. Hatta, *Mineral. Mag.* **69** (2005) 77-88.
140. M. Berenyi i G. Liptay, *J. Therm. Anal.* **3** (1971) 437-443.
141. J. M. Ouyang, L. Duan i B. Tieke, *Langmuir* **19** (2003) 8980-8985.
142. M. E. Laurence, P. Levillain, B. Lacour i M. Daudon, *Clin. Chim. Acta* **298** (2000) 1-11.
143. E. K. Girija, S. C. Latha, S. N. Kalkura i C. Subramanian, *Mater. Chem. Phys.* **52** (1998) 253-257.
144. Q. D. Nguyen i M. Daudon, *Elsevier Science*, Paris, 1997.
145. L. Tunik, H. Füredi-Milhofer i N. Garti, *Langmuir* **14** (1998) 3351-3355.
146. S. Chaiyarit, S. Mungdee i V. Thongboonkerd, *Anal. Methods* **2** (2010) 1536-1541.
147. K.S. Suslick, G.J. Price, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **29** (1999) 295-326.
148. A. Gedanken, *Ultrason. Sonochem.* **11** (2004) 47-55.
149. D. Kralj, Lj. Brečević i A.E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **143** (1994) 269-276.
150. R. M. Santos, P. Ceulemans i T. Van Gerven, *Chem. Eng. Res. Des.* **90** (2012) 715-725.
151. D.R. Kelly, S. J. Harrison, S. Jones, M. A. Masood i J. J. G. Morgan, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 2689-2690.
152. E. Dalas, *J. Cryst. Growth* **222** (2001) 287-292.
153. H. Choi, N. Enomoto i Z. Nakagawa, *J. Mater. Sci.* **29** (1994) 3239-3242.
154. N. Enomoto, T. Sung i Z. Nakagawa, *J. Mater. Sci.* **27** (1992) 5239-5243.
155. D. Zhang, L. Qi, J. Ma i H. Cheng, *Chem. Mater.* **14** (2002) 2450-2457.
156. V. Fischer, K. Landfester i R. Munoz-Espí, *Cryst. Growth Des.* **11** (2011) 1880-1890.
157. K. Yu, X.-L. Wen, Y.-M. Ding i J.-M. Ouyang, *Adv. Mater. Technol. Application* (2017) *on line*.
158. S. Atanassova, K. Neykov i G. Gutzow, *J. Cryst. Growth* **212** (2000) 233-238.
159. E. Ruiz-Agudo, A. Burgos-Cara, C. Ruiz-Agudo, A. Ibañez-Velasco, H. Cölfen i C. Rodríguez-Navarro, *Naturecommunications* **8** (2017) 768.
160. D. J. Kok, S. E. Papapoulos i O. L. Bijvoet, *Kidney. Int.* **37** (1990) 51-56.
161. S. Farmanesh, J. Chung, R. D. Sosa, J. H. Kwak, P. Karande i J. D. Rimer, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 12648-12657.
162. S. T. Sargut, P. Sayan i B. Kiran, *Cryst. Res. Technol.* **45** (2010) 31-38.
163. J.-J. Li, J.-F. Xue i J.-M. Ouyang, Hindawi Pub. Corp. *Bioinorg. Chem. Applicat.* (2013) *on line*.
164. M. Sikirić, N. Filipović-Vinceković, V. Babić-Ivančić, N. Vidović i H. Füredi-Milhofer, *J. Coll. Interface Sci.* **212** (1999) 384-389.
165. P. Sayan, S. Titiz Sargut i B. Kiran, *Cryst. Res. Technol.* **44** (2009) 807-817.
166. W.-S. Cho, F. Thielbeer, R. Duffin, E.M.V. Johansson, I.L. Megson, W. MacNee, M. Bradley, K. Donaldson, *Nanotoxicology* **8** (2014) 202-211.

167. Z.-W. Zhao, Y.-M. Xia, J.-Z. Xue, Q.-S. Wu, *Cryst. Growth Des.* **14** (2013) 450-458.
168. M.-D. Damaceanu, M. Mihai, I. Popescu, M. Bruma i S. Schwarz, *React. Funct. Polym.* **72** (2012) 635-641.
169. M. J. Semins i B. R Matlaga, *Ther. Adv. Urol.* **2** (2010) 3-9.
170. P. J. Christo, L. Manchikanti, X. Ruan, M. Bottros, H. Hansen, D. R. Solanki, A. E. Jordan i J. Colson, *Pain. Physician.* **14** (2011) 123-143.
171. M. Carvalho i M. A. Vieira, *International Braz. J. Urol.* **30** (2004) 205-209.
172. W. G. Robertson, M. Peacock i B. E. C. Nordin, *Clinical Sci.* **40** (1971) 365-374.
173. B. Finlayson, *Kidney Int.* **13** (1978) 344-60.
174. H. Füredi-Milhofer, M. Marković, Lj. Komunjer, B. Purgarić i V. Babić-Ivančić, *Croat. Chem. Acta* **50** (1977) 139-154.
175. B. Tomašić i G. H. Nancollas, *J. Cryst. Growth* **46** (1979) 355-361.
176. G. Bihl i A. Meyers, *Lancet* **258** (2001) 651-656.
177. B. Tomažić i G. H. Nancollas, *J. Urol.* **128** (1982) 205-208.
178. C. Berg i H. G. Tiselius, *Eur. Urol.* **12** (1986) 59-61.
179. I. Hojgaard, A. M. Fornander, M. A. Nilsson i H. G. Tiselius, *Scand. J Urol. Nephrol.* **32** (1998) 311-319.
180. I. Hojgaard, A. M. Fornander, M. A. Nilsson i H. G. Tiselius, *Urol. Res.* **27** (1999) 409-416.
181. Y. Shen, S. Li, A. Xie, W. Xu, L. Qiu, H. Yao, X. Yu i Z. Chen, *Coll.Surf. B; Biointerfaces* **58** (2007) 298-304.
182. Y. Shen, W. Yue, A. Xie, S. Li i Z. Qian, *Coll.Surf. B; Biointerfaces* **45** (2005) 120–124.
183. T. Jung, X. Sheng, C. K. Choi, W.-S. Kim, J. A. Wesson i M. D. Ward, *Langmuir* **20** (2004) 8587-8596.
184. S. R. Qiu, A. Wierzbicki, E. A. Salter, S. Zepeda, C. A. Orme, J. R. Hoyer, G. H. Nancollas, A. M. Cody i J. J. De Yoreo, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 9036-9044.
185. S. Guo, M. D. Ward i J.A. Wesson, *Langmuir* **18** (2002) 4284-4291.
186. G.M.S. Shafei i N. A. Moussa, *J. Colloid. Interface. Sci.* **238** (2001) 160-168.
187. A. R. Izatulina, Yu. O. Punin i O. A. Golovanova, *J. Struct. Chem.* **55** (2014) 41-47.

## **7. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA**

**POPIS OZNAKA I SIMBOLA**

aq	vodena faza
eq	ravnoteža
i	ionska vrsta, inicijalno, početno
m	molarno

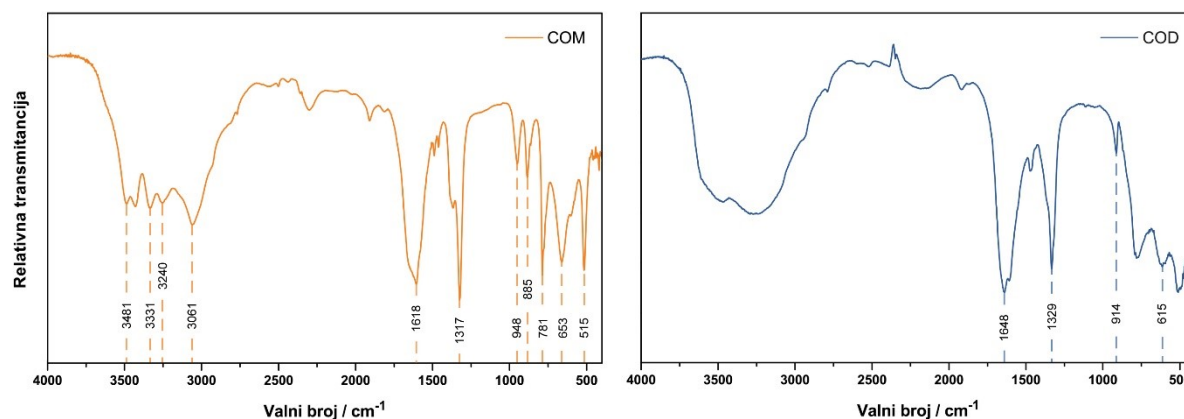
**POPIS KRATICA**

AA	aminokiselina
Ala	alanin
Asp	asparaginska kiselina
Bez AA	bez aminokiselina
CaOX	kalcijev oksalat
COD	kalcijev oksalat dihidrat
COM	kalcijev oksalat monohidrat
COT	kalcijev oksalat trihidrat
Cys	cistein
FT-IR	infracrvena spektroskopija
Gly	glicin
His	histidin
mag	magnetsko miješanje
meh	mehaničko miješanje
Phe	fenilalanin
PXRD	rengenska difrakcija praha
TGA	termogravimetrijska analiza
uzv	ultrazvučno miješanje



