

## Taloženje mineralnih sastojaka mokraćnih kamenaca u modelnim sustavima po kemijskom sastavu sličnim urinima

Maja Dutour Sikirić<sup>1,\*</sup>, Vesna Babić-Ivančić<sup>1,2</sup>, Milenko Marković<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut Ruđer Bošković, Zagreb,

<sup>2</sup>Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J.Strossmayera,

<sup>3</sup>Istraživački centar Paffenbarger, Zaklada američkoga stomatološkog udruženja,  
Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gaithersburg, SAD

Autor za dopisivanje: \*Maja Dutour Sikirić

Laboratorij za sintezu i procese samoorganizacije organskih molekula

Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković

Bijenička c. 54 / 10 000 Zagreb

tel: 01 45 60 941, fax: 01 46 80 245 / e-mail: sikiric@irb.hr

Izvorni znanstveni rad

UDK 612.466.1

Prispjelo: lipanj 2010.

Proces nastajanja mokraćnih kamenaca može se pojednostavljeno promatrati kao taloženje mineralnih sastojaka mokraćnih kamenaca iz kompleksne otopine. To pojednostavljenje omogućuje rasvjetljavanje mehanizama nastajanja kamenaca primjenom fizikalno kemijskih principa nukleacije i rasta kristala u proučavanju otopina sintetskih analoga njihovih glavnih sastojaka. U ovom radu dan je pregled istraživanja taloženja glavnih sastojaka mokraćnih kamenaca (kalcijevih fosfata i oksalata, urata) u jednostavnim (jednokomponentnim) i složenim (dvo- i trokomponentnim) taložnim sustavima provedenih u našoj grupi u posljednjih četrdesetak godina, kao i rezultati preliminarnih istraživanja taloženja u umjetnom urinu.

**Ključne riječi:** Kalcijevi fosfati – kemija, mokraćna; Kalcijev oksalat – kemija, mokraćna; mokraćna kiselina – kemija, mokraćna; Mokraćni kamenci - kemija; Fizičko-kemijski procesi; Taloženje

### Uvod

Iako su mokraćni kamenci pronađeni u ljudskim ostacima starim 7000 godina (1), etiologija njihovoga nastajanja još uvijek nije do kraja razjašnjena. Nastanak i rast mokraćnih kamenaca složeni je proces na koji utječu brojni čimbenici, kako termodinamički, tako i kinetički koji obuhvaćaju brzinu nukleacije, rasta, agregacije i faznih transformacija kristala. Utjecaj tih čimbenika nije nužno jednoznačan. S obzirom da mokraćni kamenci nastaju u otopini kompleksnoga sastava i njihov sastav može biti vrlo različit u usporedbi s drugim normalno i patološki mineraliziranim tkivima u ljudskom organizmu (Tablica 1.), (2).

Urolitijaza se često povezuje s kristalurijom (1,3), pojavom sitnih kristalića u mokraći prezasićenom s obzirom na soli koje se najčešće pojavljuju u sastavu kamenaca (kalcijeve oksalate i fosfate, mokraćnu kiselinu i/ili urate itd.). Pojava kristala u mokraći zamijećena je i kod zdravih osoba no kod njih su kristalići sitniji, manje agregirani, pa zbog toga lakše prolaze kroz mokraćni trakt. Veći kristali ili kristalni agregati mogu se zaustaviti na stijenkama bubrega i tako postati jezgra za sam rast kamenca. Još jedan ključan korak u nastajanju kamenca je zadržavanje kristala u organizmu koje omogućava da kristali narastu dovoljno veliki da se zaustave u bubrežnim tubulama ili da se zadrže na urotelijumu prije izlučivanja. Finlayson i Reid su pokazali da je vrijeme potrebno da kristali CaOx

narastu na veličinu pri kojoj bi bili zadržani u bubrežnim tubulama duže od onog potrebnoga da se izluče u mokraći (4). To znači da pojedinačni kristal nikad ne može postići dovoljnu veličinu da bi bio zadržan samo procesom rasta (5). Proces koji se odvija dovoljno brzo i omogućuje nastajanje dovoljno velikih čestica u nekoliko sekundi jest agregacija (6).

Iz ovoga kratkog uvoda vidljivo je da se nastajanje mokraćnih kamenaca može pojednostavljeno promatrati kao taloženje iz kompleksne otopine. I zaista mnogi fizikalno kemijski principi nukleacije i rasta kristala važni za nastajanje mokraćnih kamenaca, razjašnjeni su proučavanjem otopina sintetskih analoga njihovih glavnih sastojaka (7).

U ovom radu predstaviti ćemo istraživanja taloženja glavnih sastojaka mokraćnih kamenaca u jednostavnim (jednokomponentnim) i složenim (dvo- i trokomponentnim) taložnim sustavima koja su provedena u našoj grupi u posljednjih četrdesetak godina, kao i rezultate preliminarnih istraživanja taloženja u umjetnom urinu. Pri tome pod jednokomponentnim sustavima podrazumijevamo sustave čiji je kemijski sastav takav da u njima mogu nastati soli koje u svom sastavu imaju samo jednu vrstu kationa i aniona (npr. kalcijevi fosfati, kalcijevi oksalati). U dvokomponentnim sustavima mogu nastati dvije vrste soli koje imaju isti kation, ali različite anione (npr. kalcijevi fosfati i oksalati), dok u multikomponentnim sustavima može nastati više vrsta soli.

TABLICA 1.  
Sastav nekih normalno i patološki mineraliziranih tkiva (2)  
TABLE 1.  
Composition of some normal and pathological mineralized tissues in wt. (2)

Tkivo / Tissue	Mineral / Crystalline components	Organska matrica / organic matrix
Kosti, dentin Bone, dentin	Ukupne anorganske tvari / Total inorganic matter 70,9%	Kolagen / Collagen 18,6% Mukopolisaharid-protein kompleks / Mucopolysaccharide-protein complex 0,2 - 0,4% Ostali proteini / resistant protein 1%
	Kalcijevi fosfati / Calcium phosphates:	
	- amorfni / amorphous (ACP)	
	- oktakalcijev fosfat / octacalcium phosphate ( $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , OCP)	
	- nestehiometrijski hidroksi apatit / nonstoichiometric hydroxyapatite (HA)	
	Voda / water 8-10%	
Zubna caklina Tooth enamel	HA 95% Voda / Water 4%	Lipidi / Lipid 0,6% Razni proteini / Heterogeneous protein 0,3 – 0,4 %
Zubni karijes Tooth calculus	Ukupni kalcijevi fosfati / Total calcium phosphates: 80% - kalcijev hidrogenfosfat dihidrat / calcium hydrogenphosphate dihydrate ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , DCPD) - OCP - kalcijev fosfat / tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , TCP) - fluorohidroksiapatit / fluorohydroxyapatite	Protein-polisaharid / Protein- polysaccharide 11-17%
	1. kalcijevi oksalati / calcium oxalates ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ , CaOx): - monohidrat, vevelit / monohydrate, whewellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , COM) - dihidrat, vedelit / dihydrate, weddelite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , COD)	
	2. kalcijevi fosfati / calcium phosphates: - DCPD, OCP, TCP, HA, karbonatni apatiti / carbonate apatite	
Mokraćni kamenci Urinary calculi	3. magnezijevi fosfati / magnesium phosphates: - magnezijev hidrogenfosfat trihidrat, njuberit / magnesium hydrogenphosphate trihydrate, newberiyte ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) - magnezijev amonij fosfat heksahidrat, struvit / magnesium ammoniumphosphate hexahydrate, struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Mukoprotein / Mucoprotein 2,5%
	4. mokraćna kiselina, urati / uric acid, urates: - anhidrid mokraćne kiseline / anhydrous uric acid ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ) - dihidrat mokraćne kiseline / uric acid dihydrate ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) - amonijev hidrogenurat / ammonium hydrogenurate ( $\text{NH}_4\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$ ) - natrijev hidrogenurat monohidrat / sodium hydrogenurate monohydrate ( $\text{NaC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	
	5. cistin, ksantin i dr. / cystin, xanthin and others	

TABLICA 2.  
Sastav umjetnoga urina prema referenci (40)  
TABLE 2.  
Synthetic urine composition after reference (40)

spoj compound	$c / \text{mol dm}^{-3}$
NaCl	0,08
NH <sub>4</sub> Cl	0,025
KCl	0,03
MgCl <sub>2</sub>	0,003
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,015
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01
urea	0,25
NaN <sub>3</sub>	0,001

## 2. Jednokomponentni sustavi

Istraživanja jednostavnih, jednokomponentnih taložnih sustava daju informacije o tome u kojem koncentracijskom području reaktanata, u danim eksperimentalnim uvjetima, nastaje talog određenog sastava i morfologije. Kombinacija tih istraživanja s kinetičkim istraživanjima daje punu informaciju o mehanizmima i uvjetima nastajanja pojedine vrste taloga.

### 2.1. Kalcijevi fosfati

Taložni dijagrami sustava kalcijev klorid – natrijev fosfat (0,15 M NaCl) pri 37°C nakon 24 sata pri pH 7,4 i 6,5 dani su na slici 1., (8). Vidljivo je da se sniženjem početnog pH povećava topljivost taloga, tj. granica taloženja se pomiče prema višim početnim koncentracijama reaktanata. Područja nastajanja pojedinih faza i njihova veličina ovisi o početnom pH. Tako pri pH 7,4 (slika 1. a) pri vrlo niskim prezasićenjima nastaju sferulitični kristalni aglomerati oktakalcijevoga fosfata (OCP). Pri srednjim prezasićenjima u području I nastaju mikrokristalni agregati u dva koraka preko amorfnooga prekursora. Pri vrlo visokim prezasićenjima, područje II, nastaje smjesa defektnoga apatita (DA) i kalcijevoga hidrogenfosfata dihidrata (DCPD). Za razliku od toga, pri pH 6,5 (slika 1. b) i niskim prezasićenjima (područje I) nastaje smjesa OCP i DCPD. Pri srednjim prezasićenjima (područje II) nastaju mikrokristalni agregati DA. Pri visokim prezasićenjima nastaje DCPD bilo u smjesi s DA (područje III) ili kao dominantna kristalna faza (područje IV) (8).

