Detoksikacija jetre zeolitom PMAO2 nakon intoksikacije aluminijevim kloridom

Gumbarević, Darko

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:959295

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Darko Gumbarević

DETOKSIKACIJA JETRE ZEOLITOM PMAO2 NAKON INTOKSIKACIJE ALUMINIJEVIM KLORIDOM

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2022.

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Darko Gumbarević

LIVER DETOXIFICATION WITH PMAO2 ZEOLITE AFTER ALUMINUM CHLORIDE INTOXICATION

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2022.

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Doktorski rad obranjen je dana 28.04.2022. u Rijeci, na Odjelu za biotehnologiju pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Elitza Petkova Markova Car (predsjednica povjerenstva)
2. doc. dr. sc. Ivan Gudelj
3. prof. dr. sc. Ljiljana Bedrica, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski Fakultet

Velika hvala mojoj mentorici prof.dr.sc. Sandri Kraljević Pavelić na pomoći, prijedlozima i vođenju tijekom izrade ovog doktorskog rada. Zahvaljujem dr.sc. Ani Filošević Vujnović na predanim eksperimentalnim rezultatima u doktoratu, kao i pomoći dr.sc. Ide Linić tijekom eksperimentalne izvedbe razvijanja DNA mikročipa. Također se zahvaljujem na suradnji s dr.sc. Markom Klobučarom, dr.sc. Petri Grbčić, Rumenki Markoskoj, Marku Filipoviću te ostalim djelatnicima Odjela za biotehnologiju.

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima, na podršci i bezuvjetnoj ljubavi.

Činim svoje, a ti čini svoje
Nisam na ovom svijetu da živim kako ti očekuješ.
Ni ti nisi na ovom svijetu da živiš prema meni.
Ti si ti, a ja sam ja,
I ako se slučajno nađemo,
bit će divno.
Ako se ne nađemo,
Tome se neda pomoći.

Fritz Perls

Pristup dijelu opreme korištene za izradu ovoga rada omogućen je projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

SAŽETAK

Aluminij je metal 13. skupine periodnog sustava elementa te nema fiziološku ulogu u organizmu. Povezuje se s nizom bolesti poput: Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, Downovog sindroma, autizma itd. Sve veće globalne klimatske promjene dovele su do povišenja razine aluminija u okolišu i ulazak u biota. Trenutno ne postoji metoda za njegovo uklanjanje iz okoliša ili za detoksikaciju živih organizama pa tako i čovjeka. Postojeća pak terapija protiv trovanja aluminijevim solima je desferioksamin. Kako isti ima veliki broj nuspojava, zadnjih godina se istražuje mogućnost korištenja alternativnih načina detoksikacije aluminija u živim organizmima, primjerice korištenjem zeolita klinoptilolita koji su poznati ionski izmjenjivači, adsorbensi te otpuštaju ortosilicijevu kiselinu što je u kontekstu detoksikacije aluminija također izuzetno važno svojstvo. U ovom doktoratu istražena su fizikalno-kemijska svojstva prirodnih zeolitnih klinoptilolitnih materijala, tribomehanički aktiviranog klinoptilolita TMAZ, dvostruko tribomehanički aktiviranog zeolita PMA i dvostruko tribomehanički aktiviranog oksigeniranog zeolita PMAO2 te je kao kontrolni spoj korišten sintetski zeolit A. Fizikalno-kemijska svojstva zeolitnih materijala bitna su za objašnjenje interakcije s ionima i biomolekulama u biološkim sustavima te su u ovom doktoratu provedeni eksperimenti infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, određivanje zeta potencijala i pH zeolitnih suspenzija u vodi i modelnim otopinama crijeva i želuca, *in vitro* kapacitet vezanja teških metala za zeolitne materijale, određivanje veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti, analiza sastava i izgleda površine materijala metodom XPS/EDS. Svi su istraženi zeolitni klinoptilolitni materijali pokazali značajan kapacitet vezanja kationa olova u modelnoj otopini želuca i crijeva te arsena, kroma i nikla u modelnoj otopini crijeva. Nadalje, svi su zeolitni klinoptololitni materijali pokazali detoksikacijska svojstva na aluminij *in vivo* na modelu intoksiciranih štakora subkroničnim dozama aluminijevog klorida. Mehanizam djelovanja ovog svojstva istražen je za PMAO2 analizom jetre životinja metodom DNA mikročipova koja je pokazala aktivaciju gena Sfrp1,Cry1, Rassf8 i supresiju gena Nr1d2 u tkivu jetre koji su uključeni u mehanizme detoksikacije. Ovi rezultati govore u prilog primjeni zeolita klinoptilolita u medicinske svrhe.

Ključne riječi: aluminij, ortosilicijeva kiselina, zeolit klinoptilolit, fizikalno kemijska svojstva, DNA mikročipovi, detoksikacija jetre zeolitom PMAO2

SUMMARY

Aluminum is a metal in the 13th group of the periodic table of elements and has no physiological role in the body. It has been linked to a number of diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Down syndrome, autism, etc. Increasing global climate change has led to an increase in the concentration of aluminum in the environment and its entry into the biota. Currently, there is no method to remove it from the environment, or to detoxify living organisms, including humans. The existing therapy for aluminum salt poisoning is desferrioxamine. As it has large number of side effects, in recent years possibility of using alternative ways of detoxification of aluminum in living organisms has been investigated, for example by using clinoptilolite zeolites which are known ion exchangers, adsorbents and orthosilicic acid realising compounds which is also extremely important in the context of aluminum detoxification. Therefore, the physicochemical properties of natural zeolite clinoptilolite materials tribomechanically activated clinoptilolite TMAZ, double tribomechanically activated zeolite PMA and double tribomechanically activated oxygenated zeolite PMAO2 were investigated in this doctorate and synthetic zeolite A was used as a control compound. Physicochemical properties of zeolite materials are important for explaining interactions with ions and biomolecules in biological systems and in this doctorate were performed experiments with Fourier transformed infrared spectroscopy, determination of zeta potential, pH of zeolite suspensions in model solutions of intestine and stomach as well as in water, *in vitro* binding capacity of heavy metals, determination of particle size by dynamic light scattering and surface analysis of the materials by XPS / EDS. All investigated clinoptilolite materials showed a significant binding capacity of lead cations in model solution of stomach and intestines and arsen, chromium and nickel in the model solution of the intestines. Furthermore, all zeolite clinoptilolite materials showed detoxifying properties on aluminum *in vivo* in a model of intoxicated rats by subchronic doses of aluminum chloride. The mechanism of action of this property was investigated for PMAO2 analysis of animal liver by DNA microchip method which showed activation of Sfrp1, Cry1, Rassf8 genes and supression of Nr1d2 genes in liver tissue involved in detoxification mechanisms. These results support the use of clinoptilolite zeolite for medical purposes.

Keywords: aluminum, orthosilicic acid, zeolite-clinoptilolite, physicochemical properties, DNA microarrays, detoxification of liver with PMAO2 zeolite

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Zeoliti 1

1.2. Prirodni zeolit klinoptilolit 5

1.2.1. Struktura klinoptilolita i neka fizikalno-kemijska svojstva 5

1.2.2. Primjena klinoptilolita 7

1.2.3. Učinci ortosilicijeve kiseline.....10

1.3. Oksidativni stres 11

1.4. Jetra 12

1.5. Metali.....15

1.6. Aluminij.....16

1.7. Visokopropusne tehnologije za analizu metala i njihovih učinaka na organizam 22

1.7.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom tehnikom (AAS-GF).....22

1.7.2. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) i emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).....23

1.8. DNA-mikročipovi 24

1.9. Proteomika 26

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....29

3. MATERIJALI I METODE 31

3.1. Uzorci zeolita.....31

3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....31

3.2.1. Infracrvena spektroskopija tehnikom KBr pastile 31

3.2.2. Infracrvena spektroskopija tehnikom atenuirane totalne refleksije 32

3.3. Određivanje veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS) 32

3.4. Određivanje zeta potencijala zeolita.....32

3.5. Fotoelektronska spektroskopija rendgenskim zrakama (XPS) 32
3.6. Brunauer-Emmet-Teller analiza specifične površine 33
3.7. Određivanje kapaciteta ionske izmjene/adsorpcije teških metala in vitro.....33
3.8. Mjerenje pH vrijednosti zeolita 34
3.9. Analiza elektronskom mikroskopijom spregnutom s elektronskom disperzijskom rendgenskom spektroskopijom.....35
3.10. Studija na štakorima *in vivo* 35
3.11. Izolacija molekula RNA iz jetre 37
3.11.1. Homogenizacija tkiva.....37
3.11.2. Izolacija RNA 37
3.11.3. Analiza kvalitete RNA 38
3.11.3.1. Priprema lađice za pufer 38
3.11.3.2. Priprema QX RNA poravnavajućeg markera 38
3.11.3.3. Instaliranje QIAxcel RNA spremnika i pametnog ključa.....39
3.11.3.4. Kalibracija intenziteta 39
3.11.3.5. Priprema uzorka za Qiaxel.....39
3.11.4. Priprava uzorka za DNA mikročip.....40
3.11.5. Obrada mikročipa u programu „Feature Extraction“.....43
3.11.6. Bioinformatička obrada odabranih transkriptomskih kandidata.....44