## **8. DODATAK**

## 8.1. Infracrveni spektri standarda COM i COD

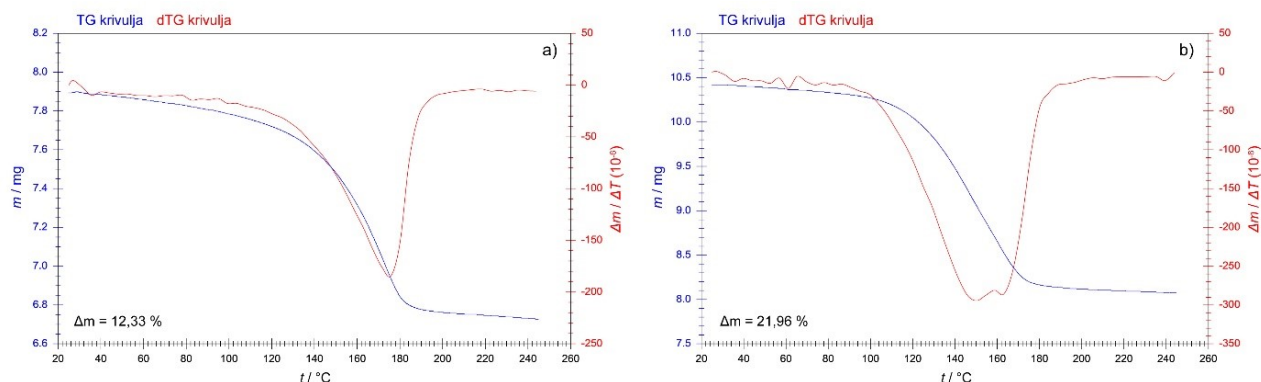


Slika 51. FT-IR spektri standarda COM i COD

Tablica 13. Karakteristične vrpce COM i COD standarda i njihova asignacija u IR spektru

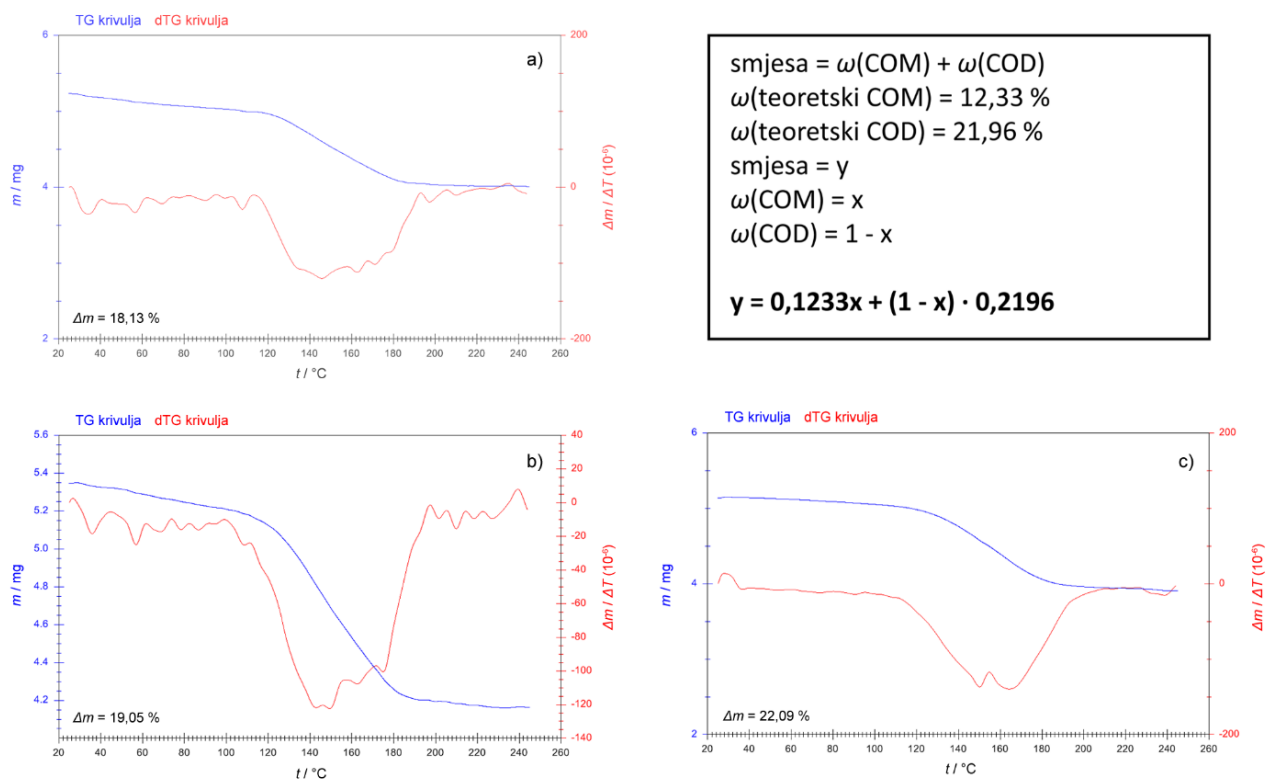
$\nu/\text{cm}^{-1}$		
COM	COD	Asignacija
3481 3331 3240 3061		asimetrično i simetrično istežanje koordinirane vode (O-H istežanje)
1618	1648	asimetrično karbonilno istežanje $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1317	1329	simetrično karbonilno istežanje i metal-karbonilno istežanje $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
948 885	914	H-O-H svijanjanje
781 653	615	O-C-O asimetrične njihanje
515		O-C-O asimetrične mahanje

## 8.2. Termogravimetrijske krivulje standarda COM i COD

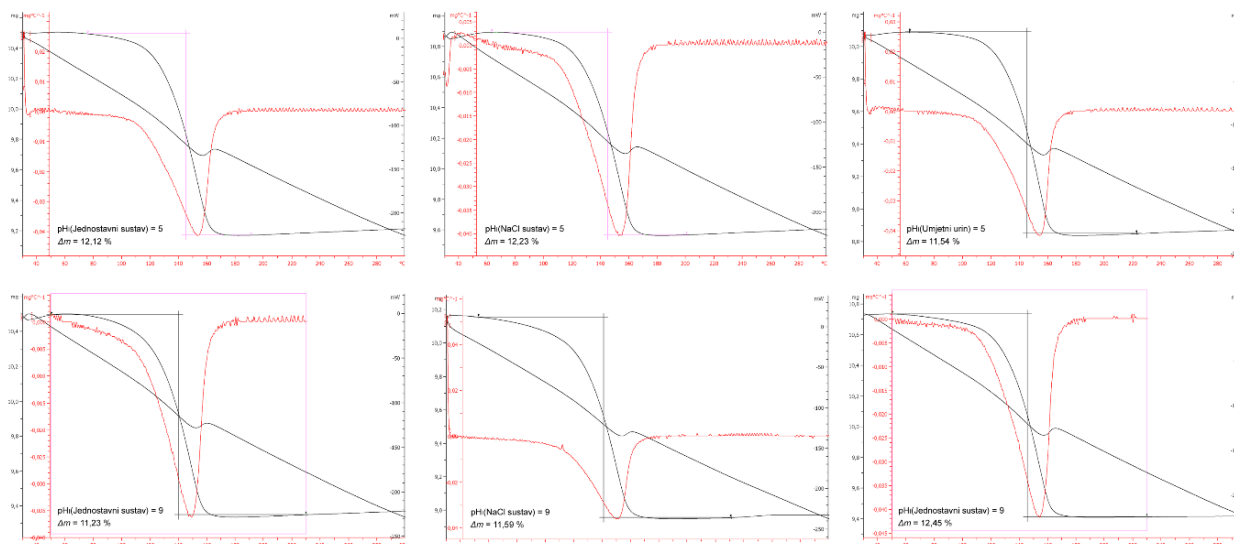


Slika 52. Termogravimetrijske krivulje (plavo) i prva derivacija termogravimetrijskih krivulja (crveno) standarda COM i COD ( $\Delta m$  označava teoretsku vrijednost)