Da bi se objasnile opažene razlike, provedeni su i kinetički eksperimenti koji su pokazali sljedeće:

- pri vrlo niskim prezasićenjima prvi korak u nastajanju taloga jest heterogena nukleacija na prisutnim nečistoćama (8),
- pri srednjim i višim prezasićenjima taloženje je najvjerojatnije inicirano homogenom nukleacijom (9), i odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak je nastajanje metastabilnoga amorfnooga prekursora čiji sastav ovisi o uvjetima taloženja (9-14). U dodiru s matičnicom prekursor se procesima starenja i hidrolize transformira, pri čemu, ovisno o uvjetima taloženja, nastaju različiti kalcijevi fosfati.

### 2.2. Kalcijevi oksalati

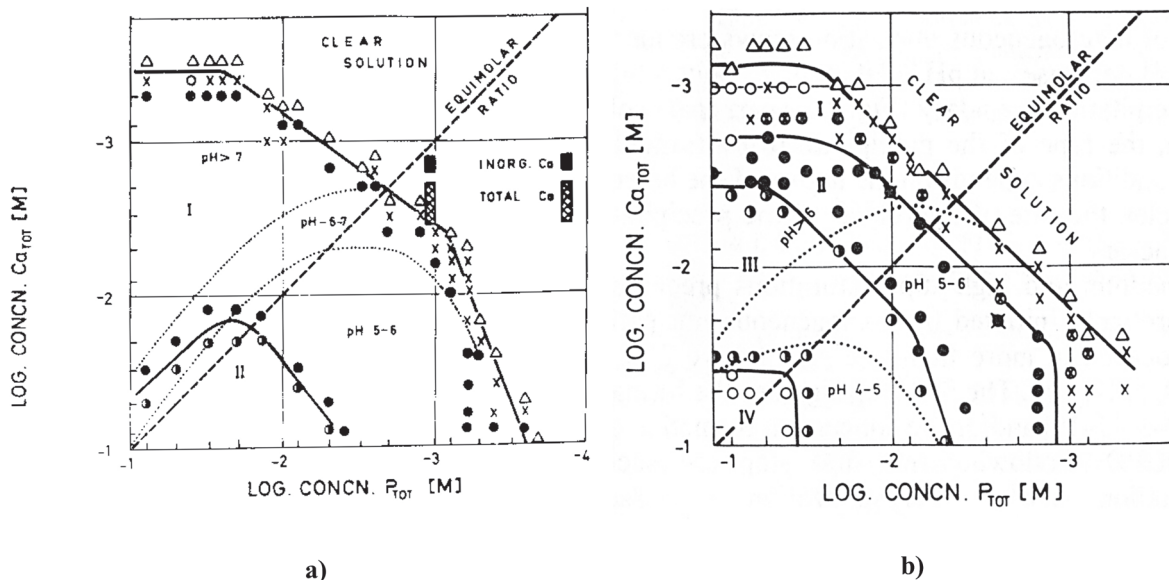
Taložni dijagram sustava kalcijev klorid – natrijev oksalat – natrijev klorid na pH 6,5 i 25°C nakon 24 h, kao i tipične morfologije nastalih kristala (15) dani su na slici 2. Kod niskih početnih prezasićenja, heterogenom nukleacijom nastaju veći, kompaktni kristali kalcijevoga oksalata monohidrata (COM) pločastoga oblika (P, slika 2. I<sub>1</sub>). Kod srednjih prezasićenosti ne mijenja se mehanizam nukleacije, ali se mijenja mehanizam kristalnoga rasta i nastaju veliki dendritični kristali (D, slika 2. II). Kod visokih prezasićenosti homogenom nukleacijom nastaje veliki broj mikrokristala (M, slika 2. III) koji međusobno aglomeriraju. Kalcijev oksalat dihidrat (COD, slika 2. I<sub>2</sub>) nastaje pri vrlo visokim prezasićenjima u suvišku kalcijevih ili oksalatnih iona (15, 16). Zanimljivo da u ovom ispitanom vrlo

SLIKA 1.

Taložni dijagram sustava kalcijev klorid – natrijev fosfat – 0,15 M natrijev klorid pri 37°C nakon 24 sata, pH<sub>i</sub> a) 7,4 i b) 6,5.  
 Prema ref. 8.

FIGURE 1.

Precipitation diagram of the system calcium chloride – sodium phosphate – 0.15 M sodium chloride at 37°C after 24 h, pH<sub>i</sub> a) 7,4 and b) 6,5. After ref. 8.

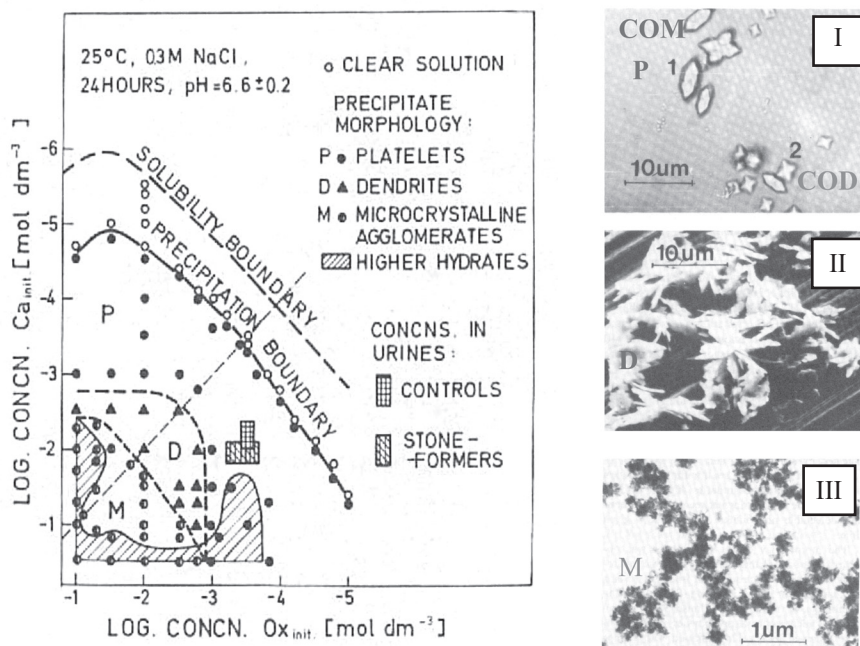


SLIKA 2.

Taložni dijagram sustava kalcijev klorid – natrijev oksalat – 0,3 M natrijev klorid nakon 24 sata i mikrofografije (I i II svjetlosna mikroskopija, III pretražna elektronska mikroskopija) tipičnih morfologija nastalih kristala kalcijevih oksalata: I) pločice (P) kalcijevoga oksalata monohidrata (COM) i oktaedralne bipiramide kalcijevog oksalata dihidrata (COD), II) dendriti (D) COM, III) mikrokristalinični agregati (M). Prema ref. 15.

FIGURE 2.

Precipitation diagram of the system calcium chloride – sodium oxalate – 0.3 M sodium chloride after 24 h and micrographs (I and II optical microscopy, III scanning electron microscopy) of recurrent morphological types: I) calcium oxalate monohydrate (COM) platelets (P) and calcium oxalate dihydrate (COD) octahedral bipiramides, II) COM dendrites (D), III) microcrystalline agglomerates (M). After ref. 15.

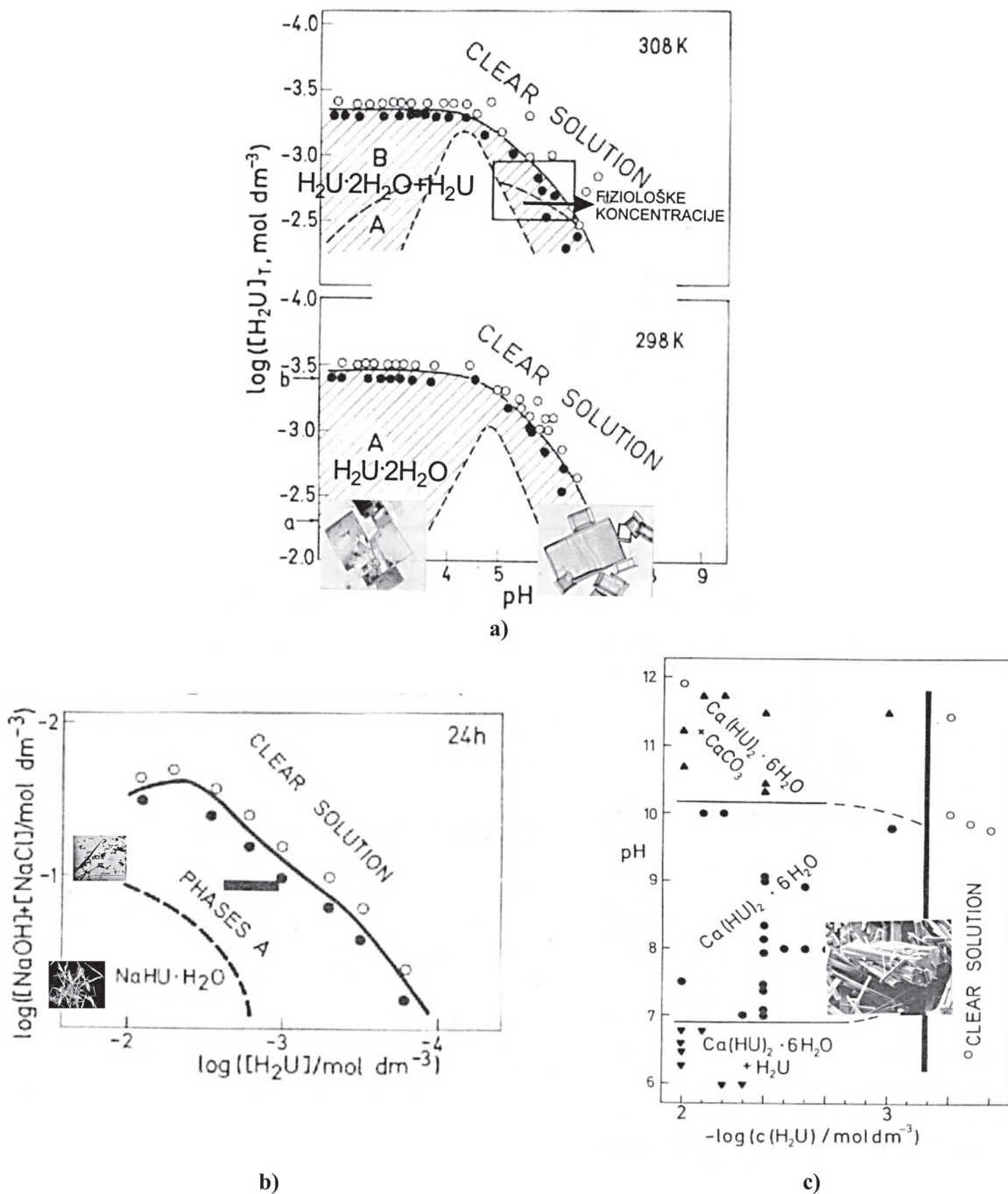


SLIKA 3.