4. REZULTATI.....45
4.1. Infracrvena spektroskopija tehnikom KBr pastile.....45
4.2. Infracrvena spektroskopija s atenuiranom totalnom refleksijom 50
4.3. Određivanje veličine čestica zeolita dinamičkim raspršenjem svjetlosti 54
4.4. Određivanje zeta potencijala zeolita.....55
4.5. Određivanje omjera Si/Al zeolita XPS metodom 59
4.6. Mjerenje pH vrijednosti suspenzije zeolita u vodi i modelnim otopinama crijeva i želuca 66
4.7. Brunauer–Emmett–Teller (BET) analiza površine materijala 76

4.8. Kapacitet ionske izmjene/adsorpcije zeolita za teške metale in vitro 78

4.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) s elektronskom disperzijskom spektroskopijom (EDS) 81

4.10. *In vivo* studija na štakorima 87

4.10.1. Razine metala i minerala u plazmi i organima štakora 87

4.10.2. Izolacija RNA 92

4.10.3. Provjera integriteta izoliranih RNA molekula 92

4.10.4. Diferencijalna genska ekspresija po grupama i analiza funkcije gena u programu PANTHER 96

5. RASPRAVA 119

6. ZAKLJUČAK 133

7. LITERATURA 135

8. ŽIVOTOPIS 145

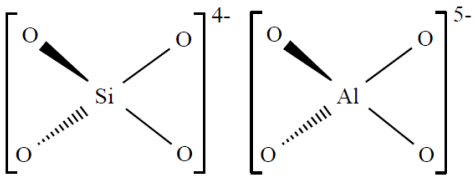
9. PRILOZI 148

1. UVOD

1.1. Zeoliti

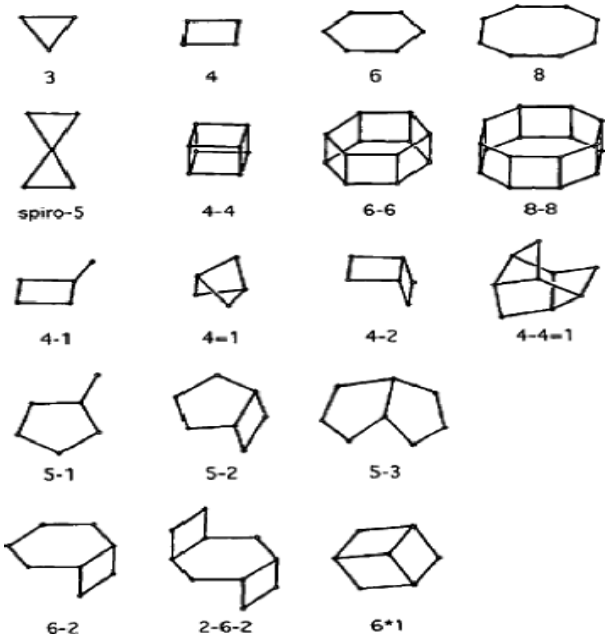
Švedski mineralog Axel Fredrik Cronstedt otkrio je zeolit 1756. godine i nazvao ga po grčkim riječima „zeo“ što znači ključati i „lithos“ što znači kamenje. Zbog adsorbirane vode koja je prilikom zagrijavanja jako isparavala činilo se da kamenje vrije, odatle naziv ključajuće kamenje. Podrijetlo ovih minerala posljedica je vulkanskih aktivnosti, točnije lave koja istječe u rijeke ili ocean [1]. Do sada su poznata 232 sintetička zeolita te 67 prirodnih zeolita [2].

Svi zeoliti imaju aluminosilikatnu strukturu s aluminooksidnim i silikatnim tetraedrima povezanih kisikovim atomima. Kako je aluminij trovalentan, zamjena sa silicijem u strukturi daje ovoj kristalnoj rešetki ukupni naboj negativan. Negativan naboj kompenzira se pozitivno nabijenim ionima alkalijskih i zemnoalkalijskih metala koji su ujedno hidratizirani i vežu se za strukturu elektrostatskim silama, kao i s molekulama vode. Stoga bi se moglo reći da je opća formula zeolita $(M^{n+})x/n[AlO_2)_x(SiO_2)_y]xmH_2O$. [3]. Silikatni i aluminooksidni tetraedri prikazani su na slici 1.



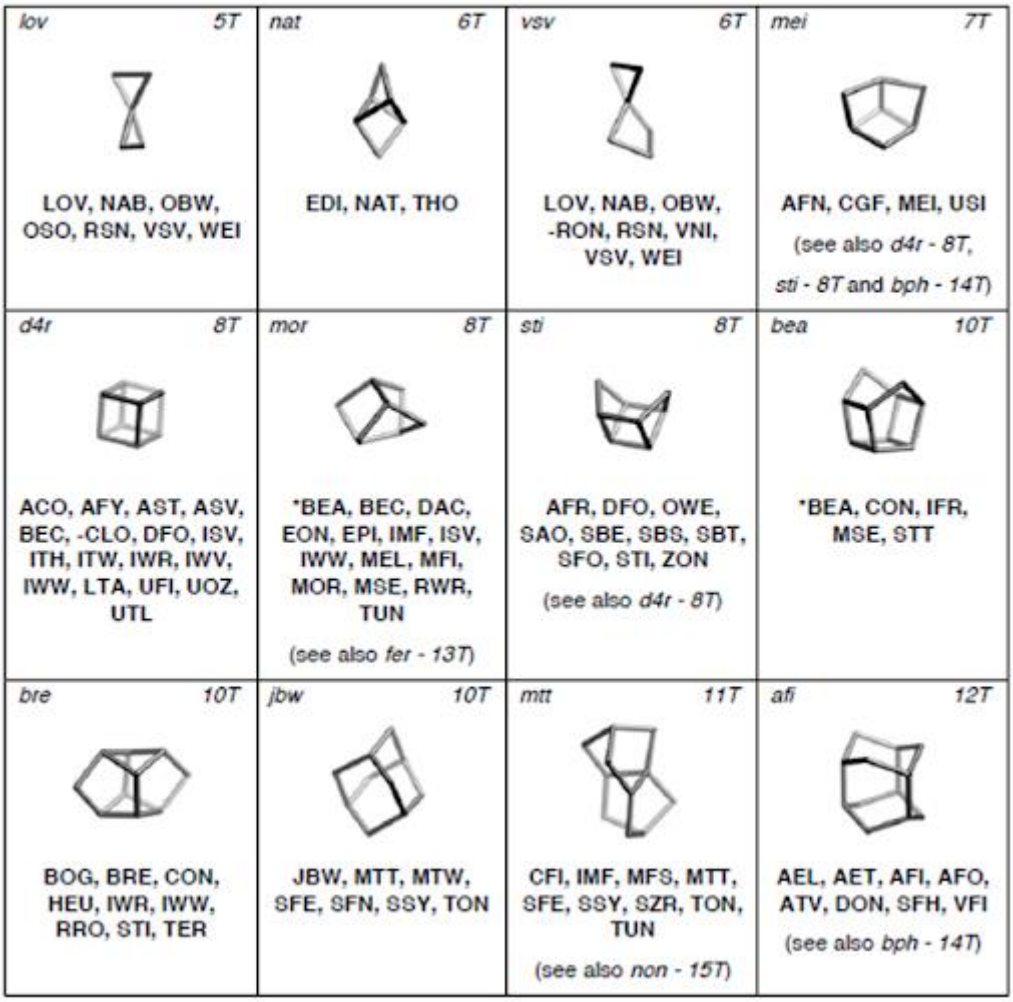
Slika 1. Silikatni i aluminooksidni tetraedri kao jedinični građevni elementi kristala zeolita. Preuzeto iz [1].

Kristalna struktura zeolita sastoji se od primarnih građevnih elemenata (engl. primary building units) sačinjenih od silikatnih i aluminooksidnih tetraedara koji se povezuju preko atoma kisika te čine 23 sekundarna građevna elementa koji su s različitim udjelom prisutni u pojedinom zeolitu, a čine je jednostruki i dvostruki prstenovi te različiti poliedri (slika 2.).