### 8.2.1. Termogravimetrijske krivulje kalcijeva oksalata

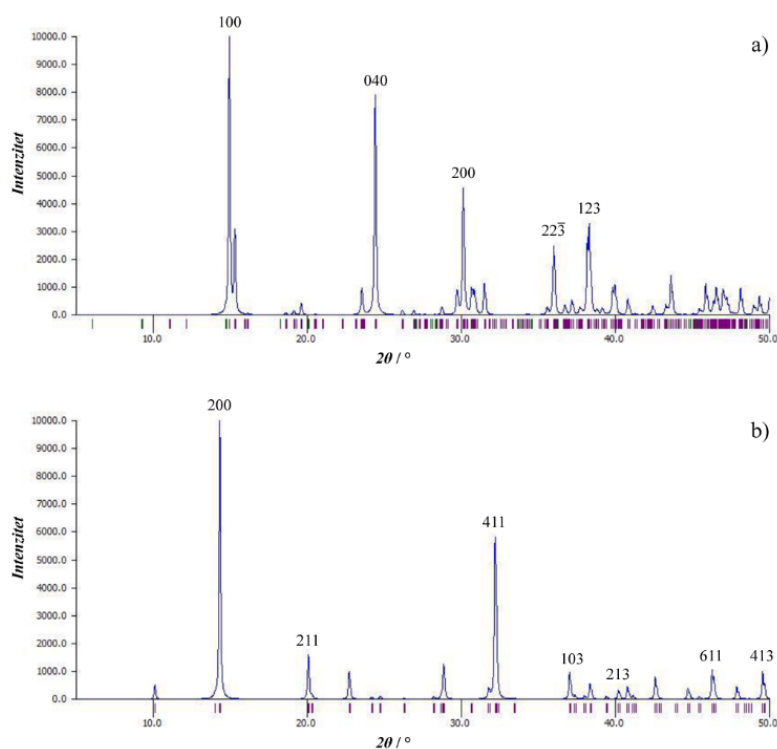


Slika 53. Termogravimetrijske krivulje (plavo) i prva derivacija termogravimetrijskih krivulja (crveno) pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$  za tri vrste miješanja a) meh, b) mag i c) uzv ( $\Delta m$  označava eksperimentalnu vrijednost). Prikaz izračuna udjela COM i COD u uzorcima.



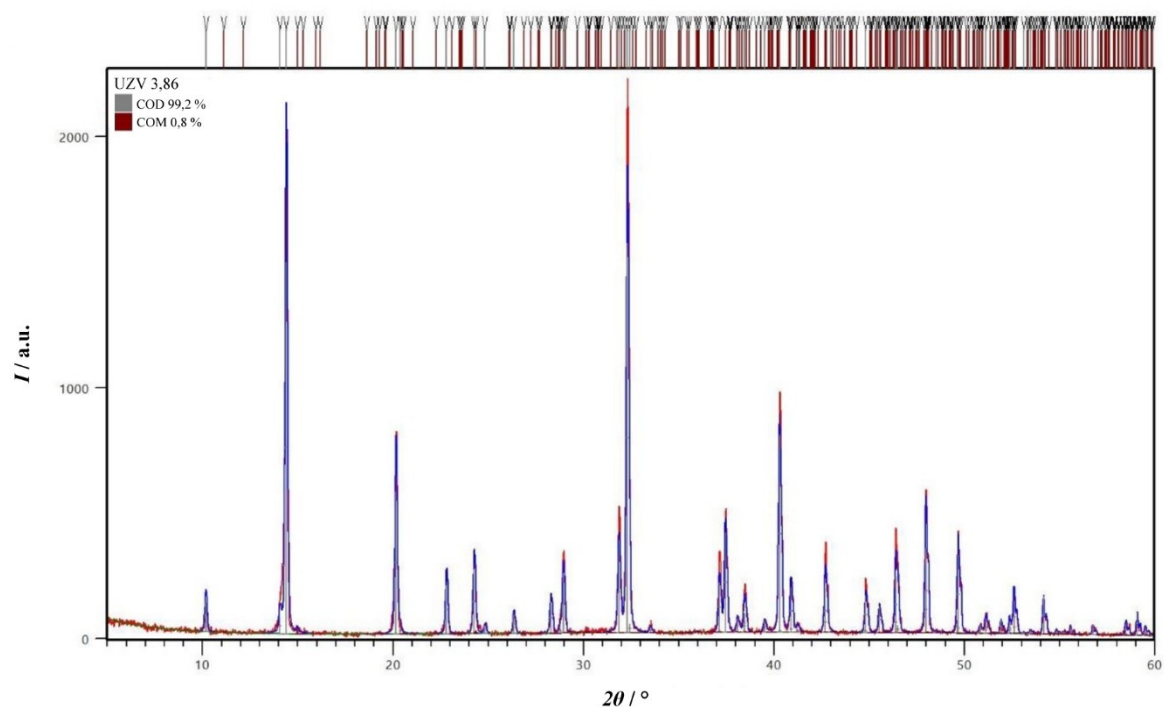
Slika 54. Termogravimetrijske i DSC krivulje (crno) i prva derivacija termogravimetrijskih krivulja (crveno) ( $\Delta m$  označava eksperimentalnu vrijednost).

### 8.3. Rentgenski difraktogrami standarda COM i COD

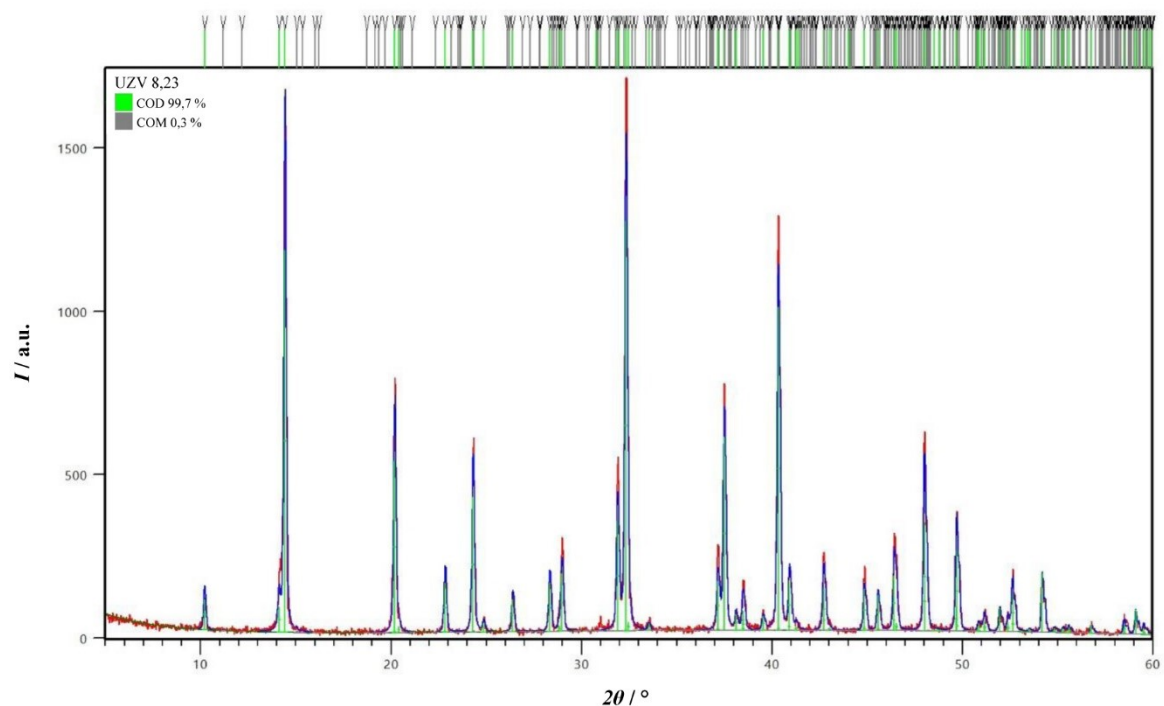


Slika 55. Rentgenski difraktogrami standarda a) COM i b) COD (označene ravnine prema kartici 20-231 za COM i prema kartici 17-541 za COD)

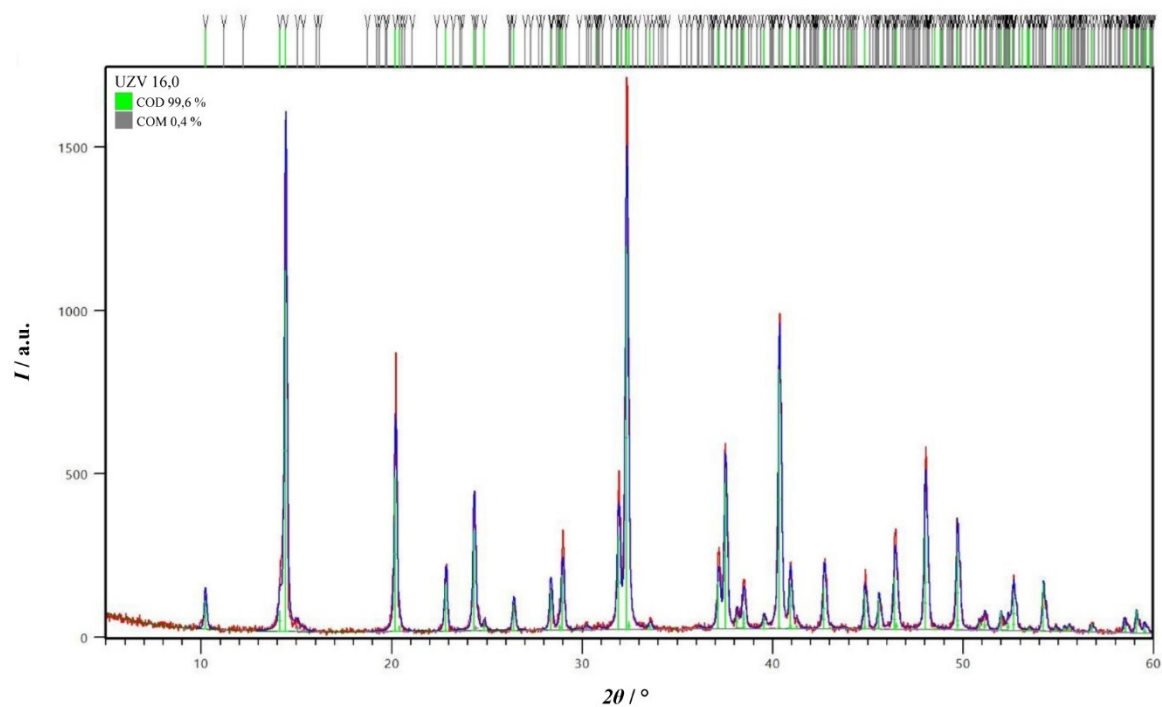
### 8.3.1. Rentgenogrami kalcijeva oksalata