Taložni dijagrami mokraćne kiseline i njezinih soli: a) raspodjela čvrstih faza u ovisnosti o početnoj koncentraciji mokraćne kiseline i konačnom pH pri 25 i 35°C nakon 24 sata (prema ref. 18), b) taložni dijagram sustava  $H_2U - NaOH - NaCl - H_2O$  pri 35°C, pH 7,5 nakon 24 sata (prema ref. 19), c) taložni dijagram sustava  $H_2U - Ca(OH)_2 - NaCl - H_2O$  pri 25°C nakon 2 mjeseca (prema ref. 20).  $H_2U$  – mokraćna kiselina,  $H_2U \cdot 2H_2O$  – mokraćna kiselina dihidrat,  $NaHU \cdot H_2O$  – natrijev hidrogenurat monohidrat,  $Ca(HU)_2 \cdot 6H_2O$  - kalcijev urat heksahidrat.

FIGURE 3.

Precipitation diagrams of uric acid and its salts: a) distribution of solid phases as function of initial uric acid concentration and final pH at 25 and 35°C after 24 h (after ref. 18), b) precipitation diagram of the system  $H_2U - NaOH - NaCl - H_2O$  at 35°C, pH 7.5 after 24 h (after ref. 19), c) precipitation diagram of the system  $H_2U - Ca(OH)_2 - NaCl - H_2O$  at 25°C after 2 month (after ref. 20).  $H_2U$  – uric acid,  $H_2U \cdot 2H_2O$  – uric acid dihydrate,  $NaHU \cdot H_2O$  – sodium hydrogenurate monohydrate,  $Ca(HU)_2 \cdot 6H_2O$  - calcium hydrogenurate hexahydrate.

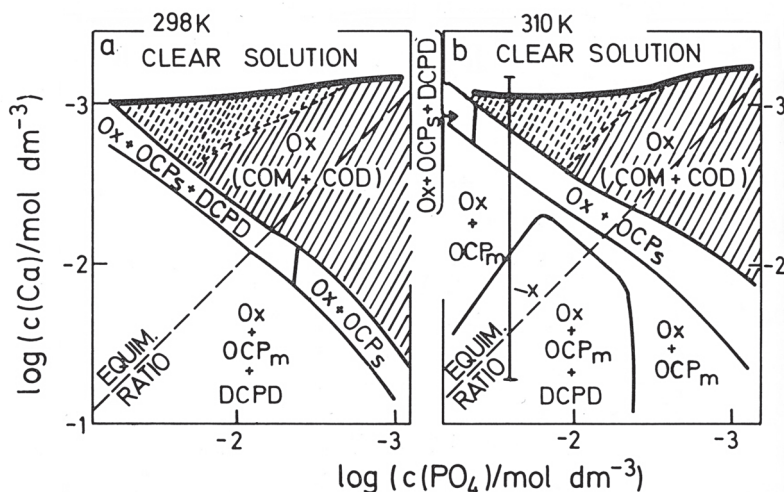


SLIKA 4.

Taložni dijagram sustava  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{NaCl}$  (0,3 M)–  $\text{H}_2\text{O}$  pri pH 6,5 i nakon 24 h pri: a) 25 i b) 37°C. Oznake: Ox - COM + COD (oksalati – kalcijev oksalat monohidrat + dihidrat,  $\text{OCP}_s$  – sferulitični agregati oktakalcijevoga fosfata,  $\text{OCP}_m$  – mikrokristali oktakalcijevoga fosfata. Osjenčana područja odgovaraju slabom taloženju teško vidljivih čestica. Prema ref. 25.

FIGURE 4.

Precipitation diagrams of the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{NaCl}$  (0.3 M)–  $\text{H}_2\text{O}$  at pH 6.5 after 24 h at: a) 25 and b) 37°C. Designations: Ox - COM + COD (oxalates – calcium oxalate monohydrate and dihydrate),  $\text{OCP}_s$  – octacalcium phosphate spherulitic aggregates,  $\text{OCP}_m$  – octacalcium phosphate microcrystals. Dashed line shadings designate light precipitation of barely visible particles. After ref. 25.



širokom koncentracijskom području reaktanata nije detektiran kalcijev oksalat trihidrat (COT) koji se iako rjeđe pojavljuje u mokraćnim kamenicama. U modelnim sustavima COT nastaje uz magnetsko miješanje (17).

### 2.3. Mokraćna kiselina i njezine soli

Taložni dijagrami sustava u kojima nastaju mokraćna kiselina (18), natrijev hidrogenurat monohidrat (19) i kalcijev hidrogenurat heksahidrat (20) dani su na slici 3.

U sustavu  $\text{H}_2\text{U} - \text{HCl} - \text{NaOH} - \text{H}_2\text{O}$  pri 25°C i 37°C nakon 24 sata (slika 3. a) ovisno o prezasićenosti i temperaturi nastaju termodinamički stabilan anhidrid ( $\text{H}_2\text{U}$ ), termodinamički nestabilan dihidrat ( $\text{H}_2\text{U} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) i/ili njihova smjesa. Kristali dihidrata su stabilni na sobnoj temperaturi i u vremenskom razdoblju od 24 sata, dok se pri fiziološkoj temperaturi transformiraju u stabilniji anhidrid (18, 21, 22).

U sustavu  $\text{H}_2\text{U} - \text{NaOH} - \text{NaCl} - \text{H}_2\text{O}$  pri pH 7,5 i 35°C nakon 24 h (slika 3. b) nastaju obje morfološke faze natrijevoga hidrogenurata monohidrata ( $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), amorfni i/ili koloidni koji je prekursorska faza (slika 3. b), faza A) te igličasti kristali (slika 3. b), kut) koji nastaju pri visokim prezasićenjima koja se ne pojavljuju u mokraći (19,21-23).

U sustavu  $\text{H}_2\text{U} - \text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{HCl} - \text{H}_2\text{O}$  pri 25°C nakon 2 mjeseca (slika 3. c) sastav taloga ovisi o pH. Pri pH = 7 – 10 nastaju čisti kristali kalcijevoga urata heksahidrata ( $\text{Ca}(\text{HU})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Pri pH < 7 uz njih nastaje i mokraćna kiselina, a pri

pH > 10 nastaje smjesa kristala kalcijevoga urata heksahidrata i kalcijevoga karbonata (20, 23, 24).

### 3. Dvokomponentni taložni sustavi

Taložni sustavi u kojima talože dvije komponente prvi su korak u približavanju uvjetima *in vivo*. Iako još uvijek relativno jednostavni, ti sustavi daju važne podatke o interakcijama dviju skupina spojeva koji su najčešći sastojci bubrežnih kamenaca. Do sada su istraženi taložni sustavi:

- kalcijevi oksalati i fosfati (sustav  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{NaCl} - \text{H}_2\text{O}$ ), (25),
- kalcijevi oksalati i mokraćna kiselina (sustav  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{H}_2\text{U} - \text{NaCl}$  (0,3 mol  $\text{dm}^{-3}$ )–  $\text{H}_2\text{O}$  pH 6,55, 37°C), (26-28),
- kalcijevi fosfati i mokraćna kiselina (sustav  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{U} - \text{NaCl}$  (0,3 mol  $\text{dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,0, 37°C), (26- 28).

U taložnim sustavima mokraćne kiseline i kalcijevih oksalata ili kalcijevih fosfata izračunata su i prezasićenja koristeći u tu svrhu napisani kompjutorski program. Opis toga programa dan je u dodatku. Izračunavanje prezasićenja otopine često se koristi za predviđanje o tome hoće li određeni talog nastati u danim uvjetima. Taj pristup od velikoga je interesa i za prevenciju nastanka mokraćnih kamenaca, odnosno omogućuje da se na temelju sastava mokraće procijeni je li neka osoba potencijalni stvaralac kamenaca ili nije. Kompjutorski programi koji omogućuju da se na temelju nalaza sastava mokraće izračunaju prezasićenja (kao i ionski aktiviteti, koncentraci-

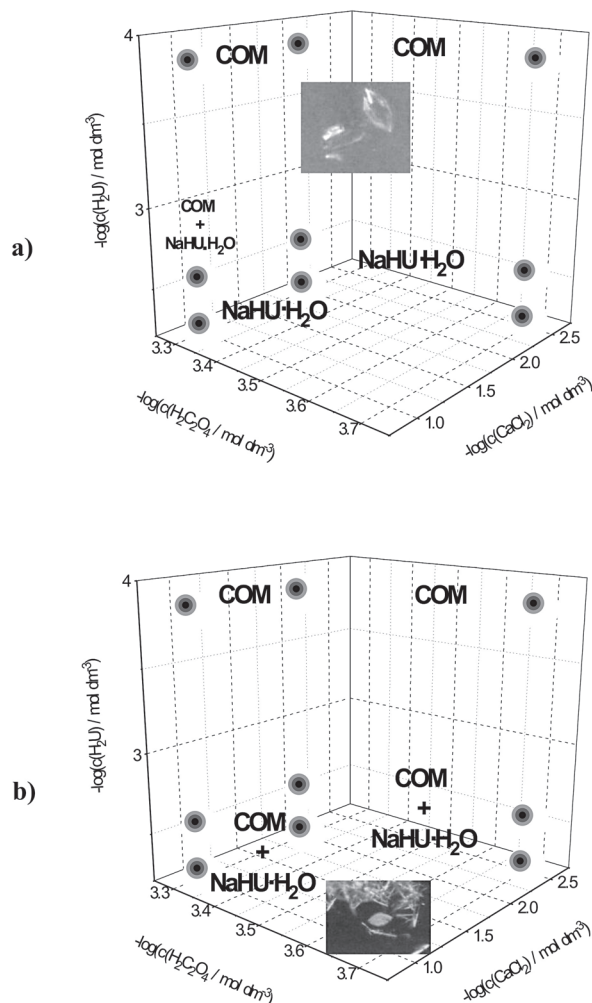
SLIKA 5.