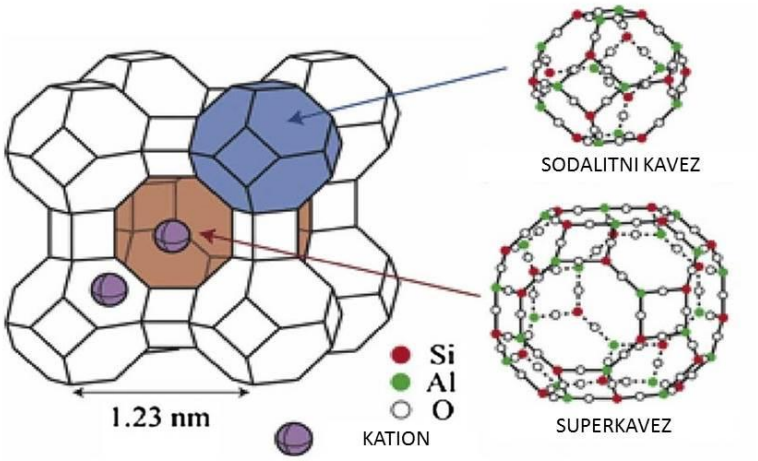
Slika 2. Primjer sekundarnih građevnih blokova. Preuzeto iz [4].

Pored jediničnih i sekundarnih građevnih blokova, zeoliti mogu sadržavati i kompozitne građevne blokove (engl. composite building units) čiju strukturu čine različiti kavezi kako je prikazano na slici 3.



Slika 3. Kompozitne građevne jedinice zeolita. Preuzeto iz [4].

Nakon strukturiranja kompozitnih građevnih blokova nastaju prave kristalne strukture zeolita koje su prikazane na slici 4.



Slika 4. Struktura zeolita A. Adaptirano prema [5].

Iz slike zeolita A vidljivo je kako se sastoji od kaveza i kanala u koje mogu ući male molekule poput kationa te malih organskih molekula. Zamjenom kationa iz otopine s kationom iz zeolita nastaje ionska izmjena. U reakciji s vodom zeoliti djeluju lužnato prema sljedećoj jednadžbi:

$$K^{+}_{(Z)} + H_2O\ (l) \rightarrow K^{+}(aq) + OH^{-}_{(aq)} + H^{+}_{(z)}$$

gdje z označava zeolitnu strukturu, a K^{+} kation koji ju izmjenjuje.

Prema Peregu, ionska izmjena ovisi o više faktora: struktura zeolitne rešetke, elektrostatsko polje koje čini rešetka, priroda kationa i njegov naboj, sastav otopine te pH otopine u kojoj je zeolit [6]. Zeoliti se mogu upotrebljavati zbog svojstva ionske izmjene za izmjenu toksičnih kationa, smanjenje tvrdoće vode i purifikaciju vode. Također mogu biti apsorbensi za različite plinove poput: amonijaka, sumporovodika, dušikovih oksida, sumporovih oksida i ugljičnog dioksida [7]. Osim ion-izmjenjivačkih svojstava, zeoliti posjeduju dobra svojstva adsorpcije na svoju površinu što se može opisati Langmuirovom i Freundlichovom izotermom. Osim toga, poznata je njihova

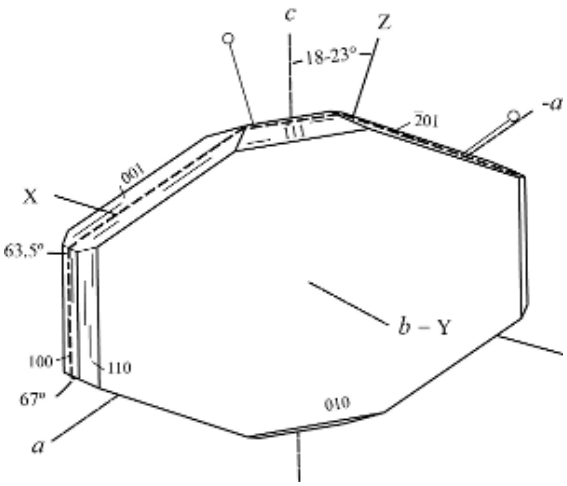
katalitička uloga u industrijskim procesima (tzv. „cracking“ visokolančastih alkana, izomerizacija i alkilacijske reakcije) [8].

1.2. Prirodni zeolit klinoptilolit

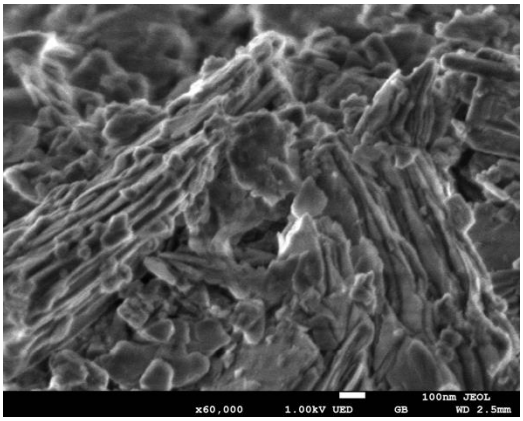
1.2.1. Struktura klinoptilolita i neka fizikalno-kemijska svojstva

Klinoptilolit je jedini prirodni zeolit koji je našao primjenu u medicini i veterini, a najrasprostranjeniji je zeolit u prirodi [9]. *Europeian Food Safety Authority* (EFSA) panel za aditive ili tvari koje se koriste u hrani za životinje je objavio kako je 10 g klinoptilolita po kilogramu ukupne hrane dnevno sigurno za konzumaciju u svih životinjskih vrsta. Klinoptilolit se ne apsorbira u tijelu, već samo neki njegovi sastojci, a ostatak se izlučuje stolicom [10]. Prirodni izvori klinoptilolita su nađeni u Japanu, SAD-u, Italiji, Grčkoj, Južnoj Africi, Bugarskoj, Ukraijni, kao i nekim drugim zemljama.

Klinoptilolitna jedinična ćelija je monoklinska s parametrima jedinične ćelije a=17,66 Å, b=17,963 Å, c=7,400 Å i β=116°47´ prema rendgenskoj strukturnoj analizi. Strukturu čine dva kanala koji su paralelni s c osi kristala i kanala paralelnog s a osi kristala. Njegova gustoća iznosi 2,103 g/cm^3 [9]. Opća formula klinoptilolita je $(Na,K)_6Al_6Si_{30}O_{72}x20H_2O$, dok omjer Si/Al iznosi od 4 do 5,3 [11]. Ovaj mineral ima mikropore i mezopore, gdje je mikroporoznost posljedica kristalne rešetke, a mezoporoznost potječe od pucanja kristalne rešetke klinoptilolita [9]. Slike 5. i 6. pokazuju jediničnu ćeliju klinoptilolita te SEM sliku lamelarne strukture klinoptilolita. Klinoptilolit pripada heulanditnom strukturnom tipu i omjer Si/Al iznosi > 4 prema internacionalnoj mineraloškoj udruzi [2].

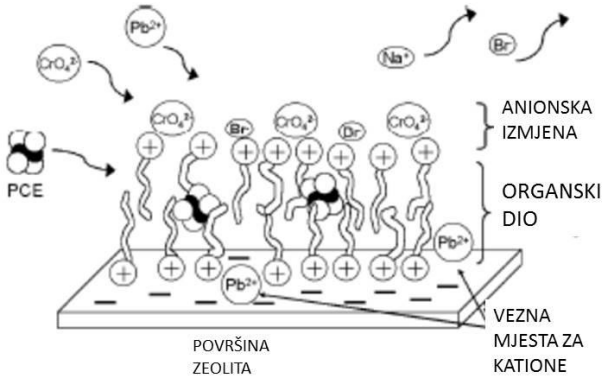


Slika 5. Jedinična ćelija klinoptilolita. Preuzeto iz [12].



Slika 6. Struktura tribomehanički usitnjenog klinoptilolita. Slika je dobivena uz pomoć mikroskopa FE-SEM instrumenta (JSM-7800F, PRIME, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) u Centru za mikro i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci, zahvalnošću prof. Mladena Petravića.

U porama zeolita događa se ionska izmjena s ionima iz okoliša koja za Na - klinoptilolit pokazuju sljedeći afinitet ionske izmjene kationa: Pb^{2+} > NH^{4+}> Cu^{2+}, Cd^{2+} > Zn^{2+}, Co^{2+} > Ni^{2+} > Hg^{2+} [13]. Budući da je površina klinoptilolita negativno nabijena, može se modificirati različitim surfaktantima koji imaju pozitivno nabijenu glavu i dugački neutralni rep, pa je moguće na površinu adsorbirati i negativno nabijene ione poput kromata, bromida, benzena i perkloroetilena kako prikazuje slika 7. [11].