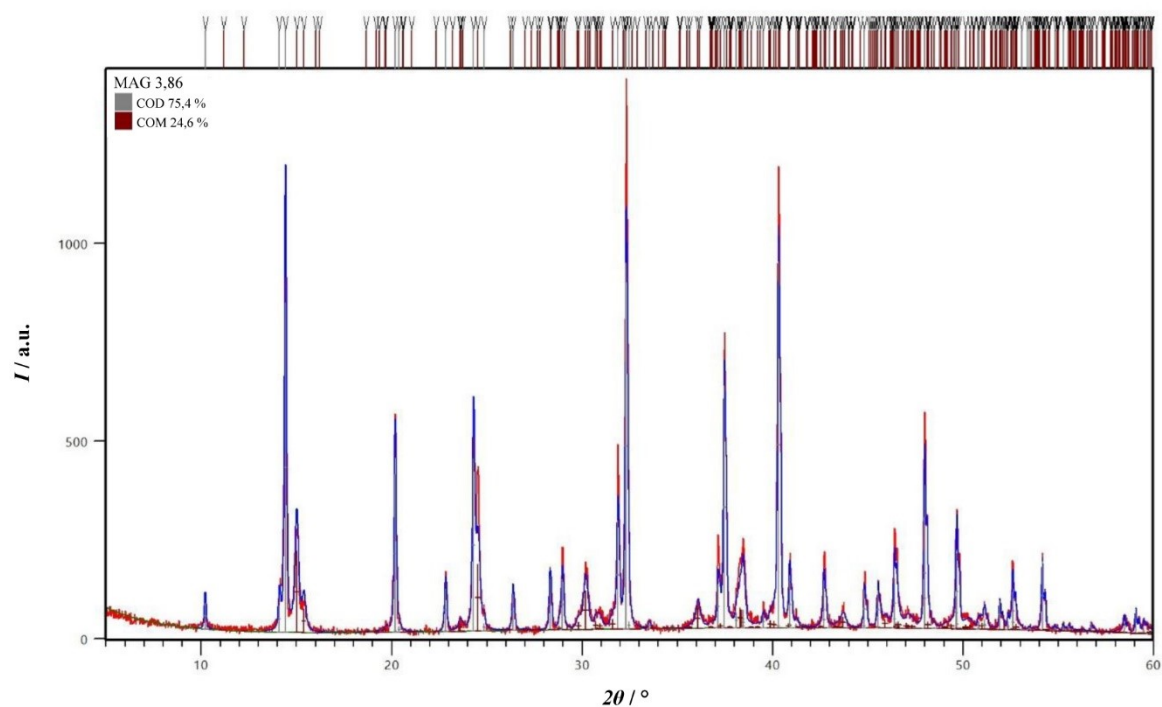
Slika 56. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz uzv sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .



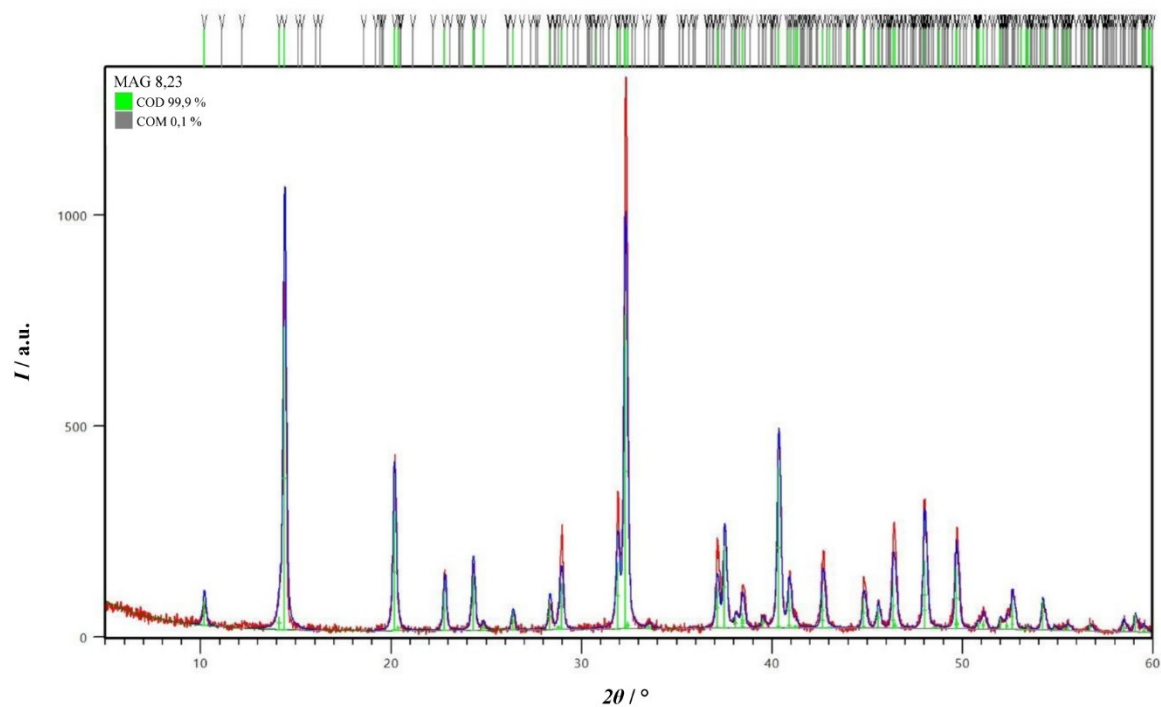
Slika 57. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz uzv sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8,23$ .



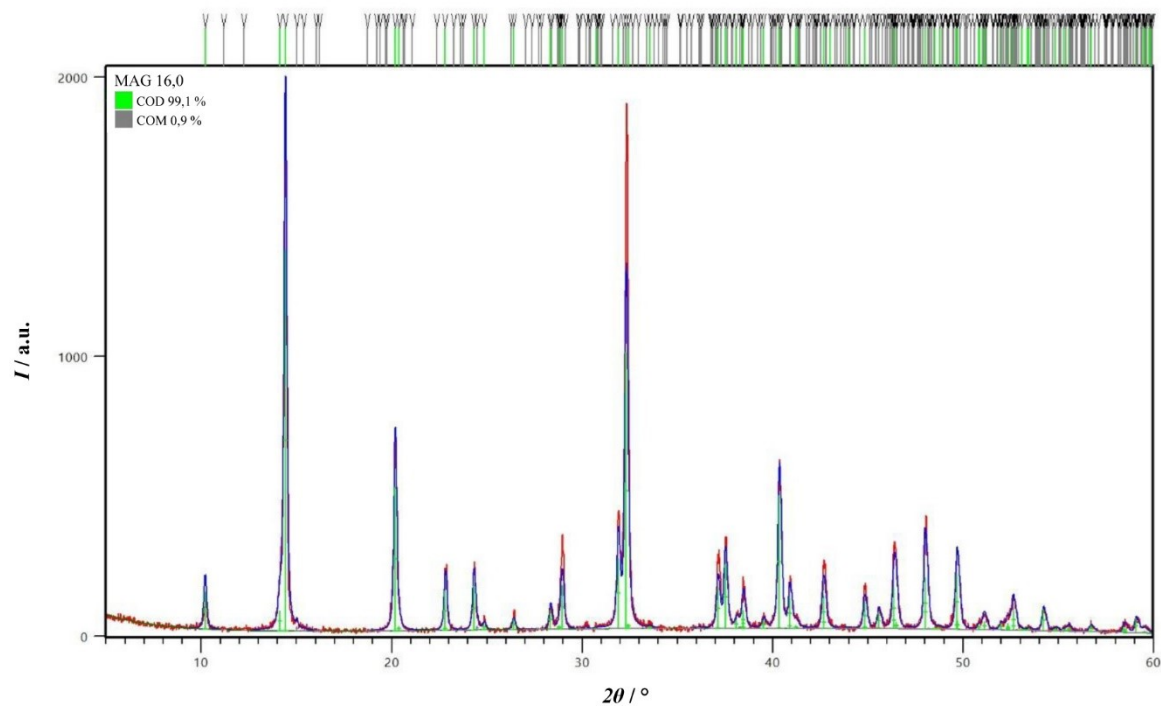
Slika 58. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz uzv sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,0$ .