Raspodjela čvrstih faza nastalih u sustavu  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  na  $37^\circ\text{C}$  nakon a) 24 sata i b) 14 dana. COM – kalcijev oksalat monohidrat, COD – kalcijev oksalat dihidrat,  $\text{NaHU}\cdot\text{H}_2\text{O}$  – natrijev hidrogenurat monohidrat.

Prema ref. 26.

FIGURE 5.

Distribution of solid phases formed in the  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{NaCl}$  ( $0.3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  system at  $37^\circ\text{C}$  after a) 24 hours and b) 14 days. COM – calcium oxalate monohydrate, COD - calcium oxalate dihydrate,  $\text{NaHU}\cdot\text{H}_2\text{O}$  – sodium hydrogurate monohydrate. After ref. 26.



je iona itd.) za glavne sastojke mokraćnih kamenaca, a koji su danas najpoznatiji i najčešće korišteni EQUIL2 (29, 30) i SEQUIL (31, 32).

### 3.1. Kalcijevi oksalati i fosfati

Taložni dijagrami sustava  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{NaCl} - \text{H}_2\text{O}$  pri pH 6,5 i na 25 i  $37^\circ\text{C}$  nakon 24 h (25) dani su na slici 4.

Detaljno istraživanje utjecaja koncentracija reaktanata i vremena starenja na sastav i morfologiju taloga u navedenom sustavu pokazalo je da su glavni taložni produkti COM, COD, OCP, DCPD i/ili njihove smjese. Sastav nastalih smjesa ovisi o koncentraciji reaktanata i o temperaturi. I dok taloženje kalcijevih fosfata inhibira taloženje kalcijevih oksalata,

kalcijevi oksalati ne utječu niti na taloženje niti na topljivost kalcijevih fosfata. Uzrok tome je adsorpcija fosfatnih iona na kristale COM (25).

### 3.2. Kalcijevi oksalati i mokraćna kiselina

Taložni dijagrami sustava  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  pH 6,55,  $37^\circ\text{C}$  (26) dan je na slici 5.

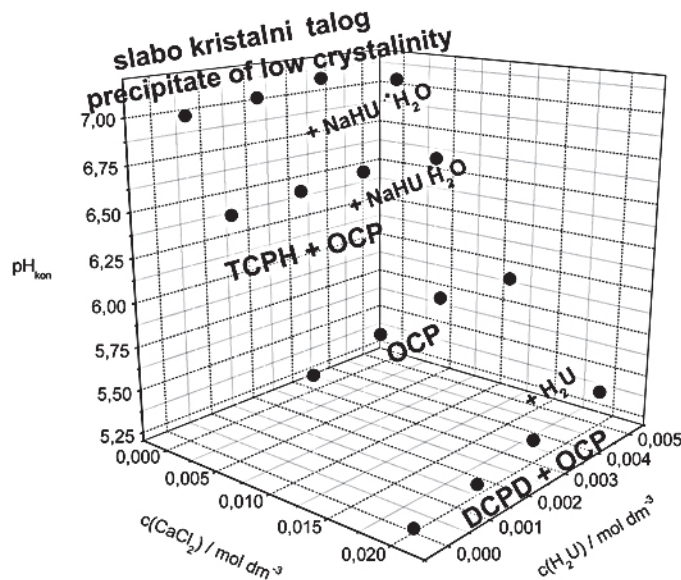
Pri koncentracijama mokraćne kiseline manjim od fiziološke istaložio se samo COM u obliku heksagonskih pločica (slika 5. a). COD nije bio detektiran. Računi prezasićenja pokazali su da je u tim sustavima prezasićenost u odnosu na urate manja od 1. Pri niskim koncentracijama iona kalcija i oksalata, a pri višim koncentracijama mokraćne kiseline ( $\geq 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon 24 sata nastaje samo  $\text{NaHU}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , a nakon 14 dana (slika

SLIKA 6.

Raspodjela čvrstih faza nastalih nakon 24 sata u taložnom sustavu  $H_3PO_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $CaCl_2$  –  $H_2U$  –  $NaCl$  ( $0,3$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $H_2O$  pri pH 7,0 na  $37^\circ C$ .  $pH_{kon}$  – konačni pH, TCPH – kalcijev fosfat hidrat, OCP – oktakalcijev fosfat, DCPD – kalcijev hidrogenfosfat dihidrat,  $NaHU \cdot H_2O$  – natrijev hidrogenurat monohidrat,  $H_2U$  – mokraćna kiselina. Prema ref. 26.

FIGURE 6.

Distribution of solid phases formed after 24 hours in the  $H_3PO_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $CaCl_2$  –  $H_2U$  –  $NaCl$  ( $0,3$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $H_2O$  system at pH 7.0 and  $37^\circ C$ .  $pH_{kon}$  – final pH, TCPH – calcium phosphate hydrate, OCP – octacalcium phosphate, DCPD – calcium hydrogenphosphate hydrate,  $NaHU \cdot H_2O$  – sodium hydrogenurate monohydrate,  $H_2U$  – uric acid. After ref. 26.



5. b) taloži i COM (26,28). Zašto prisutnost mokraćne kiseline u koncentracijama  $\geq 3 \cdot 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$  inhibira nastajanje COM nije sasvim jasno. U literaturi nailazimo na kontradiktorne podatke; od toga da urati mogu poslužiti za epitaksijalni rast oksalata, do toga da djeluju kao inhibitori njihovoga rasta (33,34). Niti u jednom slučaju nije razjašnjen mehanizam interakcije urata i oksalata.

### 3.3. Kalcijevi fosfati i mokraćna kiselina

Taložni dijagrami sustava  $CaCl_2$  –  $H_3PO_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $H_2U$  –  $NaCl$  ( $0,3$  mol  $dm^{-3}$ ) –  $H_2O$  pH 7,0,  $37^\circ C$  (26) dan je na slici 6.

U ovom sustavu koncentracija fosfata odgovara prosječnoj koncentraciji fosfata u urinu, dok su koncentracije iona kalcija i mokraćne kiseline varirane tako da odgovaraju koncentracijama kalcija i mokraćne kiseline nižim, prosječnim i višim u odnosu na one u mokraći. Pri najnižoj koncentraciji iona kalcija nastala je mala količina slabokristalnog taloga čiji sastav nije mogao biti određen. Povećanjem koncentracije iona kalcija prvo nastaje smjesa kalcijevoga fosfata hidrata (TCPH) i OCP, zatim sam OCP, a pri najvišim koncentracijama kalcija smjesa OCP i DCPD (slika 6).

Promjena pH koja prati taloženje fosfata raste u nizu TCPH < OCP < DCPD, odnosno ona je to veća što je koncentracija kalcija veća. To je razumljivo jer taloženje kalcijevih fosfata uzrokuje promjenu pH, koja je to veća što nastaje više taloga. Pri koncentracijama mokraćne kiseline većim od  $3 \cdot 10^{-3}$  mol

$dm^{-3}$  u smjesi s fosfatima istaložio se i  $NaHU \cdot H_2O$ , odnosno mokraćna kiselina, kada je konačni pH pao ispod 5,5. Mokraćna kiselina nije utjecala na vrstu i morfologiju istaloženih fosfata, ali je povećanjem njezine koncentracije porastao udio OCP u smjesi (26,28).

Računi prezasićenja pokazali su da bi u sustavima trebala nastati smjesa DCPD, TCPH, hidroksi apatit (HA) i  $NaHU \cdot H_2O$ , a prezasićenje u odnosu na OCP,  $H_2U$  i  $H_2U \cdot H_2O$  uvijek je bilo manje od 1 (26,28). Poznato je da vrlo često OCP i DCPD zbog kinetičkih faktora nastaju prije HA, iako je prezasićenost sustava u odnosu na njih manja nego u odnosu na HA (35).

Distribucija istaloženih fosfata nije sasvim u skladu s prethodnim istraživanjima (8). U području u kojem bi prema objavljenom taložnom dijagramu (8) trebao nastati defektni apatit, sam ili u smjesi s DCPD, u našem slučaju nastaje smjesa TCPH i OCP, ili sam OCP. Razlika u ta dva taložna sustava je u početnom pH i ionskoj jakosti: pH 7,0 i  $0,3$  mol  $dm^{-3}$   $NaCl$  (26, 28) u odnosu na pH 7,4 i  $0,15$  mol  $dm^{-3}$   $NaCl$  (8). Osim toga, u ref. 8. defektni apatit nije bio dovoljno okarakteriziran.