Slika 7. Adsorpcija na modificiranu površinu zeolita. Adaptirano prema [11].

Za medicinsku primjenu klinoptilolit je potrebno usitniti, a jedan od postupaka je tribomehaničko usitnjavanje. Mljevenjem dolazi do smanjenja veličine čestica, promjene njihove distribucije veličine čestica i povećanja specifične površine zeolita [14].

1.2.2. Primjena klinoptilolita

Klinoptilolit nalazi primjenu u različitim ljudskim djelatnostima. Već se za vrijeme černobilske katastrofe upotrijebio za dekontaminaciju radioaktivnog stroncija i cezija s obzirom na visoki afinitet vezanja radioaktivnih iona, a i danas se koristi za dekontaminaciju otpadnih voda iz nuklearnih elektrana, osobito za dekontaminaciju stroncija i cezija [11]. U poljoprivredi se koriste kao „zeoponici“, odnosno kalijevi ili amonijevi zeoliti koji blago otpuštaju navedene katione koji su neophodni za razvoj biljaka te time omogućavaju njihovu bolju kultivaciju [11].

U katalizi, posebno izomerizaciji ksilena, hidrodemetilaciji toluena, izomerizaciji n-butena i dehidrataciji metanola, klinoptilolit se pokazao kao dobar katalizator reakcije, a njegove primjene su proučavane u otklanjanju teških metala iz komunalnih, poljoprivrednih i industrijskih otpadnih voda [2,13]. U veterinarskoj i humanoj medicini zeoliti imaju široku primjenu. Znanstvena literatura pokazuje da u blago alkalnom pH

dolazi do otpuštanja ortosilicijeve kiseline iz zeolita [15]. Tako primjerice ova činjenica može objasniti djelomično sporo otpuštanje akumuliranih teških metala u organizmu što se inače povezuje s mnogim neurološkim bolestima, kardiovaskularnim oboljenjima, bolestima bubrega i reproduktivnim problemima, osobito poticanje urinarne ekskrecije aluminija, antimona, arsena, bizmuta, kadmija, olova, žive, nikla i kositra [16]. Pretpostavlja se da je za ekskreciju odgovorna ortosilicijeva kiselina koja radi komplekse s navedenim metalima kako je to već pokazano s kobaltom [17]. Naime, pri pKa=9,8 ortosilicijeve kiseline u tjelesnim tekućinama (krv) postoji i udio negativno nabijenog ortosilikatnog aniona koji može kompleksirati navedene metale. Stvaranjem kompleksa ravnoteža se pomiče ka stvaranju ortosilikatnog aniona prema La Chatelierovom načelu te se ekskrecija teških metala olakšava ne utječući na koncentraciju elektrolita. Naime, time bi veći udio negativnog ortosilikatnog aniona vezao pozitivno nabijene teške metale, stvarao komplekse s istima te na taj način detoksicirao organizam. Nadalje, pokazano je kako klinoptilolit može u uvjetima *in vitro* inhibirati replikaciju herpesvirusa 1, adenovirusa 5 i enterovirusa (cocksackievirus B5 i ehovirus 7). Navedeni učinci vjerojatno su posljedica adsorpcijskih svojstava klinoptilolita [18]. Klinoptilolit nalazi svoju moguću primjenu i u tretmanu dislipidemije što je potencijalno za prevenciju aterosklerotskih bolesti [19].

Opisani su i imunomodulacijski učinci klinoptilolita. Naime, uzimanje klinoptilolita kod nespecifičnih imunodeficijencija rezultiralo je boljim oporavkom bolesnika [20]. Na životinjama s različitim vrstama tumorima dokazano je antitumorsko i antimetastatsko djelovanje [21]. To je vjerojatno posljedica interakcije zeolita s M-stanicama probavnog trakta kroz koje nanočestice i submikronske čestice zeolita mogu proći i ulaskom u Peyerove ploče potaknuti diferencijaciju i proliferaciju T i B limfocita [22]. M -stanice su slabo glikozilirane te su lako propusne za različite antigene. Kod tumorskih stanica, potencijal na membrani je pozitivniji te bi zeolitna čestica kroz njega lako mogla proći. Budući da tumorske stanice produciraju visoke koncentracije vodikovog peroksida koje mogu reagirati sa zeolitom producirajući slobodne radikale koji dovode u smrt stanice zbog jakog oksidativnog stresa. Membrana normalnih stanica negativnije je nabijena te normalne stanice stvaraju malu količinu vodikovog peroksida, za razliku od tumorskih. Apoptotski učinak na normalnim stanicama je minoran [22]. Nadalje, antioksidativna svojstva zeolita pokazana su posredno

djelovanjem na enzime antioksidativnog sustava. Primjerice, učinak je pokazan u peradi gdje dolazi do povišenja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) i superoksid dismutaze (SOD-a) u jetri i serumu, te snižene razine malondialdehida. Također je ukupni antioksidativni kapacitet u mukozi crijeva bio povišen, dok je razina malondialdehida u jejunumu i ileumu bila snižena, a aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) i glutation peroksidaze (GSH-Px) je bila povišena u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu [23]. Pokazano je i pozitivno djelovanje klinoptilolita u sportaša kod kojih se prilikom intenzivnih aerobnih vježbi javlja oštećenje crijevne barijere, dijareja te razne bakerijske infekcije. Klinoptilolit je pozitivno djelovao na ispitanike koju su ga primali u sklopu svoje dnevne prehrane te je kod njih zabilježena obnova crijevnog integriteta što je i dokazano smanjenom koncentracijom zonulina, biomarkera jačine povezanosti enterocita koji je povišen kod oštećenja crijevne barijere [24]. Studije na ljudima pokazale su da primjena tribomehanički aktiviranog klinoptilolita pomaže u smanjenju etanola u krvi [25]. Studije sa štakorima intoksiciranim neurotoksičnim fluoridom pokazale su da primjena klinoptilolita detoksicira štakore od fluorida [26]. Tribomehanički aktiviran zeolit povećava aktivnost superoksid-dismutaze u modelu transgeničnih miševa koji eksprimiraju Aβ (x-42) amiloidne peptide u hipokampusu. Također dolazi do smanjenja amiloidnih peptida i smanjenja plakova u hipokampusu [27]. Lijek Enterex koji u sebi sadrži klinoptilolit smanjio je dijareju kod ljudi koji imaju različitu etiologiju iste [28].

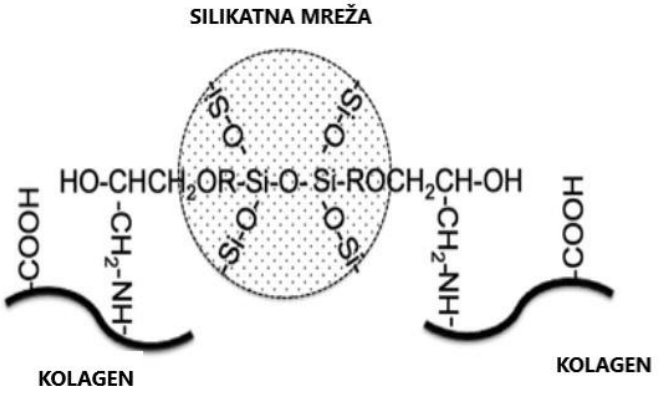
Iako vitamini A i C pomažu održavanju oksidativnog statusa, u nekim slučajevima poput primjerice parcijalne hepatoektomije, njihova dugotrajna upotreba može biti štetna. Stoga je u jednoj studiji na štakorima korišten klinoptilolit koji je smanjio razine malondialdehida u plazmi i jetri, povećao razine cink-bakar superoksid dismutaze (Cu-Zn SOD) i glutationa (GSH) u jetri, te smanjio razinu alanin aminotrasferaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST) u plazmi nakon 70% hepatoektomije u štakora [29].

S obzirom na to da je klinoptilolit pokazao pozitivne učinke u nizu studija, provedena su istraživanja njegovog potencijalno negativnog učinka na razine minerala i vitamina u organizmu s obzirom na ionsko-izmjenjivačka svojstva materijala. Pokazano je kako klinoptilolit ne mijenja fiziološke razine minerala i vitamina [30].

1.2.3. Učinci ortosilicijeve kiseline

Silicij je široko rasprostranjen u prirodi, dok se u biološkim sustavima nalazi u maloj količini te se smatra elementom u tragovima (zastupljen je u razini <0,01% u ljudskom tijelu). Zeoliti otpuštaju malu količinu ortosilicijeve kiseline. Ortosilicijeva kiselina jedina je biološki dostupna forma silicija koju ljudski organizam može apsorbirati. Suplementacija silicijem inducira povišene razine heksozamina, prolina i ukupnih proteina [31].