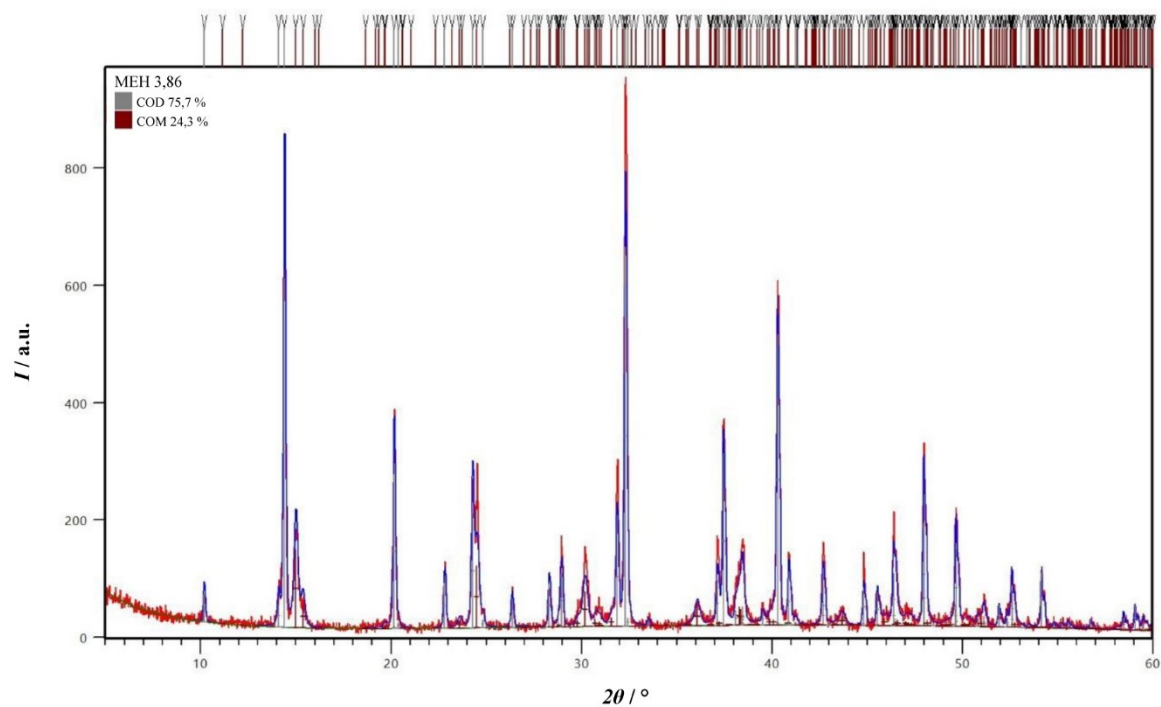
Slika 59. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz mag sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .



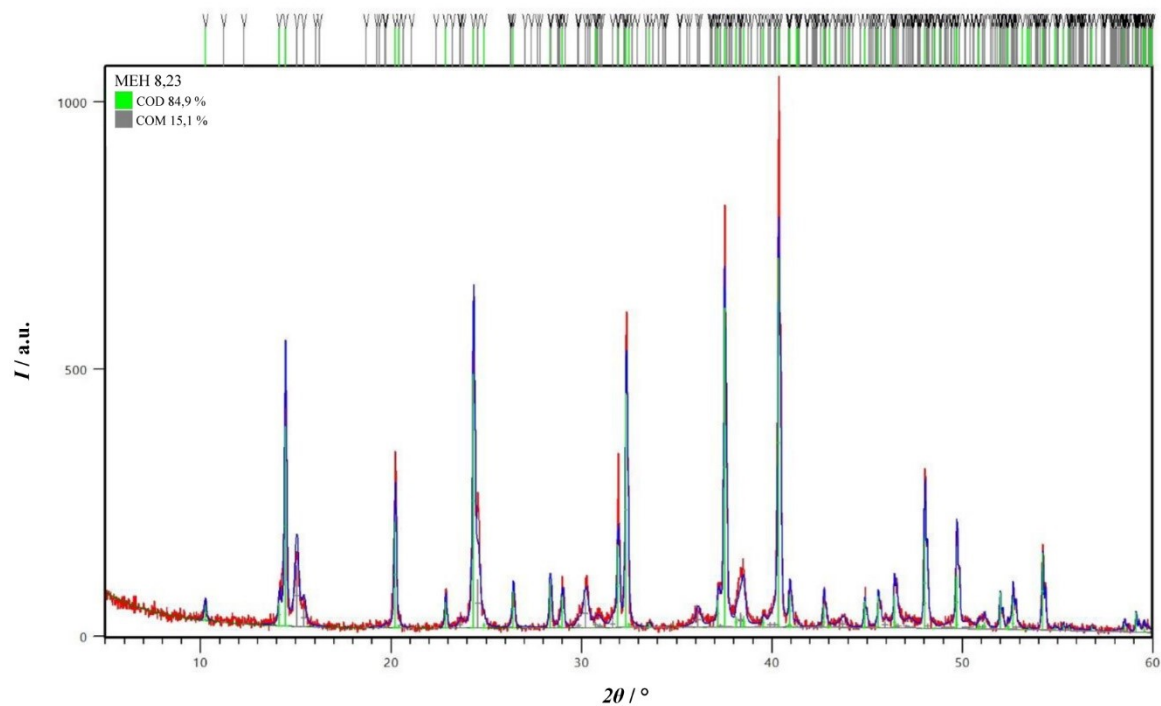
Slika 60. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz mag sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8,23$ .



Slika 61. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz mag sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,0$ .

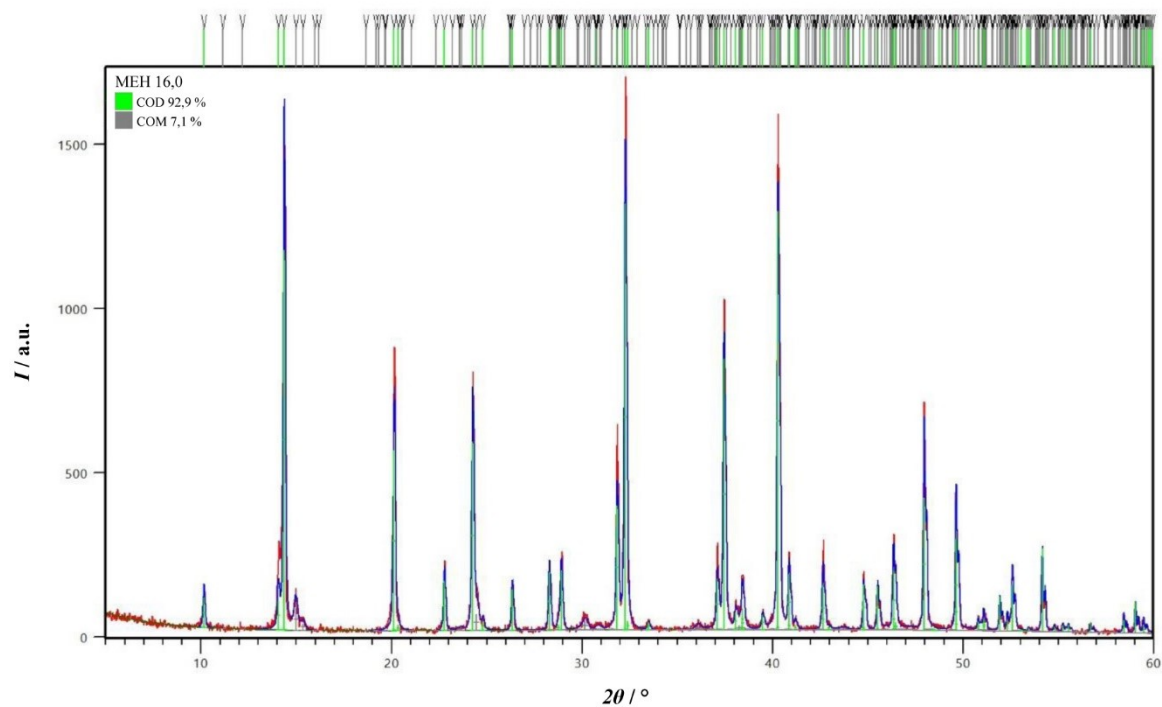


Slika 62. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz meh sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ .

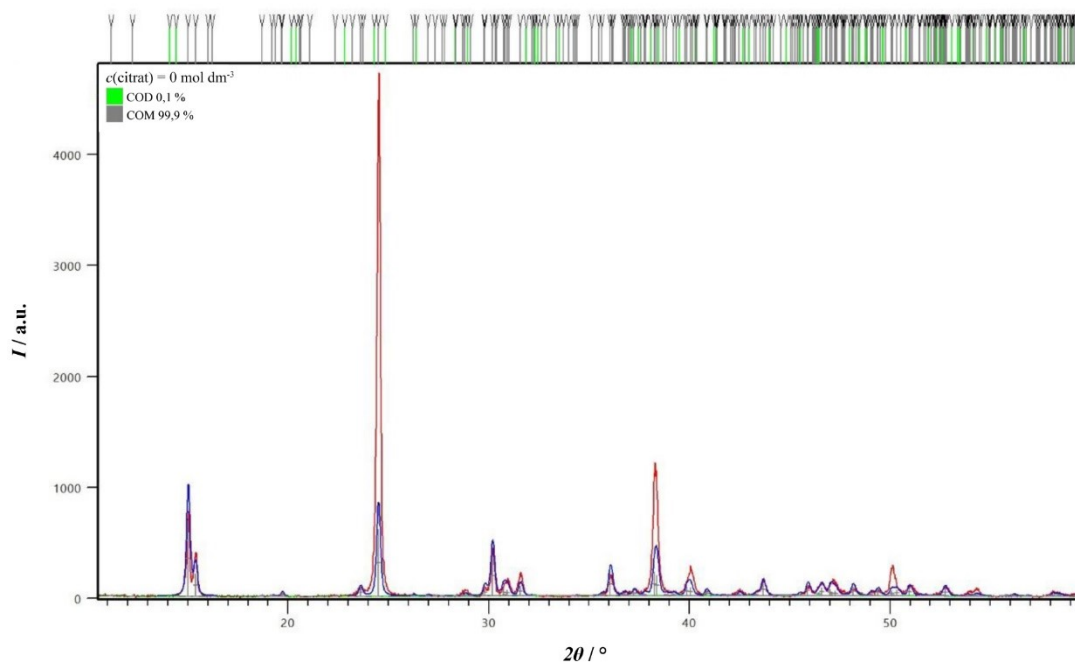


Slika 63. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz meh sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 8,23$ .

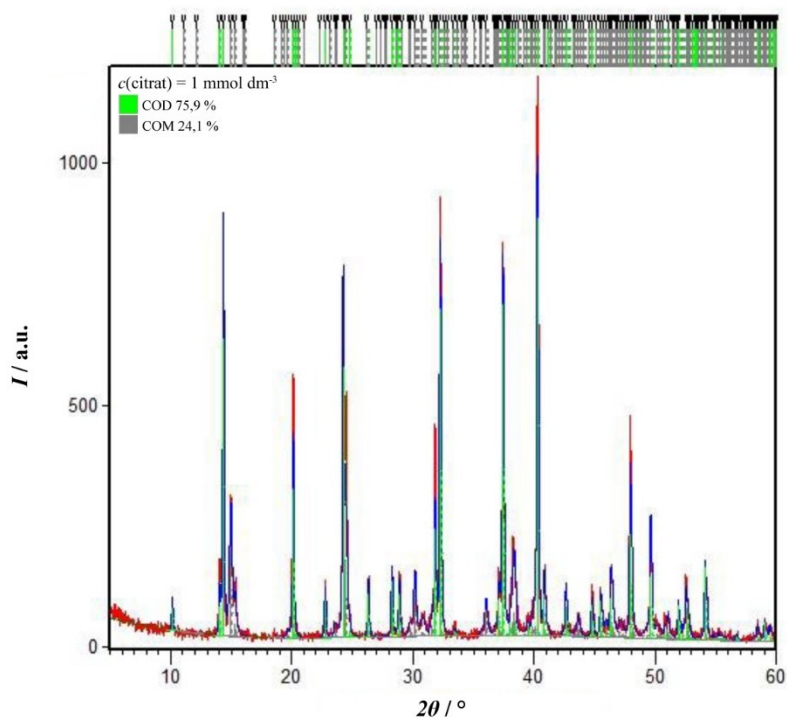




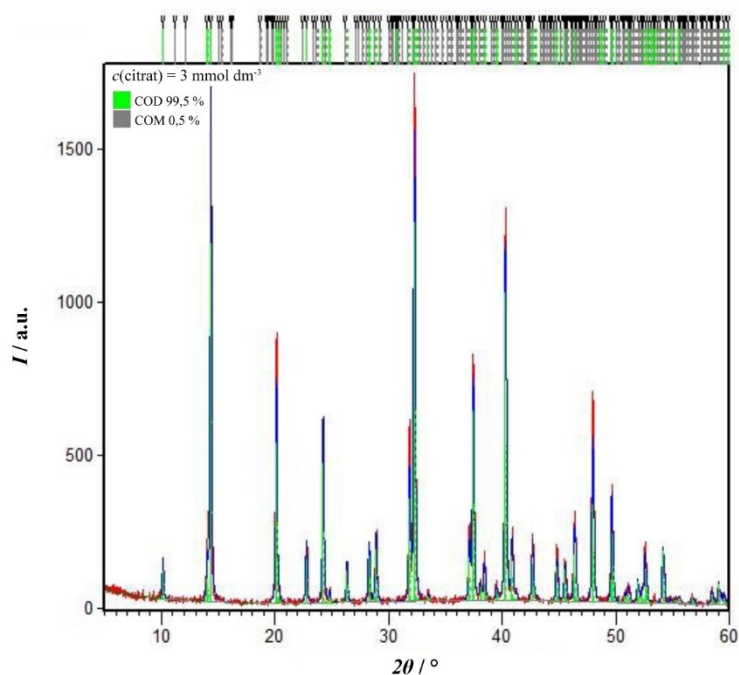
Slika 64. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka iz meh sustava pri omjeru  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 16,0$ .



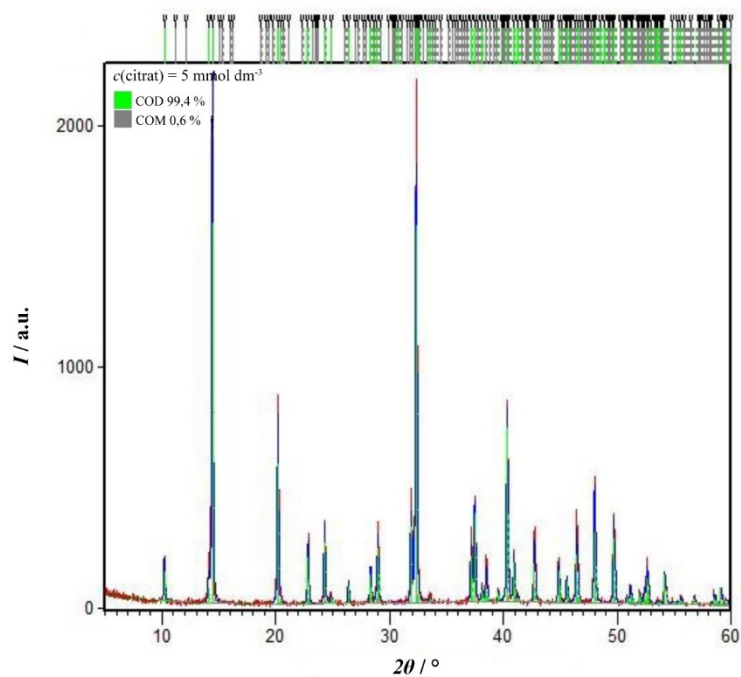
Slika 65. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3} = 0,0$ .



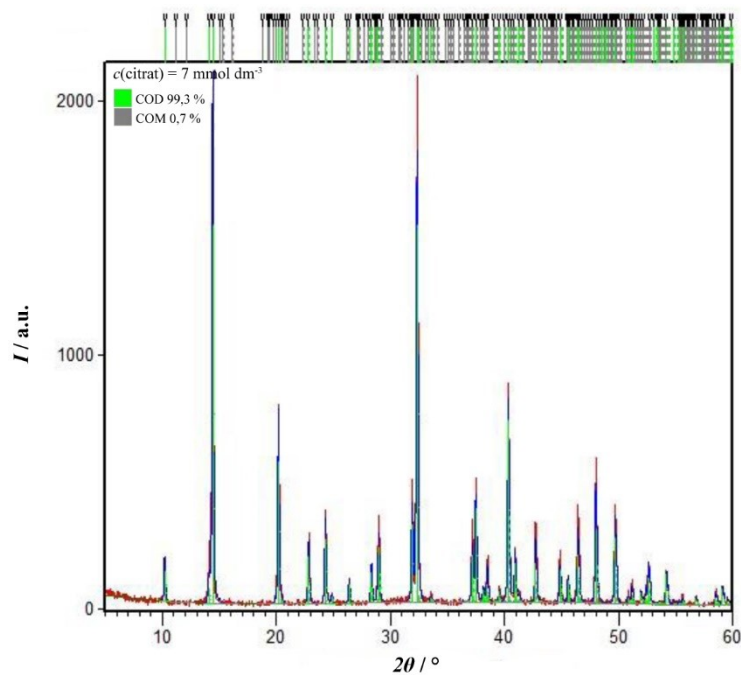
Slika 66. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3} = 1,0$ .