### 4. Trokomponentni taložni sustav

U nastojanju da se što više približimo uvjetima u mokraći, barem što se tiče glavnih soli, istražili smo taloženje u modelnom sustavu  $CaCl_2$  –  $H_2C_2O_4$  –  $H_3PO_4$  –  $H_2U$  –  $NaCl$  –  $H_2O$  (slika 7.). To je bio prvi opisani modelni sustav koji sadrži sve glavne anorganske komponente mokraćnih kamenaca (26, 28). Koncentracija fosfata i oksalata bila je jednaka prosječnoj

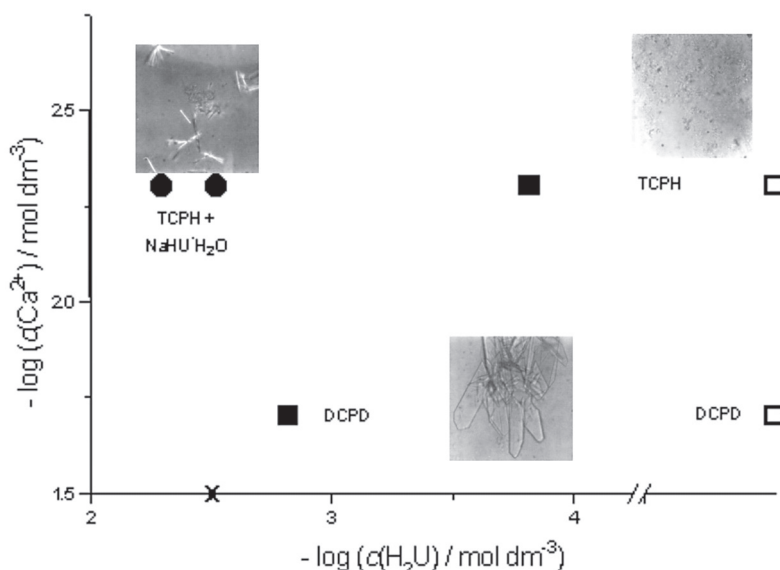


SLIKA 7.

Raspodjela čvrstih faza nastalih u sustavu  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ( $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{U} - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  na  $37^\circ\text{C}$  nakon 24 sata. ■ - sustavi u koje je dodana mokraćna kiselina, □ - sustavi u kojima nije bila dodana mokraćna kiselina, ● - sustavi u kojima je uz fosfate istaložio i  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . x - prosječna koncentracija mokraćne kiseline u mokraći. Zadebljanje na ordinati označava raspon prosječnih koncentracija iona kalcija u mokraći. TCPH – kalcijev fosfat hidrat, DCPD – kalcijev hidrogenfosfat dihidrat,  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$  – natrijev hidrogenurat monohidrat. Prema ref. 28.

FIGURE 7.

Distribution of solid phases formed in the  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ( $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{U} - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) system at  $37^\circ\text{C}$  after 24 hours. □ - no added uric acid, ■ - added uric acid, ● - precipitate with crystals of the phosphates and  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Physiological concentrations of uric acid and calcium in urine are indicated by the asterisk and dashed-line shadings, respectively. TCPH – calcium phosphate hydrate, DCPD – calcium hydrogenphosphate hydrate,  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$  – sodium hydrogenurate. After ref. 28.



koncentraciji u urinu ( $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Na slici 7. nalazi se dijagram koji prikazuje distribuciju čvrstih faza nastalih nakon 24 sata. Jednaka distribucija dobivena je i nakon 14 dana.

Pri koncentracijama mokraćne kiseline nižim od  $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  istaložili su samo kalcijevi fosfati. Pri višoj koncentraciji kalcija nastao je DCPD u obliku pločica, a pri nižoj TCPH (slika 7.). Taloženje TCPH ili njegove smjese s  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$  nije uzrokovalo značajniju promjenu pH, za razliku od taloženja DCPD. To što oksalati u našem sustavu nisu nastali u skladu je s rezultatima dobivenim u sustavu  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH}_i$  6,5 na  $37^\circ\text{C}$  (25) koji su pokazali da fosfati inhibiraju taloženje oksalata.

Računi prezasićenja rađeni uz pretpostavku da u otopini ne nastaju kompleksi kalcijevih oksalata pokazali su da bi u svim slučajevima trebala nastati smjesa DCPD i TCPH, a  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$  bi se trebao istaložiti u sustavima u kojima je koncentracija mokraćne kiseline  $\geq 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Rezultati istraživanja za  $\text{NaHU} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , za razliku od fosfata, dobro se slažu s izračunatim. Izračunate vrijednosti prezasićenosti za kalcijeve oksalate ( $< 1$ ) pokazuju da oni ne bi trebali nastati, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da fosfati inhibiraju taloženje oksalata (25).

#### 4.1. Karakterizacija TCPH

Rentgenogram i morfologija (slika 8.a)) TCPH nastaloga u sustavu  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ( $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{U} - \text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  na  $37^\circ\text{C}$  pokazao je da se radi o materijalu sličnom mineralu kostiju (slika 8. c). Kemijska i termogravimetrijska analiza ukazuje da se radi o spoju sastava  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \leq n \leq 3$ ) koji sadrži primjese HA (36). Prema literaturi (37,38) takvi materijali su se do sada dobivali samo pri povišenim temperaturama ili djelovanjem mikrovalova (slika 8. b).

#### 5. Utjecaj citrata na taloženje kalcijevih oksalata u umjetnom urinu

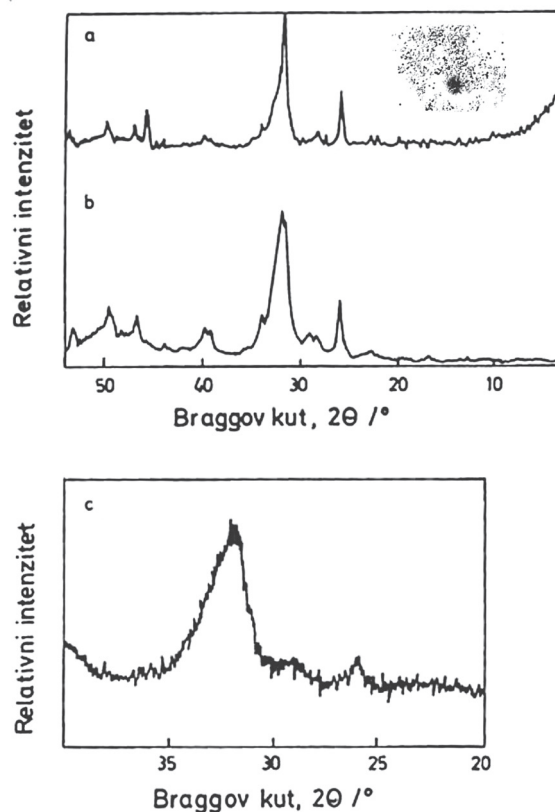
Korak dalje u približavanju realnim uvjetima u organizmu jest proučavanje taloženja u umjetnom urinu, mediju koji sadrži većinu anorganskih komponenti mokraće i neke male organske molekule i ione kao što su urea i citrat. Na žalost, rezultati tih istraživanja često nisu usporedivi jer različiti autori izabiru umjetni urin sastava prilagođenog cilju njihovih istraživanja. Burns i Finlayson (39) pokušali su unijeti malo reda predloživši sastav standardnoga referentnog umjetnog urina. Većina umjetnih urina u svom sastavu sadrži: ureu, natrijev i/ili kalcijev klorid, natrijev sulfat, magnezijev sulfat, različite natrijeve fosfate, natrijev oksalat, kalcijev klorid, citrat.

SLIKA 8.

Rentgenogrami praha i morfologija a) kalcijevoga fosfata hidrata nastaloga u sustavu  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ( $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  –  $\text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  mikrovalova (prema ref. 36), b) materijala sličnoga mineralu kostiju dobivenoga djelovanjem mikrovalova (prema ref. 38), c) minerala kostiju (područje  $2\theta = 20^\circ - 40^\circ$ ).

FIGURE 8.

XRD powder patterns and morphology of a) calcium phosphate hydrate formed in the  $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ( $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  –  $\text{NaCl}$  ( $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) –  $\text{H}_2\text{O}$  system (after ref. 36), b) material similar to the bone formed by microwave irradiation (after ref. 38), c) bone mineral (region  $2\theta = 20^\circ - 40^\circ$ ).



Dosadašnja istraživanja su pokazala da je taloženje COM u umjetnom urinu inhibirano, a taj efekt je pojačan u prisutnosti polifosfata i poliakrilata (40). Usporedbom brzina nukleacije u sustavima koji su sadržavali različite kombinacije komponenata umjetnoga urina ustanovljeno je da ioni natrija, kalija, amonija, te kloridi i sulfati ne utječu na ukupnu kinetiku taloženja u umjetnom urinu, u kojem je taloženje za red veličine bilo sporije od taloženja u čistom sustavu. S druge strane ioni citrata inhibiraju taloženje i u umjetnom urinu i u čistom sustavu (41,42). U umjetnom urinu su taložila sva tri hidrata kalcijevoga oksalata (42,43). Pokazana je i važnost prisustva čvrstih nečistoća za nastajanje COM (42), te prisustva fosfata i mokraćne kiseline kao dobrih heteronukleusa za nastajanje kamenaca kalcijevih oksalata (44).

Također je ustanovljeno da od fosfata u umjetnom urinu talože DCPD i HA, a na njihovo nastajanje utječu ioni magnezija (45). Ioni citrata također značajno inhibiraju taloženje fosfata (46).

U ovom dijelu naših istraživanja cilj je bio odrediti utjecaj citrata na taloženje kalcijevih oksalata u umjetnom urinu (26). Sastav umjetnoga urina (prema referenci (40) dan je u tablici 2.