Zanimanje za ulogom silicija postoji još od 1900. kada se smatralo da je silicij povezan sa stvaranjem kolagena i elastina u vezivnom tkivu. Ukupna količina unesenog silicija u ljudski organizam dnevno iznosi 30 mg. U razinama pH blizu neutralnog i koncentracijama od 2 mM, silicij je prisutan kao ortosilicijeva kiselina. U većim koncentracijama dolazi do polikondenzacije ortosilicijeve kiseline. Poznato je da deficit silicija u organizmu stvara defektno vezivno tkivo i onemogućuje rast kostiju, stoga se pretpostavlja njegova uloga u povezivanju polimernih molekula elastina i kolagena kako je prikazano na slici 8. [32].



Slika 8. Umrežavanje silikata i kolagena. Adaptirano prema [33].

Silicij utječe na apsorpciju aluminija, bakra, magnezija i drugih elemenata. Studije *in vitro* pokazale su da ortosilicijeva kiselina stimulira stvaranje kolagena tipa 1 u

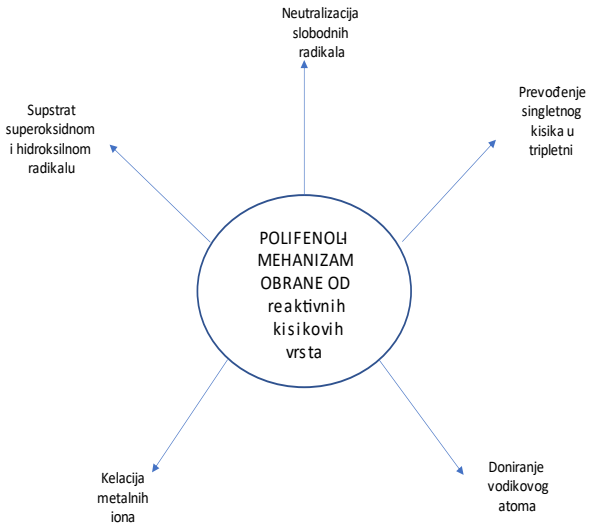
ljudskim osteoblastima i uzrokuje njihovu diferencijaciju [34]. Silicij se, također, u obliku silikatne keramike i bioaktivnog stakla upotrebljava kao implantat koji uzrokuje osteoblastičnu proliferaciju, stvaranje apatita i sintezu kolagena tipa 1 [35]. Eksperimenti *in vitro* pokazuju da monometilsilanetriol u koncentraciji od 10 mg/L uzrokuje proliferaciju limfocita i smanjuje proliferaciju limfoblasta. Monometilsilantriol se u kontinentalnoj Europi koristi kao nadomjestak za silicij. To je organosilikonska molekula koja pozitivno utječe na vezivno tkivo, kosti, krvne žile i brzo ulazi u krv te se pretvara u ortosilicijevu kiselinu [36]. Viša koncentracija ortosilicijeve kiseline u vodi povezana je s manjim rizikom obolijevanja od Alzheimerove bolesti. Nakon ingestije ortosilicijeva kiselina se izlučuje urinom u razdoblju od 4 do 8 sati [37]. U mezenhimalnim matičnim stanicama ortosilicijeva kiselina povećava ekspresiju osteokalcina i alkalne fosfataze. Pozitivna regulacija osteoblastne diferencijacije odvija se putem miR-146a i suprimiranjem TNF-α inducirane aktivacije NF-κB. [38].

Silicij se nalazi u koži, kostima, kosi i noktima. Gornja dnevna doza iznosi 700 mg/danu za odrasle, a njegov unos u organizam slabi starenjem sve do 20 mg/danu što je potvrdila randomizirana kontrolirana studija na starijim ženama u Velikoj Britaniji [39]. Kolinom stabilizirana ortosilicijeva kiselina u dozi od 1 mg/kg tjelesne težine prevenira gubitak mase kostiju u natkoljenici kod starijih ovariektomiziranih štakora [40].

1.3. Oksidativni stres

Male količine reaktivnih oksidativnih vrsta poput hidroksilnog radikala, superoksidnog aniona i vodikovog peroksida uvijek su prisutne u stanici. Iako su takve kemijske jedinke uključene u biološke procese u stanici, kao što su proliferacija, diferencijacija, smrt stanice i regulacija rasta stanice [41, 42], njihova prekomjerna količina pak može oštetiti stanične proteine, lipide te deoksiribonukleinsku kiselinu. Stanje u kojem su reaktivne oksidativne vrste prisutne u većoj količini od endogenih antioksidativnih vrsta naziva se oksidativnim stresom, tj. stanica antioksidativnim vrstama ne može eliminirati visoke razine reaktivnih kisikovih i dušikovih jedinki. To stanje može voditi stanicu u razvoj tumora i drugih bolesti. Stanica se na svoj način može braniti od takvih jedinki glutationom, bilirubinom, α-tokoferolom, vitaminom C, vezanjem prooksidativnih metala za

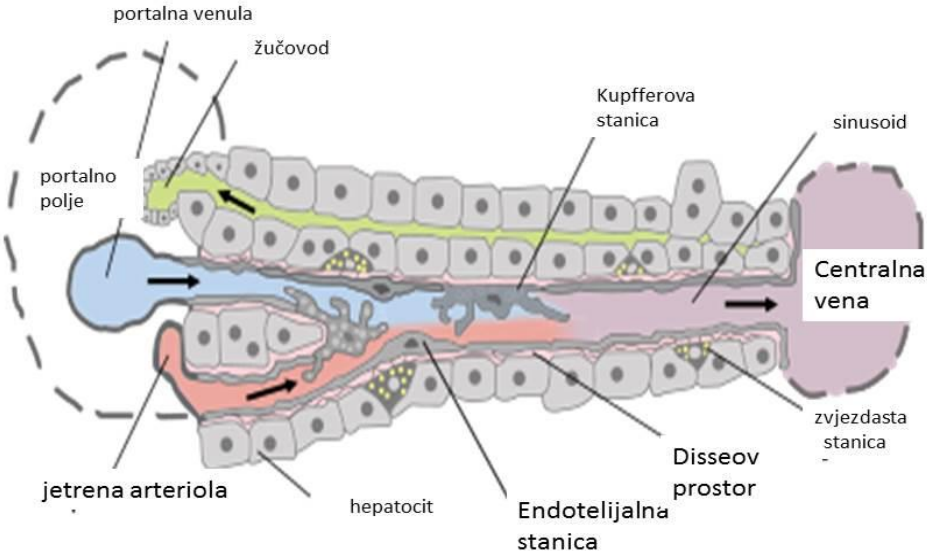
određene proteine, katalizom enzimskih sustava i zaštitom makromolekula pomoću enzima katalaza, superoksid dismutaza (SOD) i glutation peroksidaza. Postoje i molekule s antioksidativnim učinkom koje se u organizam unose hranom poput primjerice biljnih flavonoida [43].



Slika 9. Mehanizmi djelovanja polifenola protiv reaktivnih kisikovih vrsta. Preuzeto iz [43].

1.4. Jetra

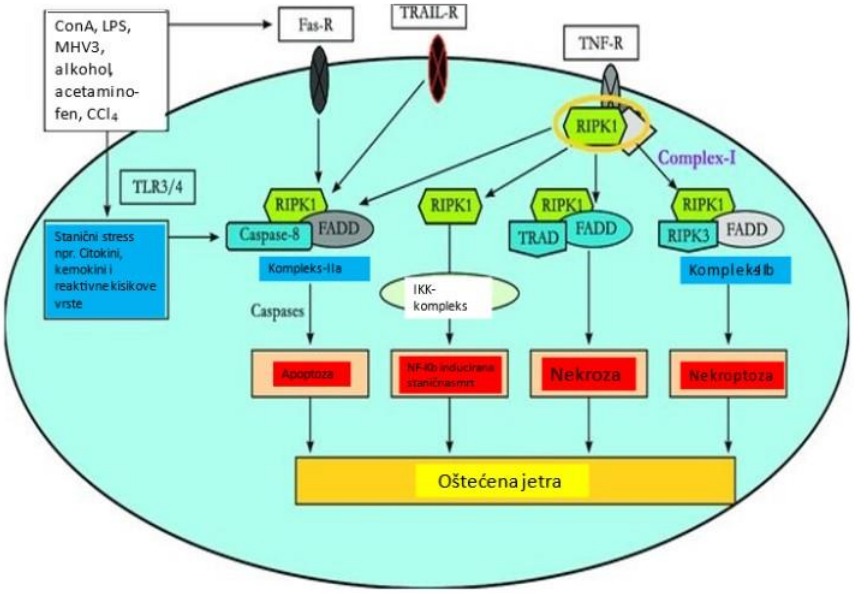
Jetra je glavni metabolički organ, a njezina funkcija je mnogostruka. Sudjeluje u produkciji žuči, regulaciji proteina plazme, glukoze, biotransformaciji lijekova i toksina. Oko 80% apsorbiranih tvari iz crijeva dospijeva do jetre portalnom venom, dok ostatak unesen drugim putevima dolazi u jetru hepatičnom arterijom. Jetra se sastoji od četiri tipa stanica: hepatociti, endotelijalne stanice, Kupfferove stanice i zvjezdaste stanice (slika 10.). Glavna funkcija hepatocita je sinteza i sekrecija mnogobrojnih proteina, proizvodnja glikogena i detoksikacija organizma P450 (CYP) enzimima. Endotelne stanice služe kao barijera između krvi i hepatocita, dok Kupfferove stanice imaju funkciju makrofaga. Zvjezdaste stanice skladište masti i vitamin A. Komunikacija ovih stanica primarno se odvija putem citokina [44,45] .