Slika 67. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3} = 3,0$ .



Slika 68. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3} = 5,0$ .

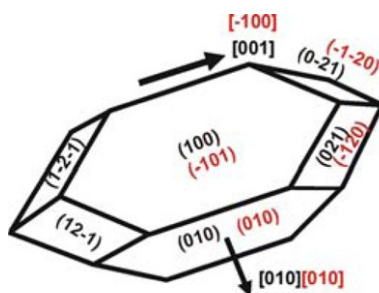


Slika 69. Rietveldova analiza difraktograma praha uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 3,86$ ,  $c(\text{citrat})/\text{mmol dm}^{-3} = 7,0$ .

Tablica 14. Kvantitativna analiza udjela COM i COD rentgenskom difrakcijom

Intenzitet pika	$2\theta / ^\circ$	Ala	Asp	Bez AA	Cys	Gly	His	Phe	Ser
COM	14,88	915	700	743	595	226	723	371	587
COD	14,28	174	235	230	425	414	303	677	353
Intenzitet pozadine	$2\theta / ^\circ$	Ala	Asp	B	Cys	Gly	His	Phe	Ser
COM I1	14,88	785	570	613	465	96	593	241	457
COD I2	14,28	39	100	95	290	279	168	542	218
Referentni intenzitet									
COM R1	1,13								
COD R2	1,75								
R1/R2	0,645714								
I1/I2		20,128205	5,7	6,4526316	1,6034483	0,344086	3,5297619	0,4446494	2,0963303
(I1/I2) / (R1/R2)		31,171999	8,8274336	9,9930135	2,4832164	0,5328766	5,4664454	0,6886164	3,2465292
		Ala	Asp	Bez AA	Cys	Gly	His	Phe	Ser
<b>w (COM) / %</b>		97	90	91	71	35	85	41	76

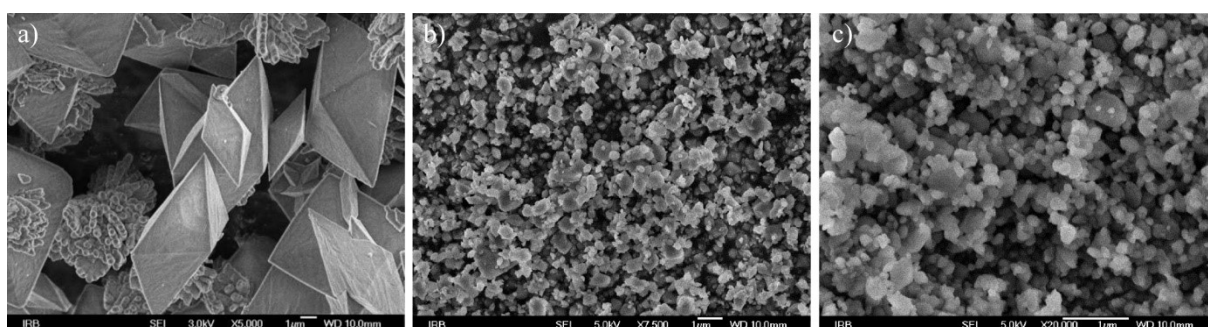
#### 8.4. Morfološka karakterizacija kalcijeva oksalata



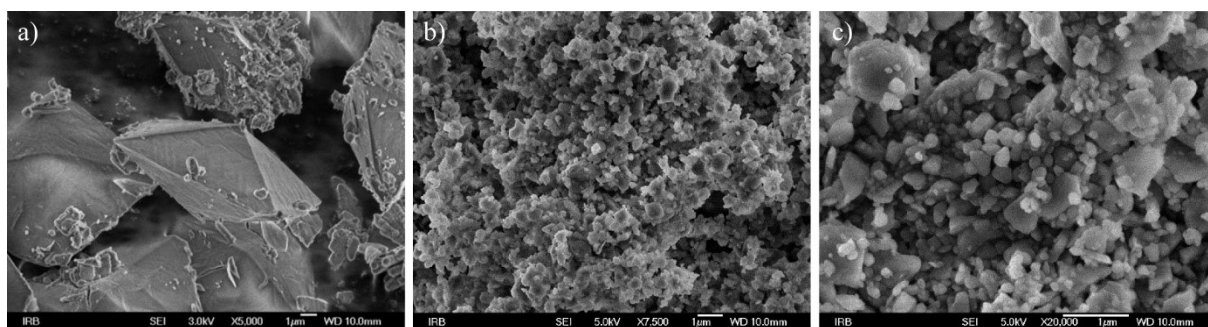
Slika 70. Morfologija COM kristala s karakterističnim Millerovim indeksima i smjerom rasta kristala (crni brojevi odgovaraju Tazzoli notaciji (prostorna grupa  $P2_1/c$ ), a crveni Deganello notaciji (prostorna grupe  $I2/m$ )).<sup>54</sup>



Slika 71. Snimke svjetlosnim mikroskopom uzorka u uzv sustavu:  $c(\text{citrat})/ \text{mmol dm}^{-3} = 0,0$  omjera  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ : a) 3,86, b) 8,23 i c) 16,0.



Slika 71. Utjecaj različitih omjera  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  na veličinu i morfologiju COD u mag sustavu: a) 3,86, b) 8,23, c) 16,00.



Slika 73. Utjecaj različitih omjera  $c(\text{Ca}^{2+})/c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$  na veličinu i morfologiju COD u meh sustavu: a) 3,86, b) 8,23, c) 16,00.

## **9. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:**

Ime i prezime: **Anamarija Stanković**, prof. biologije i kemije, asistent  
Adresa: Vijenac Augusta Cesarca 8, 31000 Osijek  
Zaposlena: Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Ulica cara  
Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek  
email: ster.anamarija@gmail.com

Rođena sam 5. rujna 1985. godine u Osijeku. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u Općoj Gimnaziji u Osijeku, gdje sam i maturirala 2004. godine. Iste godine upisala sam na Pedagoškom fakultetu u Osijeku nastavnički smjer Biologije i Kemije gdje sam i diplomirala 2010. u području biokemije te time stekla zvanje profesora kemije i biologije.

2012. zaposlila sam se kao stručna suradnica na Zavodu za opću, anorgansku i fizikalnu kemiju i metodiku kemije, Odjela za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a od travnja 2013. sam u zvanju asistenta. Izvodim kolegije iz područja anorganske kemije.

2013. godine upisujem doktorski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, smjer Anorganska i strukturna kemija.

Područje mog znanstveno-istraživačkog interesa vezano je uz biomineralizaciju, osobito patološku, te obuhvaća proučavanje različitih hidratnih oblika kalcijeva oksalata (kalcijev oksalat monohidrat, kalcijev oksalat dihidrat i kalcijev oksalat trihidrat) te voltametrijske tehnike (ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija) i sinteze kompleksnih spojeva.

Tijekom studiranja dobila sam Rektorovu nagradu (2008) za izniman uspjeh na studiju s prosjekom 4,82, Županijsku stipendiju (2005-2009) te sam bila u 10 % najboljih studenata u generaciji.

Voditeljica sam projekta čije financiranje je potpomogla Zaklada Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Suradnica sam na projektu financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost, te sam suradnica na nekoliko bilateralnih i sveučilišnih projekata. Rezultate svojih istraživanja prezentirala sam na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima (16 skupova) te sam objavila četiri znanstvena (časopisi citirani u WoS i/ili CC bazi) i jedan stručni rad. Autor sam dvaju internih radnih materijala te aktivno sudjelujem u izradi završnih radova na preddiplomskom studiju (9 radova), kao i u promociji znanosti. Član sam Hrvatskog kemijskog društva (HKD) i Hrvatske kristalografske zajednice (HKZ).

**Stručno usavršavanje:**

U periodu od 2014. do 2016. boravila sam na znanstvenom usavršavanju na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za procese taloženja.

**Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima**

**1. Šter, Anamarija; Šafranko, Silvija; Bilić, Katarina; Marković, Berislav; Kralj, Damir.**  
The effect of hydrodynamic and thermodynamic factors and the addition of citric acid on the precipitation of calcium oxalate dihydrate, Urolithiasis (2017) (prihvaćen za objavljivanje)

**2.** Medvidović-Kosanović, Martina; **Stanković, Anamarija**; Jakobek, Lidija; Krivak, Petra; Mađarić, Rebecca.

Electrochemical and spectrophotometric determination of total polyphenol content in Croatian apple varieties, *Croatica chemica acta* 90 (2017) 129-134 (članak, znanstveni).

**3.** Balić, Tomislav; Matasović, Brunislav; Marković, Berislav; **Šter, Anamarija**; Štivojević, Marija; Matković-Čalogović, Dubravka.

Synthesis, structural characterization and extraction studies of 17-, 18-, 19- and 20-membered N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-donor macrocyclic Schiff bases, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 3 (2016) 217-226 (članak, znanstveni).

**4.** Medvidović-Kosanović, Martina; Balić, Tomislav; Marković, Berislav; **Šter, Anamarija**. Comparison of the Electrochemical Properties of Two Structurally Different Novel bis-Schiff Bases, *International Journal of Electrochemical Science* 10 (2015) 63-83 (članak, znanstveni).