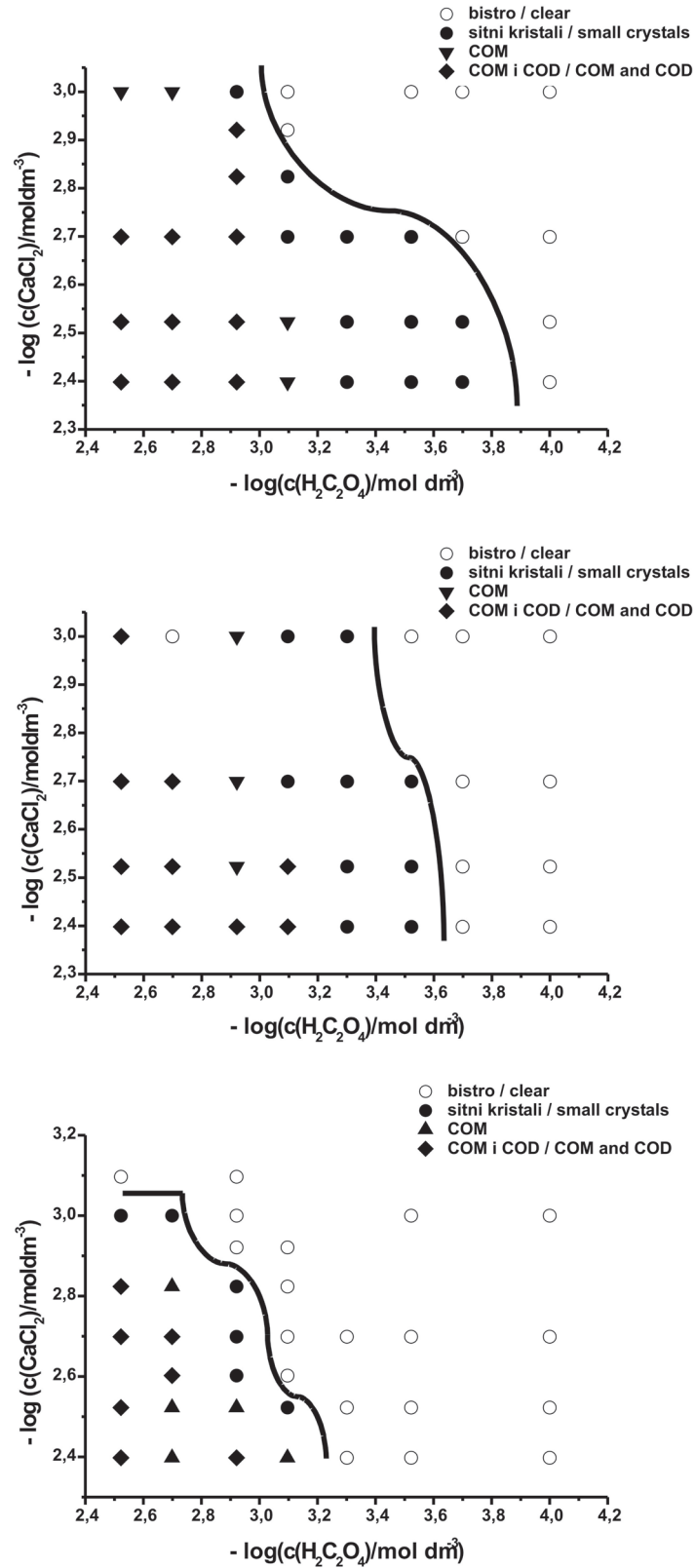
Utjecaj iona citrata ispitan je u području koncentracija oksalata  $1 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , te iona kalcija  $4 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Koncentracije iona citrata bile su 0 (kontrola, slika 9. a)  $2 \cdot 10^{-3}$  (fiziološka), (slika 9. b)) i  $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (slika 9. c) u umjetnom urinu u kojem su ioni magnezija bili prisutni u fiziološkoj koncentraciji ( $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Rezultati nakon 1 sata sumirani su na slici 9. U prisutnosti iona citrata eksperimentalno određena granica taloženja pomiče se prema višim vrijednostima koncentracija iona kalcija i oksalata, osobito ako je koncentracija iona citrata viša (slika 9. c). Taj se efekt može objasniti time što citrat kompleksira kalcij. Da je citrat efikasan inhibitor nastajanja kalcijevih oksalata pokazala su i druga istraživanja u sličnim uvjetima (40-42) i u mokraći (47). Račun prezasićenja (pomoću programa EQUIL) potvrđuje te rezultate. Računi prezasićenja pokazali su da do taloženja dolazi pri prezasićenjima iznad 5 za COM i iznad 4 za COD.

Ioni citrata nisu promijenili morfologiju nastalih taloga, što je u skladu s prije objavljenim rezultatima (48) koji su pokazali da se ioni citrata nespecifično adsorbiraju na plohe COM.

SLIKA 9.

Dijagrami taloženja kalcijevih oksalata u umjetnom urinu, pH 6,00 i na 37°C nakon 1 sata. Koncentracija citrata a) 0, b) 0,002 mol dm<sup>-3</sup>, c) 0,006 mol dm<sup>-3</sup>. COM – kalcijev oksalat monohidrat, COD – kalcijev oksalat dihidrat. Linija predstavlja granicu taloženja.

FIGURE 9. Precipitation diagrams of calcium oxalates in synthetic urine at pH 6.00 and 37°C after 1 hour. Citrate concentration a) 0, b) 0.002 mol dm<sup>-3</sup>, c) 0.006 mol dm<sup>-3</sup>. COM – calcium oxalate monohydrate, COD - calcium oxalate dihydrate. Line represents precipitation boundary.



TABLICA 3.

Konstante stabilnosti kompleksa na 37°C i ionskoj jakosti 0 korištene za račun prezasićenja

TABLE 3.

Stability constants of complexes at 37°C and ionic strength 0 used calculation of supersaturation

ravnoteža equilibrium		konstanta constant	Ref.
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K <sub>1</sub> = 6,22·10 <sup>-3</sup> (49)
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	K <sub>2</sub> = 6,18·10 <sup>-8</sup> (49)
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	K <sub>3</sub> = 6,84·10 <sup>-13</sup> (49)
Ca <sup>2+</sup> + H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sub>4</sub> = 6,93 (49)
Ca <sup>2+</sup> + HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$\rightleftharpoons$	CaHPO <sub>4</sub> <sup>0</sup>	K <sub>5</sub> = 355 (49)
Ca <sup>2+</sup> + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	$\rightleftharpoons$	CaPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K <sub>6</sub> = 2,90·10 <sup>6</sup> (49)
H <sub>2</sub> U	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + HU <sup>-</sup>	K <sub>7</sub> = 3,63·10 <sup>-6</sup> (18)
HU <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + U <sup>2-</sup>	K <sub>8</sub> = 3,09·10 <sup>-11</sup> (50)
H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + HC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K <sub>9</sub> = 4,79·10 <sup>-5</sup> (51)
HC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	H <sup>+</sup> + C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	K <sub>10</sub> = 5,37·10 <sup>-2</sup> (51)
Ca <sup>2+</sup> + C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$\rightleftharpoons$	Ca C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>0</sup>	K <sub>11</sub> = 2,88·10 <sup>-2</sup> (51)

### Zaključak

Fizičko-kemijska istraživanja, iako se uglavnom temelje na jednostavnijim modelnim sustavima, pružaju mnoštvo informacija o osnovnim procesima na kojima se temelji nastajanje mokraćnih kamenaca.

Danas postaje sve jasnije da je za uspješnu prevenciju i liječenje bolesti bubrenih i/ili mokraćnih kamenaca potrebno povezati bazična, predklinička i klinička istraživanjima, a za to je potrebna učinkovita suradnja kemičara i liječnika.

### Zahvala

Zahvaljujemo na potpori Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (projekti 098-0982915-2949, 098-0982904-2951 i 219-2192190-2069).

### Dodatak – opis kompjutorskoga programa korištenoga za računanje prezasićenosti u modelnim taložnim sustavima CaCl<sub>2</sub> – H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>U – 0,3 mol dm<sup>-3</sup> NaCl – H<sub>2</sub>O i CaCl<sub>2</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>U – 0,3 – H<sub>2</sub>O mol dm<sup>-3</sup> NaCl

Za računanje prezasićenosti u modelnim taložnim sustavima CaCl<sub>2</sub> – H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>U – 0,3 mol dm<sup>-3</sup> NaCl – H<sub>2</sub>O i CaCl<sub>2</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>U – 0,3 mol dm<sup>-3</sup> NaCl – H<sub>2</sub>O korišten je kompjutorski program napisan u tu svrhu (26). Program iz poznatih ukupnih početnih koncentracija reaktanata, pH, konstanti stabilnosti kompleksa (tablica 3.) i konstanti produkta topljivosti (tablica 4.) računa koncentracije ionskih vrsta, produkte ionskih aktiviteta i prezasićenja. Račun započinje s pretpostavkom da je ionska jakost 0, a koeficijenti aktiviteta 1, te s konstantama koje su ili određene na I = 0, ili korigirane na tu vrijednost ionske jakosti. Ionske koncentracije izračunate u prvom krugu računa koriste se za izračunavanje nove ionske jakosti, iz koje se pomoću Davisove modifikacije proširene Debye-Hückeleove jednadžbe izračunavaju novi koeficijenti aktiviteta, f:

$$-\log f_i = Az_i^2 \left( \frac{\sqrt{I / \text{mol dm}^{-3}}}{1 + \sqrt{I / \text{mol dm}^{-3}}} - 0,3(I / \text{mol dm}^{-3}) \right) \quad (1)$$

TABLICA 4.  
 Konstante produkta topljivosti fosfata, oksalata i urata na 37°C korištene za račun prezasićenja  
 TABLE 4.  
 Phosphates, oxalates and urates solubility products at 37°C used in calculation of supersaturation

	Spoj Compound	Formula	$K_{sp}$	Ref.
Fosfati Phosphates	kalcijev hidrogenfosfat dihidrat calcium hydrogenphosphate dihydrate DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	$2,24 \cdot 10^{-7}$	(52)
	kalcijev fosfat calcium phosphate TCP	$Ca_3(PO_4)_2$	$2,83 \cdot 10^{-30}$	(53)
	oktakalcijev fosfat octacalcium phosphate OCP	$Ca_8H(PO_4)_3$	$1,99 \cdot 10^{-49}$	(54)
Oksalati Oxalates	kalcijev oksalat monohidrat calcium oxalate monohydrate COM	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$	$2,26 \cdot 10^{-9}$	(55)
	kalcijev oksalat dihidrat calcium oxalate dihydrate COD	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$	$3,63 \cdot 10^{-9}$	(56)
Urati Urates	mokraćna kiselina uric acid $H_2U$	$C_5H_4N_4O_3$	$2,20 \cdot 10^{-9}$	(57)
	mokraćna kiselina dihidrat uric acid dihydrate $H_2U \cdot 2H_2O$	$C_5H_4N_4O_3 \cdot 2H_2O$	$2,25 \cdot 10^{-9}$	(18)
	natrijev hidrogenurat monohidrat sodium hydrogenurate monohydrate $NaHU \cdot H_2O$	$NaC_5H_3N_4O_3 \cdot H_2O$	$6 \cdot 10^{-5}$	(58)