Slika 10. Citološka građa jetre. Adaptirano prema [46]. Slika opisuje stanice koje grade jetru te vene i arterije jetre.

Formiranje žuči bitno je za sekreciju otpadnih tvari iz jetre, a detoksikacija ksenobiotika odvija se u dvije faze. U aktivacijskoj reakciji događaju se reakcije oksido-redukcije i hidrolize, dok se u drugoj fazi događa sinteza konjugata sa sulfatom, glukuronskom kiselinom, glutationom, acetatom i glicinom gdje jetra prevodi metabolite u ekskrecijske produkte. U fazi I detoksikacije organizma sudjeluju enzimi P450 (CYP) koji se nalaze u membrani hepatocita. Tijekom ovog procesa mogu se formirati slobodni radikali koji mogu oštetiti jetru. Jetra je i imunosni organ, s obzirom da se tijelo mora braniti od direktnog napada koji u jetru dolazi iz crijeva u krv. Glavne stanice imunosonog sustava u jetri su Kupfferove, NK, NKT i $CD4^+$ T stanice, i dendritične stanice. Jetra tako izlučuje proteine akutne faze, komponente komplementa, citokine i kemokine [45]. Tijekom akutne faze bolesti jetre, aktivirane Kupfferove stanice mogu producirati IL-1, IL-6 i TNF-α. Time dolazi do regrutacije leukocita i formiranja fibroze na mjestu upale. Fibrozna jetre može se regenerirati, npr. antitijelima usmjerenim na TNF-α, kako je pokazano u miševima, ali i drugim lijekovima (biljni preparati poput *Purena lobata, Astragalus complanatus, Glycyrrhiza*

glebra, Cichorium glandulosum, Silybum marianum [47]) odnosno funkcionalnom hranom (npr. polifenoli iz kakaa kojeg ima u čokoladi) [48]. TNF-α kao glavni citokin koji izlučuju Kupfferove stanice može aktivirati proapoptotičke proteine, npr. kaspaze, ili pak antiapoptočke proteine uključene u signalni put NF-κB [49]. Signalni put koji inducira TNF-α prikazan je na slici 11.



Slika 11. Signalni put TNF-α u jetri i mehanizmi oštećenja jetre izazvani egzogenim uzročnicima. Preuzeto i adaptirano prema [50]. R-receptor, ConA-konkanavalin A, LPS-lipopolisaharid, MHV3-mišji hepatitis virus-3, CCl_4-tetrakloruglljik, RIPK (1,3)-receptor interagirajuća protein kinaza (1,3), FADD-Fas asocirana apoptotička domena, TRAD- TNF-receptorski apoptotički protein 1, TLR3/4- Toll -u sličan receptor, IKK-podjedinica inhibitora nuklearnog faktora kapa B-kinaze, TRAIL-TNF-receptorska superobitelj.

Oksidativni stres u jetri također doprinosi fibrogenezi stvarajući kolagen tipa I iz zvjezdastih stanica koje otpuštaju profibrogenične citokine, faktore rasta i prostaglandine. Citokin TNF-α može povisiti oksidativni stres u stanici što vodi do mitohondrijske disfunkcije. Redoks osjetljivi signalni putevi poput JNK i p38MAPK igraju značajnu ulogu u jetre i oksidativnom stresu [49].

1.5. Metali

Svi se elementi u prirodi mogu razvrstati u metale, polumetale i nemetale. Od 125 poznatih elemenata više od 80 može se klasificirati u skupinu metala. S obzirom na njihovu ulogu u ljudskom organizmu, metali se mogu podijeliti na esencijalne, one s mogućim korisnim učincima te potencijalno štetne kako je prikazano u tablici 1. [51].

Tablica 1. Podjela metala s obzirom na njihov efekt na ljudski organizam

Neki esencijalni metali	Metali s mogućim korisnim učincima	Metali s potencijalno štetnim učincima
Kobalt (Co)	Bor (B)	Aluminij (Al)
Krom (III) (Cr)	Nikal (Ni)	Antimon (Sb)
Bakar (Cu)	Silicij (Si)	Arsen (As)
Željezo (Fe)	Vanadij (V)	Barij (Ba)
Mangan (Mn)		Berilij (Be)
Molibden (Mo)		Kadmij (Cd)
Selen (Se)		Olovo (Pb)
Cink (Zn)		Živa (Hg)
		Srebro (Ag)
		Stroncij (Sr)
		Talij (Tl)

Esencijalni elementi (minerali i metali) u ljudskom tijelu su podijeljeni u skupine [52]:

Četiri bazična elementa koji grade organske spojeve:H, C, N, O

Količinski elementi: Na, Mg, K, Ca, P, S, Cl

Esencijalni elementi u tragovima: Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Se, I

Elementi koji nemaju specifično identificiranu biološku funkciju, ali su važni u fiziologiji čovjeka: Li, V, Cr, B, F, Si, As

Topljivost je karakterističan faktor koji određuje bioraspoloživost minerala (makrominerala i mikrominerala koji mogu biti metali i nemetali) i metala i njihovih spojeva. Topivost ovisi o vrsti, pH i prisutnosti drugih spojeva u njihovom okruženju. Što je bolja topivost metala veća je i njihova bioraspoloživost [53]. Analitičke metode koje se koriste za kvantitativno određivanje metala su: atomska apsorpcijska spektrometrija, induktivno spregnuta plazma s atomskom i masenom spektrometrijom, atomska fluorescencijska spektrometrija, X-ray fluorescencija, neutronska aktivacijska analiza i elektrokemijske metode. Separacijske tehnike u određivanju metala, a mogu biti spregnute s kvantitativnim metodama određivanja metala, uključuju tekućinsku kromatografiju, plinsku kromatografiju, ionsku kromatografiju i kapilarnu elektroforezu, tako da postoje mnogobrojni spregnuti sustavi poput: tekućinska kromatografija-atomska adsorpcijska spektroskopija (LC-AAS), LC-AES (tekućinska kromatografija-atomska emisijska spektroskopija), LC-ICP-MS (tekućinska kromatografija-induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija), GC-MS (plinska kromatografija-masena spektrometrija), CE-ICP-MS (kation izmjenjivačka-ion induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija) itd.

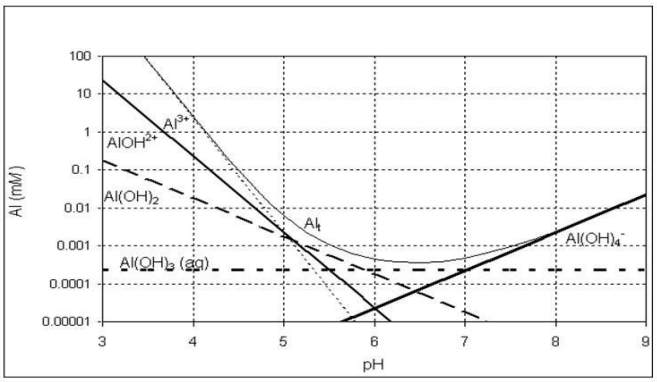
1.6. Aluminij

Aluminij je metal trinaeste grupe periodnog sustava koji u organizmu nema fiziološku ulogu. Znanstvena istraživanja pokazala su njegovu toksičnost za sisavce. Naime, nakupljanje aluminija u tkivima povezuje se sa bolestima neurološkog sustava poput Alzheimera, Parkinsonove bolesti, amiotrofične lateralne skleroze i Downova sindroma [53]. Jedina postojeća terapija protiv trovanja aluminijem je primjena desferioksamina, kelatnog liganda koji se koristio pri liječenju prekomjerne količine željeza. Budući da desferioksamin pokazuje mnogobrojne štetne učinke, bilo bi svrsishodno ustanoviti terapiju bez neželjenih nuspojava prilikom trovanja organizma aluminijem. Budući da zeoliti otpuštaju malu količinu ortosilicijeve kiseline koja stvara kompleks s aluminijem, logično je za pretpostaviti da bi se zeoliti mogli koristiti prilikom trovanja aluminijem za ublažavanje ulaska i nakupljanja aluminija u tijelu. Aluminij se može naći u hrani, vodi, ali i u farmaceutskim proizvodima poput antacida i cjepiva. Prijašnje studije objavljene u 1970-im godinama ukazivale su na to kako aluminij nije prijetnja ljudskom organizmu [55]. Globalne klimatske promjene s

posljedicom kiselih kiša povećale su otapanje aluminija iz okoliša što za posljedicu ima povećanje razine aluminija u čitavom ekosustavu [56].