### Znanstveni radovi u drugim časopisima

**1. Šter, Anamarija**; Balić, Tomislav; Marković, Berislav; Medvidović-Kosanović, Martina. Electrochemical characterization of (1E)-1-N- {[4-(4- {[E)-N-(3- aminophenyl) carboxyimidoyl]phenoxy}butoxy) phenyl] methylidene}benzene -1,3-diamine *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 43 (2014) 41-44 (članak, znanstveni).

### Ostali radovi u drugim časopisima

**1.** Senka Majić, Rosemary Vuković, **Anamarija Šter**, Elizabeta Has-Schön. ENZIMATSKO ODREĐIVANJE GLIKOLITIČKOG POTENCIJALA – POUZDANA METODA ZA PREDVIĐANJE KVALITETE MESA, *Krmiva*, časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme 52 (2010) 353-358 (članak, stručni).

### Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

**1.** Pišonić, Marina; **Stanković, Anamarija**; Medvidović- Kosanović, Martina. Electrochemical characterization of rutin in different electrolytes // *Proceedings of the International Conference 16th Ružička days "Today Science - Tomorrow Industry"* Jukić, Ante, Šubarić, Drago (ur.). Osijek i Zagreb: Croatian Society of Chemical Engineers, Faculty of Food Technology Osijek, J.J. Strossmayer University of Osijek (2017) 19-24 (poster, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

**2. Šter, Anamarija**; Medvidović-Kosanović, Martina; Balić, Tomislav; Ćurić, Iva; Mihaljević-Jurić, Paula. Electrochemical characterization of (1E)-1-N- {[4-(4- {[E)-N-(4- aminophenyl) carboxyimidoyl] phenoxy}butoxy) phenyl]methylidene}benzene-1, 4-diamine // *Proceedings of International Scientific and Professional Conference 15th Ružička Days "Today Science - Tomorrow Industry"* (2014) Šubarić Drago, Jukić Ante (ur.) Osijek, (2015) 32-40 (poster, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

**1.** Drulak, Mateja; **Stanković, Anamarija**; Medvidović - Kosanović, Martina.



UTJECAJ pH NA NASTAJANJE KOMPLEKSA L-HISTIDINA I BAKRA, XII. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA ; KNJIGA SAŽETAKA, Vrsaljko Domagoj, Dejanović Igor, Žižek Krunoslav (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa; Croatian Society of Chemical Engineers (2018) 155-155 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

**2.** Drulak, Mateja; **Stanković, Anamarija**; Medvidović – Kosanović, Martina; Sak Bosnar, Milan.

Kompleksi bakra sa histidin dipeptidom karnozinom, Simpozij studenata kemičara 4, Eraković Mihael, Kalebić Demian, Rinkovec Tamara, Štrbac Petar, Talajić Gregor, Usenik Andrea (ur.) Zagreb: PMF, Kemijski odsjek, HKD (2017) 15-15 (predavanje, domaća recenzija, sažetak).

**3.** Medvidović-Kosanović, Martina; **Stanković, Anamarija**; Jakobek, Lidija; Krivak, Petra; Mađarić, Rebecca.

Electrochemical and spectrophotometric determination of total polyphenol content in Croatian ancient apple varieties, 7th ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry, Book of Abstracts, Sačer Denis (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, FKIT, (2017) 25 (predavanje, sažetak, znanstveni).

**4.** Šafranko, Silvija; **Stanković, Anamarija**; Kontrec, Jasminka; Marković, Berislav; Kralj, Damir.

Urolitijaza i nastajanje kalcij oksalatnih kamenaca - Istraživanja u jednostavnom modelnom sustavu i u sustavu umjetnog urina u uvjetima hiperoksalurije, 12. Osječki urološki dani 5. Osječki nefrološki dani 4. Sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije, Pavlović, Oliver (ur.). Osijek (2017) (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

**5.** Šafranko, Silvija; **Stanković, Anamarija**; Marković, Berislav; Kralj, Damir.

Taloženje kalcijevih oksalata u uvjetima hiperoksalurije, Simpozij studenata kemičara 4, Eraković Mihael, Kalebić Demian, Rinkovec Tamara, Štrbac Petar, Talajić Gregor, Usenik Andrea (ur.) Zagreb: PMF, Kemijski odsjek, HKD (2017) 27-27 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

**6.** **Stanković, Anamarija**; Kontrec, Jasminka; Njegić Džakula, Branka; Maltar-Strmečki, Nadica; Lyons, Daniel Mark; Marković, Berislav; Kralj, Damir.

The influence of amino acids relevant for pathological biomineralization on the precipitation of calcium oxalate monohydrate, Book of abstracts, 25th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers (25HSKIKI), Poreč, 19.-22. 04. 2017. Šantić Ana, Đaković Marijana (ur.). Poreč : HKD/CCS, (2017) 197-197 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

**7.** Vesna, Babić-Ivančić; Maja, Dutour Sikirić; **Anamarija, Stanković**; Silvija, Šafranko.

Microscopy in Urolithiasis Research, 13th Multinational Congress on Microscopy, Gajović, Andreja, Weber Igor, Kovačević Goran, Čadež Vida, Šegota Suzana, Vidoš Ana (ur.). Zagreb: Ruđer Bošković Institute and Croatian Microscopy Society (2017) 472-472 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

**8.** **Šter, Anamarija**; Kontrec, Jasminka; Marković, Berislav; Kralj, Damir.

Taloženje kalcijeva oksalata dihidrata, Prvi simpozij studenata doktorskih studija PMF. (poster, sažetak, znanstveni).

- 9.** Jakobek, Lidija; Krivak, Petra; Medvidović Kosanović, Martina; **Šter, Anamarija.** Dihydrochalcones in old apple varieties from Croatia, 16th Ružička days "TODAY SCIENCE-TOMORROW INDUSTRY", Jukić Ante (ur.). Zagreb: Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Faculty of Food Technology Osijek, Croatian Society of Chemical Engineers, (2016) 71 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 10.** Mađarić, Rebecca; **Šter, Anamarija;** Krivak, Petra; Jakobek, Lidija; Medvidović-Kosanović, Martina.  
Electrochemical determination of total polyphenols content in apple peel extracts, Natural resources green technology & sustainable development 2, Book of abstracts /Radojčić Redovniković Ivana, Radošević Kristina, Jakovljević Tamara, Stojaković Renata, Gaurina Srček Višnja, Erdec Hendrih Dina (ur.). Zagreb: Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb (2016) 69 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 11.** Pišonić, Marina; **Šter, Anamarija;** Medvidović- Kosanović Martina.  
Electrochemical characterization of rutin in different electrolytes, 16th Ružička days "Today science - tomorrow industry" Jukić, Ante (ur.). Osijek : Faculty of Food Technology Osijek; HDKI (2016) 24 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
- 12.** Šafranko, Silvija; Bilić, Katarina; **Šter, Anamarija;** Marković, Berislav; Kralj, Damir.  
Precipitation of calcium oxalate dihydrate, 16th Ružička days "Today science - tomorrow industry", Jukić, Ante (ur.). Osijek: Faculty of Food Technology Osijek ; HDKI (2016) 37 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
- 13.** Šafranko, Silvija; **Šter, Anamarija;** Marković, Berislav; Kralj, Damir.  
Djelovanje hidrodinamičkih i termodinamičkih čimbenika te aditiva na taloženje kalcijeva oksalata, 3. Simpozij Studenata kemičara. Zagreb, Hrvatska: PMF, (2016) 30-30 (predavanje, sažetak).
- 14.** Medvidović-Kosanović, Martina; Blagus Garin, Anita; Perdih, Franc; **Šter, Anamarija;** Marković, Berislav.  
Electrochemical characterisation of dipicolinic acid hydrazides, Book of Abstracts XXIV. Croatian meeting of Chemists and Chemical engineers, Ukić, Š., Bolanča, T. (ur.). Zagreb: HDKI/CSCE, (2015) 122 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
- 15.** **Šter, Anamarija;** Kuliš, Irena; Sesar, Vedrana; Karnoš, Maja; Medvidović-Kosanović, Martina.  
Cyclic and differential pulse voltammetric behaviour of Schiff base complex with copper, Book of Abstracts of XXIV. Croatian meeting of Chemists and Chemical engineers, Ukić, Š., Bolanča, T. (ur.). Zagreb: HDKI/CSCE, (2015) 110 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
- 16.** **Šter, Anamarija;** Medvidović-Kosanović, Martina; Balić, Tomislav; Čurić, Iva; Mihaljević-Jurić, Paula.  
Electrochemical characterization of (1E)-1-N- {[4-(4- {[E]-N-(4-aminophenyl) carboxyimidoyl]phenoxy}butoxy) phenyl] methilidene}benzene -1, 4-diamine, 15th Ružička days "Today science - tomorrow industry", Drago Šubarić (ur.). Osijek: Faculty of Food Technology Osijek ; HDKI (2014) 39 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