A je konstanta koja ovisi o relativnoj permitivnosti i temperaturi, a na 37°C iznosi 0,5242,  $I$  je ionska jakost, a  $z_i$  nabojni broj iona. Pomoću njih se zatim korigiraju konstante ravnoteže, npr. za disocijaciju kiseline HA konstanta disocijacije na ionskoj jakosti  $I$ ,  $K_p$ , bit će ova:

$$K_I = \frac{K_0}{f_1^2} \quad (2)$$

gdje je  $K_0$  konstanta na  $I = 0$ , a  $f_1$  koeficijent aktiviteta za jednovalentne ione. S korigiranim konstantama ponovo se računaju ionske koncentracije. Iteracija se završava kada je razlika vrijednosti ionskih jakosti dva uzastupna kruga računa manja od 0,01%, što je i u skladu s eksperimentalnim pogreškama. Obično je bilo potrebno manje od 10 iteracijskih krugova da se postigne željeno slaganje. Koncentracije ion-

skih vrsta računati su na temelju konstante stabilnosti kompleksa i početnih koncentracija reaktanata.

Aktiviteti (umnožak koncentracije iona i odgovarajućega koeficijenta aktiviteta, uglate zagrade) svih fosfatnih ionskih vrsta izražene su preko aktiviteta iona  $H_2PO_4^-$  i  $Ca^{2+}$ :

$$[H_3PO_4] = \frac{[H^+]}{K_1} [H_2PO_4^-] \quad (3)$$

$$[HPO_4^{2-}] = \frac{K_2}{[H^+]} [H_2PO_4^-] \quad (4)$$

$$[PO_4^{3-}] = \frac{K_2 K_3}{[H^+]^2} [H_2PO_4^-] \quad (5)$$

$$[CaH_2PO_4^+] = \frac{K_2 K_5}{[H^+]} [Ca^{2+}] [H_2PO_4^-] \quad (6)$$

$$[CaHPO_4^0] = K_4 [Ca^{2+}] [H_2PO_4^-] \quad (7)$$

$$[CaPO_4] = \frac{K_2 K_3 K_6}{[H^+]^2} [Ca^{2+}] [H_2PO_4^-] \quad (8)$$

Ukupne koncentracije kalcija i fosfora su:

$$Ca_{TOT} = Ca^{2+} \left[ 1 + [H_2PO_4^-] \left( \frac{K_2 K_5}{[H^+]} + K_4 + \frac{K_2 K_3 K_6}{[H^+]^2} \right) \right] \quad (9)$$

$$P_{TOT} = [H_2PO_4^-] \left\{ \frac{[H^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_2 K_3}{[H^+]^2} + [Ca^{2+}] \left( \frac{K_2 K_5}{[H^+]} + K_4 + \frac{K_2 K_3 K_6}{[H^+]^2} \right) \right\} \quad (10)$$

Neka su:

$$B = \frac{K_2 K_5}{[H^+]} + K_4 + \frac{K_2 K_3 K_6}{[H^+]^2} \quad (11)$$

$$C = \frac{[H^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_2 K_3}{[H^+]^2} \quad (12)$$

$$AA = B \cdot C \quad (13)$$

$$BB = C + B [C_{TOT} - P_{TOT}] \quad (14)$$

$$CC = -P_{TOT} \quad (15)$$

Slijedi da su aktiviteti slobodnih iona  $Ca^{2+}$  i  $H_2PO_4^-$ :

$$[Ca^{2+}] = \frac{Ca_{TOT}}{[1 + [H_2PO_4^-] \times B]} \quad (16)$$

$$[H_2PO_4^-] = \frac{-BB + \sqrt{BB^2 - 4 \times AA \times CC}}{2 \times AA} \quad (17)$$

Svi aktiviteti uratnih ionskih vrsta izraženi su preko  $HU^-$ , što daje:

$$[H_2U] = \frac{[H^+]}{K_7} [HU^-] \quad (18)$$

$$[U^{2-}] = \frac{K_8}{[H^+]} [HU^-] \quad (19)$$

$$H_2U_{TOT} = [HU^-] \left[ \frac{[H^+]}{K_7} + 1 + \frac{K_8}{[H^+]} \right] \quad (20)$$

$$[HU^-] = \frac{H_2U_{TOT}}{\left[ \frac{[H^+]}{K_7} + 1 + \frac{K_8}{[H^+]} \right]} \quad (21)$$

Aktiviteti svih oksalatnih ionskih vrsta bile su izražene preko koncentracije iona  $Ox^{2-}$ :

$$[H_2Ox] = \frac{[H^+]^2}{K_9 K_{10}} [Ox^{2-}] \quad (22)$$

$$[HOx^-] = \frac{[H^+]}{K_{10}} [Ox^{2-}] \quad (23)$$

$$[CaOx^0] = K_{11} [Ca^{2+}] [Ox^{2-}] \quad (24)$$

$$H_2Ox_{TOT} = [Ox^{2-}] \left\{ \frac{[H^+]^2}{K_9 K_{10}} + \frac{[H^+]}{K_{10}} + 1 + K_{11} [Ca^{2+}] \right\} \quad (25)$$

$$[Ca^{2+}] = \frac{Ca_{TOT}}{1 + K_{11} [Ox^{2-}]} \quad (26)$$

$$D = \frac{[H^+]^2}{K_9 K_{10}} + \frac{[H^+]}{K_{10}} + 1 \quad (27)$$

$$E = K_{11} Ca_{TOT} \quad (28)$$

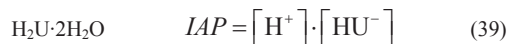
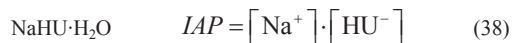
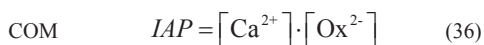
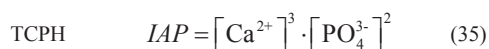
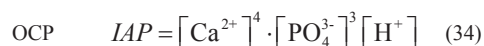
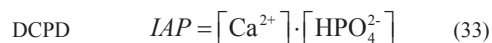
$$F = D \cdot K_{11} \quad (29)$$

$$G = D + E - K_{11} H_2Ox_{TOT} \quad (30)$$

$$H = -H_2Ox_{TOT} \quad (31)$$

$$[Ox^{2-}] = \frac{-G + \sqrt{G^2 - 4 \times F \times H}}{2 \cdot F} \quad (32)$$

Iz izračunatih ionskih aktiviteta izračunati su produkti aktiviteta (IAP) prema sljedećim jednažbama:



Prezasićenja su dobivena dijeljenjem produkata aktiviteti iona s odgovarajućim konstantama produkta topljivosti, te vađenjem odgovarajućega korijena (npr. petoga za TCPH).