Obrambeni sustav našeg organizma na zadovoljavajući se način može zaštiti od kontaminacije aluminijem, no događali su se slučajevi toksičnog trovanja, što je najviše utjecalo na pacijente na dijalizi. Koncentracija aluminija kod njih je bila povišena što je za posljedicu imalo i smrtne slučajeve. Kronična ingestija dovela je do razvoja encefalopatije, osteomalacije i mikrocitičke anemije posebno u bolesnika s narušenom bubrežnom funkcijom [57]. Danas se stoga koriste suvremene metode za pročišćavanje vode gdje razina aluminija ne smije biti veća od 0,2 mg/L, posebno u klinikama koje vrše dijalizu bubrežnih bolesnika [58].

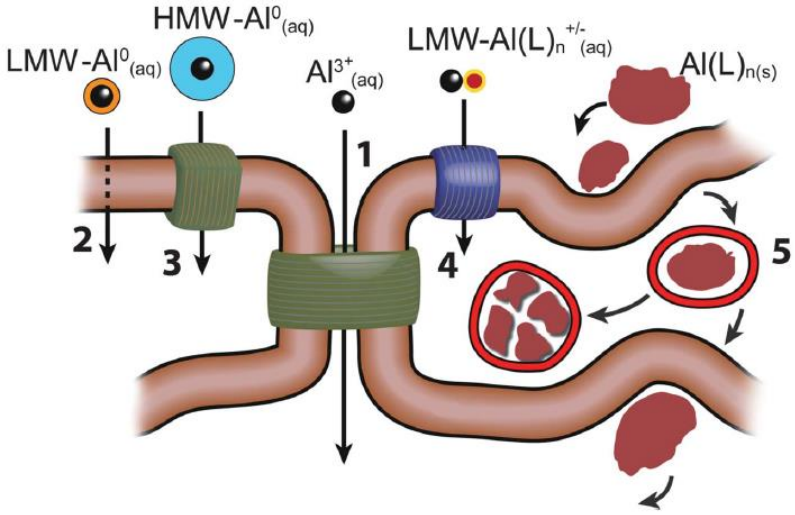
Kemija aluminija jako je kompleksna. Dokazane aluminijeve forme u vodi ovise o njegovoj koncentraciji, pH, ligandu i soli. Potenciometrijska istraživanja i studije elektrosprej ionizacije-masene spektrometrije dokazala su postojanje više formi, što se može vidjeti na slici 12.



Slika 12. Topljivost aluminijevih vrsta (Alt predstavlja ukupni aluminij) u odnosu na pH u sustavu u ravnoteži s mikrokristaliničnim gibsitom (0.001 mM = 0.027 mg/L).[59]

U vodenoj otopini aluminij podliježe hidrolizi i stvara različite komplekse s vodom i ligandom. Anorganske soli aluminija kao klorid, sulfat i perklorat u koncentraciji od 10 mM pokazuju topljivu formu aluminija u koncentraciji od 50 μM, dok organski ligandi poput laktata i maltonata oko 55-330 μM, a maltalat i glukonat u koncentraciji od

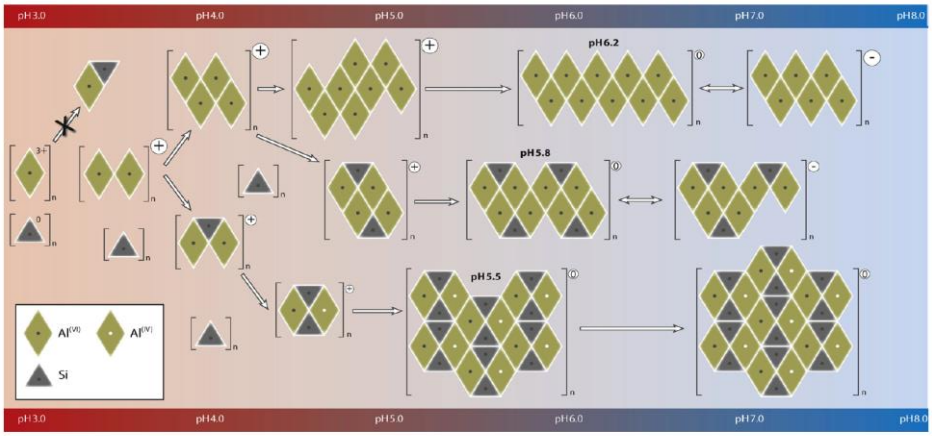
4000-6000 μM [60]. Sve je to bitno za njegovu biodistribuciju u organizmu jer se topljivi kompleksi apsorbiraju u probavnom traktu i toksičnost je veća. Aluminij pokazuje afinitet ka vezanju fosfora i kisika kao liganda pa se smatra da veže fosfatne skupine koje su prisutne u stanici poput nukleotida i stanične DNA, ali isto tako s karboksilnim kiselinama poput citrata [54]. Toksičnost za pojedini organ ovisi o dozi koju je primio, a postoji hipoteza da aluminijev klorid inducira stvaranje superoksidnog kation-radikala [61]. Budući su slobodni radikali visokoreaktivne kemijske molekule mehanizam toksičnog djelovanja aluminijevog klorida može ukazati na nastanak oksidativnog stresa u stanici [61]. Poznat je i njegov utjecaj na homeostazu željeza, koji može također uzrokovati oksidativni stres Fentonovom reakcijom [62]. Naglom eksploatacijom aluminija iz ruda u industrijske svrhe puno aluminija završi kao otpad u okolišu te može ući u biota. Dokaz za to su akutni pomor riba ili slabi rast biljaka na područjima u kojima je došlo do ispuštanja aluminija [56]. Iako je u ljudskom organizmu prisutno 61 mg aluminija, veće su količine toksične za ljudski organizam [63]. Ustanovljeno je da dnevni unos aluminija u organizam danas iznosi oko 30 mg/danu [56]. Pretpostavlja se da će do 2050. dnevni unos aluminija biti oko 100 mg/danu, dok gastrointestinalni trakt apsorbira oko 0,1%-1%. [56]. Također su poznati putevi apsorpcije različitih spojeva aluminija kako je prikazano na slici 13.



Slika 13. Prikazuje prijenos aluminijevih spojeva preko membrane.

1) paracelularno (ioni aluminija), 2) transcelularno (niskomolekularni neutralni aluminijevi spojevi), 3) aktivni transport (visokomolekularni neutralni aluminijevi spojevi), 4) preko ionskih kanala (niskomolekularni nabijeni aluminijevi kompleksi) 5) apsorpcija ili receptorom posredovana endocitoza (nano i mikročestice aluminija). Preuzeto iz [56].