#### LITERATURA

- Menon M, Resnick MI. Urinary lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. U: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, urednici. *Campbell's Urology*. 8. izd. Saunders, Philadelphia: PA; 2002. str. 3229-305.
- Füredi-Milhofer H. Precipitation and interfacial phenomena in biological mineralization - introductory-remarks. *Croat Chem Acta*. 1983;56:721-40.
- Chung H-J, Abrahams HA, Meng MV, Stoller ML. Theories of stone formation. U: Stoller ML, Meng MV, urednici. *Urinary stone disease*. New Jersey: Humana Press; 2007. str. 55-68.
- Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol*. 1978;15:442-8.
- Burns JR, Finlayson B, Gauthier J. Calcium oxalate retention in subjects with crystalluria. *Urol Int*. 1984;39:36-9.
- Blomen LJM. Growth and agglomeration of calcium oxalate crystals (dissertation). University of Leiden; 1982.
- Eans ED. Dynamics of calcium phosphate precipitation. U: Bonnucci E, urednik. *Calcification in biological systems*. Boca Raton: CRC Press; 1992. str. 1-17.
- Füredi-Milhofer H, Oljica-Žabčić E, Purgarić B, Pavković NH. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte-solutions. IV. Precipitation diagrams of the system calcium chloride-sodium phosphate-0.15 M sodium chloride. *J Inorg Nucl Chem*. 1975;37:2047-51.
- Füredi-Milhofer H, Bilinski H, Brečević Lj, Despotović R, Filipović-Vinceković N, Oljica E, i sur. The formation of Ca-phosphate precipitates. Metastable equilibria and kinetics, physico chimie et cristalographie des apatites interest. *Biologique*. 1973;230:303-10.
- Brečević Lj, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte-solutions. II. The formation and transformation of the precipitates. *Calcif Tissue Res*. 1972;10:82-90.
- Despotović R, Filipović N, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions III. Radiometric studies of the kinetics of precipitation and aging of calcium phosphates. *Calcif Tissue Res*. 1975;18:13-26.
- Kosar-Grašić B, Purgarić B, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte-solutions. VI. Precipitation diagram of calcium hydrogen phosphate. *J Inorg Nucl Chem*. 1978;40:1877-80.
- Eans ED, Posner AS. Kinetics and mechanism of conversion of non-crystalline calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite. *Trans NY Acad Sci Ser II*. 1965;28:233-41.
- Eans ED, Gillissen, Posner AS. Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature*. 1965;208:365-7.
- Babić-Ivančić V, Füredi-Milhofer H, Purgarić B, Brničević N, Despotović R. Precipitation of calcium oxalates from high ionic-strength solutions. 3. The influence of reactant concentrations on the properties of the precipitates. *J Cryst Growth*. 1985;71:655-63.
- Babić V, Purgarić B, Despotović Z, Füredi-Milhofer H. Precipitation of calcium oxalates from 0.3 M sodium chloride solutions. U: Fleisch H, Robertson WG, Smith LH, Vahlensieck W, urednici. *Urolithiasis Research*. New York: Plenum Press; 1976. str. 233-6.
- Škrtić D, Füredi-Milhofer H, Marković M. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions: V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. *J Cryst Growth*. 1987;80:113-20.
- Babić-Ivančić V, Füredi-Milhofer H, Brown WE, Gregory TM. Precipitation diagrams and solubility of uric-acid dihydrate. *J Cryst Growth*. 1987;83:581-7.
- Füredi-Milhofer H, Babić-Ivančić V, Milat O, Brown WE, Gregory TM. Precipitation of sodium acid urate from electrolyte-solutions. *J Cryst Growth*. 1987;83:572-80.
- Babić-Ivančić V, Füredi-Milhofer H, Brničević N, Marković M. Precipitation and solubility of calcium hydrogenurate hexahydrate. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 1992;97:365-72.
- Babić-Ivančić V, Füredi-Milhofer H, Milat O, Brown WE, Gregory TM. The conditions for precipitation of uric acid and sodium acid urate. U: Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, urednici. *Urolithiasis and related clinical research*. New York, London: Plenum Press; 1985. str. 785-8.
- Babić-Ivančić V, Füredi-Milhofer HM, Uzelac M. Taloženje i topljivost mokraćne kiseline i natrij hidrogenurata. U: Tucak A, Radonić M, Füredi-Milhofer H, Dekanić D, Čečuk Lj, urednici. *Urolitijaza*. Osijek: Revija; 1989. str. 160-8.
- Babić-Ivančić V, Uzelac M, Turčin R, Füredi-Milhofer H, Brničević N. Uvjeti nastajanja natrij urata i kalcij urata. *Med Vjesn*. 1985;17:163-7.
- Füredi-Milhofer H, Babić-Ivančić V, Brničević N, Uzelac M. Precipitation and solubility of calcium hydrogenurate hexahydrate. U: Gasser G, Vahlensieck W, urednici. *Pathog Klinik der Harnstein XIII*. Darmstadt: Steinkopff-Verlag; 1988. str. 195-8.
- Füredi-Milhofer H, Marković M, Uzelac M. Precipitation and solubility of calcium phosphates and oxalates in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{C}_2\text{O}_4\text{-NaCl-H}_2\text{O}$ . *J Cryst Growth*. 1987;80:60-8.
- Sikirić M. Taloženje mineralnih soli mokraćnih kamenaca (magisterij). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 1999.
- Sikirić M, Babić-Ivančić V, Tonković M. Utjecaj mokraćne kiseline na taloženje i svojstva taloga kalcij oksalata i kalcij fosfata. *Anali Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti*, sv. 11b. Osijek; 1995. str. 181-9.
- Sikirić M, Babić-Ivančić V, Tonković M. Precipitation of calcium oxalate and calcium phosphate in the presence of uric acid. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*. 1997;121:145-50.
- Werness PG, Brown CM, Smith LH, Finlayson B. Equil2: A basic computer program for the calculation of urinary saturation. *J Urol*. 1985;134:1242-4.
- Ogawa Y, Hatano T. Comparison of the Equil2 program and other methods for estimating the ion-activity product of urinary calcium oxalate: a new simplified method is proposed. *Int J Urol*. 1996;3: 383-5.
- Ashby RA, Byrne JP, Györy ÁZ. Urine is a saturated equilibrium and not a metastable supersaturated solution: evidence from crystalluria and the general composition of calcium salt and uric acid calculi. *Urol Res*. 1999;27:297-305.
- Ashby RA, Sleet RJ. The role of citrate complexes in preventing urolithiasis. *Clin Chim Acta*. 1992;210:157-65.

33. Meyer JL, Bergert JH, Smith LH. Epitaxially induced crystal-growth of calcium-oxalate by crystalline uric-acid. *Invest Urol.* 1976;14:115-9.
34. Tiselius HG. Effects of sodium urate and uric-acid crystals on the crystallization of calcium-oxalate. *Urol Res.* 1984;12:11-5.
35. Boistelle R, Lopez-Valero I. Growth units and nucleation - the case of calcium phosphates. *J Cryst Growth.* 1990;102:609-17.
36. Tonković M, Sikirić M, Babić-Ivančić V. Controversy about  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp.* 2000;170:107-12.
37. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier; 1994.
38. Sarig S, Apfelbaum F, Kahana F. Upgrading of hydroxyapatite ceramic biocompatibility by incorporation of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. U: Sedel L, Rey C, urednici. Proceedings of the 10th International symposium on ceramics in medicine in bioceramics, vol. 10. 1997. str. 397-400.
39. Burns JR, Finlayson B. A proposal for a standard reference artificial urine in in vitro urolithiasis experiments. *Invest Urol.* 1980;18:167-9.
40. Doremus RH, Teich S, Silvis PX. Crystallization of calcium-oxalate from synthetic urine. *Invest Urol.* 1978;15:469-72.
41. Rodgers AL, Garside J. The nucleation and growth-kinetics of calcium-oxalate in the presence of some synthetic urine constituents. *Invest Urol.* 1981;18:484-8.
42. Grases F, Costa-Bauzá A, March JG. Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. *British J Urol.* 1994;74:298-301.
43. Rodgers AL, Wandt MAE. Influence of aging, pH and various additives on crystal-formation in artificial urine. *Scanning Microscopy.* 1991;5:697-706.
44. Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Söhnel O. Artificial simulation of renal stone formation - influence of some urinary components. *Nephron.* 1993;65:77-81.
45. Grases F, Söhnel O, Vilacampa AI, March JG. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta.* 1996;244:45-67.
46. Robertson WG, Nordin BEC. Renal stone research symposium. Hodgkinson A, Nordin BEC, urednici. London: J. & A. Churchill; 1969.
47. Tiselius HG, Berg C, Fornander AM, Nilsson MA. Effects of citrate on the different phases of calcium-oxalate crystallization. *Scanning Microscopy.* 1993;7:381-90.
48. Wierzbicki A, Sikes CS, Sallis JD, Madura JD, Stevens ED, Martin KL. Scanning electron-microscopy and molecular modeling of inhibition of calcium-oxalate monohydrate crystal-growth by citrate and phosphocitrate. *Calcif Tissue Int.* 1995;56:297-304.
49. Marković M, Fowler BO, Tung MS, Lagergren ES. Composition and solubility product of a synthetic hydroxyapatite. U: Amjad Z, urednik. Mineral and scale formation and inhibition. New York: Plenum Press; 1995. str. 271-81.
50. Lam Ervin CY, Nancollas GH. The crystallization and dissolution of sodium urate. *J Cryst Growth.* 1981;53:215-23.
51. Nancollas GH, Gardner GL. Kinetics of crystal growth of calcium oxalate monohydrate. *J Cryst Growth.* 1974;21:267-76.
52. Madsen HEL. Ionic concentrations in calcium phosphate solutions. I. Solutions saturated with respect to brushite or tetracalcium monohydrogen phosphate at 37°C. *Acta Chem Scand.* 1970;24:1671-6.
53. Gregory TM, Moreno EC, Brown WE. Solubility of  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$ - $\text{H}_2\text{O}$  at 5, 15, 25 and 37°C. *J Res Natl Bur Std US.* 1974;78A: 667-74.
54. Tung MS, Eidelman N, Sieck B, Brown WE. Octacalcium phosphate solubility product from 4° to 37°C. *J Res Natl Bur Stands.* 1988;93:613-24.
55. Doremus RH, Teich S, Silvis PX. Crystallization of calcium oxalate from synthetic urine. *Invest Urol.* 1978;15:469-72.
56. Hammarsten G. Etiologic factors. U: Butt AJ, urednik. Renal Lithiasis. Springfield: Ches. C. Thomas; 1956. str. 89.
57. Sperling O, Kadem O, de Vries A. Etiology of uric acid lithiasis. Solubility of uric acid and sodium urate in buffer solution. *Rev Franc Etudes Clin et Biol XI.* 1966;11:40-8.
58. Wilcox WR, Khalaf A, Weinberger A, Kippen J, Klinenberg JR. Solubility of uric acid and monosodium urate. *Med Biol Eng.* 1972;10:522-31.



## PRECIPITATION IN MODEL SYSTEMS WITH CHEMICAL COMPOSITION MIMICKING URINE

Maja Dutour Sikirić<sup>1,\*</sup>, Vesna Babić-Ivančić<sup>1,2</sup>, Milenko Marković<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ruđer Bošković Institute, Zagreb,

<sup>2</sup>School of Medicine University J.J Strossmayer Osijek, Croatia,

<sup>3</sup>Paffenbarger Research Center (ADAF), NIST material Science and Engineering Laboratory,  
Polymer Division, Gaithersburg, MD 20899-0001, USA

Corresponding author:

\*Maja Dutour Sikirić

Laboratory for Synthesis and Processes of Selfassembling of Organic Molecules

Division of Physical Chemistry / Ruđer Bošković Institute

Bijenička c. 5410 000 Zagreb

tel: 01 45 60 941, fax: 01 46 80 245 / e-mail: sikiric@irb.hr

Original scientific paper

### ABSTRACT

Urinary stone formation can be simplified to precipitation of its principle components from complex solution. This approach enables elucidation of urinary stone formation mechanisms by applying physico-chemical principles of nucleation and crystal growth in investigating model systems of urinary stones formation. In this paper an overview of investigation of precipitation in simple and complex model systems containing calcium phosphates, calcium oxalates, urates or their mixtures conducted in our group in past forty years has been given, as well as preliminary results of investigations of calcium oxalate precipitation in artificial urine.

**Key words:** Calcium phosphates - chemistry, urine; calcium oxalate - chemistry, urine; Uric acid - chemistry, urine; urinary calculi – chemistry; Physicochemical processes; Chemical precipitation

### Acknowledgements:

The support granted by Croatian Ministry of Science, education and sports (projects 098-0982915-2949, 098-0982904-2951 and 219-2192190-2069).