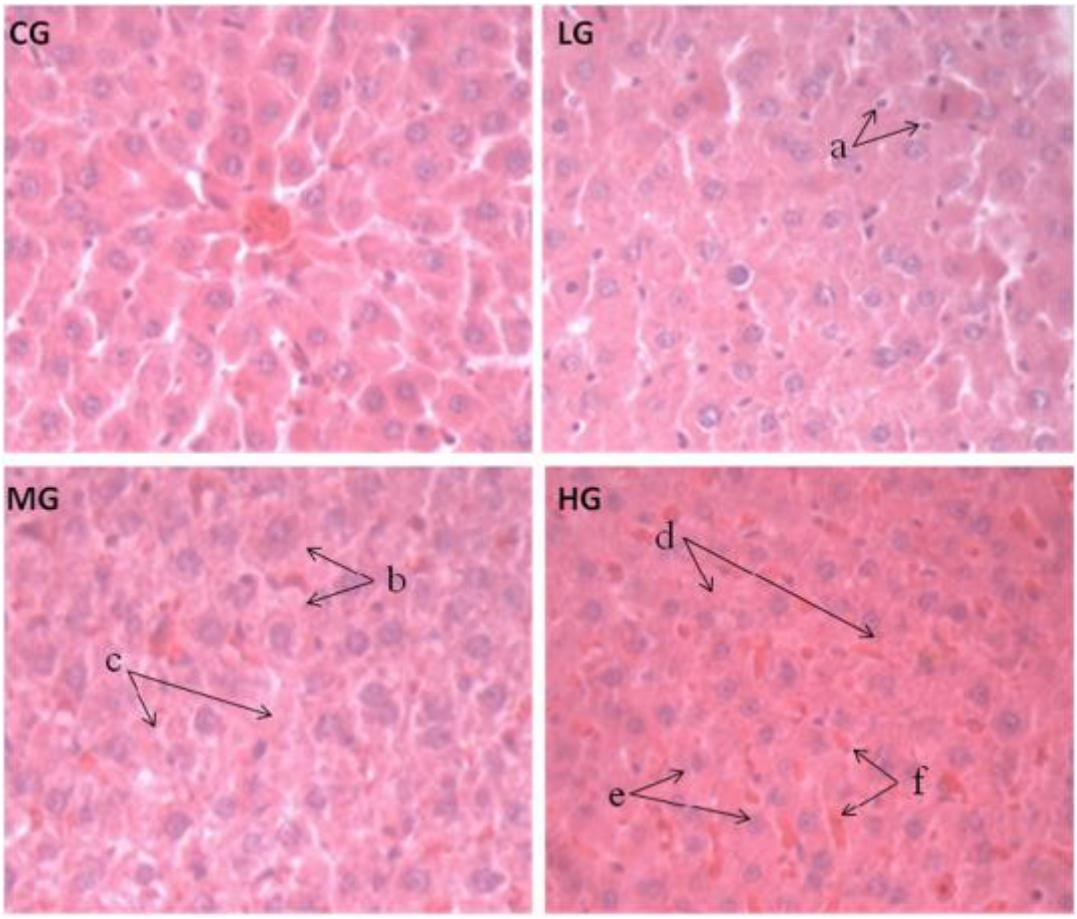
Smatra se kako su evolucijski silicij i njegovi topivi oblici poput primjerice ortosilicijeve kiseline, ključni u detoksikaciji viših organizma od aluminija [64,65]. Inertni spojevi aluminija koji se mogu stvarati u reakciji s ortosilicijevom kiselinom prikazani su na slici 11. Naime radi se o hidroksialuminosilikatima (kratica HAS) koji postoje u dvije forme: HASa i HASb, ovisno o omjeru aluminijevog hidroksida i ortosilicijeve kiseline. Njihova građa u ovisnosti o pH prikazana je na slici 14.



0

Slika 14. Prikazuje nukleaciju i rast hidroksialuminosilikata ovisno o pH vrijednosti. Preuzeto iz [64].

Toksičnost aluminija istraživana je na životinjskim modelima. Tako je primjerice pokazano kako su miševi intoksicirani aluminijevim solima imali niže razine kalcija u jetri dok je razina proteina bila također snižena, lipidna peroksidacija povišena, razina superoksid dismutaze snižena kao i razine katalaze i glutation peroksidaze. Markeri oštećenja jetre aspartat-transferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), alanin-aminotransferaza (ALT) bili su povišeni što ukazuje na oštećenje jetre, a što je potvrđeno histopatološkim nalazom [66]. Histopatološke promjene jetre nakon tretmana različitim dozama aluminijevog klorida prikazane su na slici 15. [67].



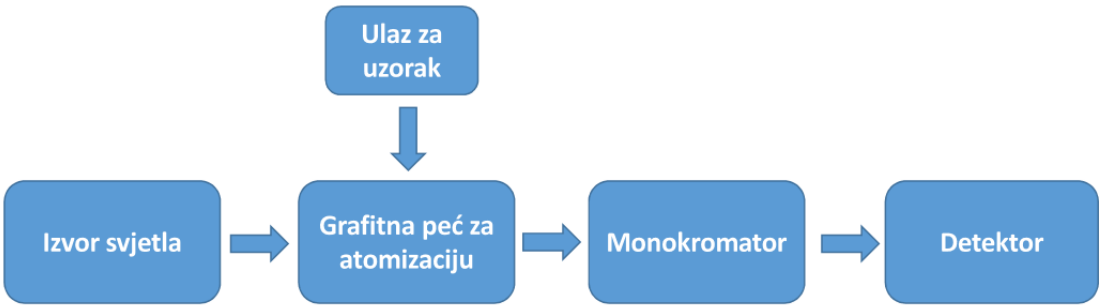
Slika 15. Promjene na jetri pri različitim dozama aluminijevog klorida, CG-kontrolna grupa, LG-niska doza aluminija, MG-srednja doza aluminija, HG-visoka doza aluminija, a-infiltracija imunosnih stanica, b-nejasni rubovi stanica, c-fuzionirani hepatociti, d-poremećaj hepatičkog čvora, e-kariopiknoza, f-intrahepatička hemoragija. Preuzeto iz [67].

U drugom pokusu pokazano je, također, kako se aluminij u ovisnosti o duljini tretmana aluminijevim solima nakuplja u jetri, snizuje razinu enzima CYP450 i proteina u mikrosomima jetre. Apoptoza hepatocita utvrđena je kao jasan pokazatelj bolesti jetre i fibroze. Letalna doza aluminijevog klorida u eksperimentalnim štakorima iznosi 1283,60 mg/kg [67].

1.7. Visokopropusne tehnologije za analizu metala i njihovih učinaka na organizam

1.7.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom tehnikom (AAS-GF)

Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom tehnikom (AAS-GF) (Slika 16.) koristi se za elementu analizu različitih uzoraka, primjerice bioloških tekućina, uzoraka iz okoliša, hrane i lijekova. Ovom tehnikom mala količina uzorka stavlja u šuplju grafitnu cijev gdje se zagrijava do točke uklanjanja uzorka odnosno sagorijevanja nečistoća (do usijavanja), što najčešće iznosi 2500 do 2700 °C. Atomizirani analit stvara prolazni apsorpcijski signal što se ujedno i mjeri ovom tehnikom [68].



Slika 16. Shematski prikaz metode AAA-GF.

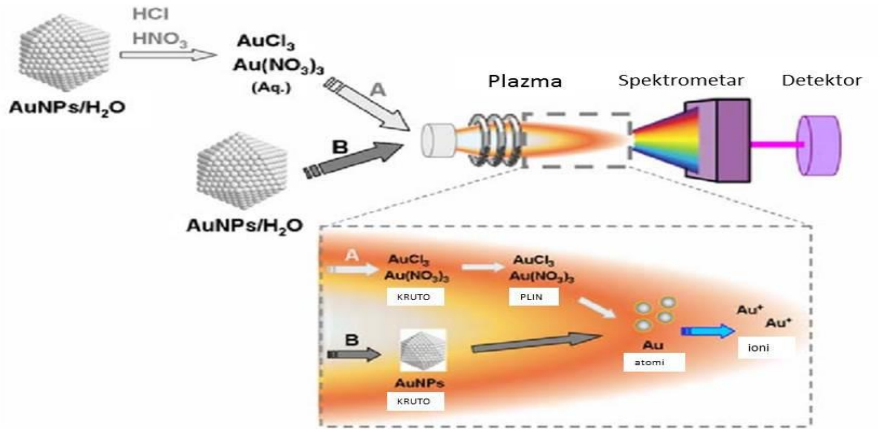
1.7.2. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) i emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom ICP-MS komercijalno je uvedena 1983. godine, a služi za određivanje malih (submikrogramskih) koncentracija mnogih elemenata u vodenim uzorcima, ekstraktima i digestivnim uzorcima. Metoda je pogodna za određivanje više od 60 elemenata u različitim matricama [69,70]. Metoda je analitički osjetljiva te se koristi za određivanje razina niza metala i nemetala u koncentracijama čak jedan prema trilion. Danas se primjenjuje i za detekciju organskih i organometalnih spojeva, nukleinskih kiselina, fosfolipida i metaloproteina [71].

Ukoliko se element može odrediti uz pomoć ICP-MS, a vezan je na organsku molekulu, moguće je odrediti količinu kemijskog spoja pod uvjetom da je poznat njezin stehiometrijski sastav. Na tom se principu temelji određivanje biomolekula ovom metodom.

Metoda se sastoji od induktivno spregnute plazme i masenog spektrometra. Induktivno spregnuta plazma kao izvor koristi električnu struju koja je proizvedena elektromagnetskom indukcijom. Uglavnom se upotrebljava plemeniti plin, često argon za produkciju plazme koja može dosegnuti temperaturu od 7000 K, tako da svaka molekula ili atom pri takvim temperaturama bivaju raspadnuti na gradivne elemente (ione) koji se mogu odrediti masenom spektrometrijom prema omjeru mase i naboja m/z [71].

Osobine ove metode su visoka osjetljivost, širok dinamički linearni detekcijski raspon te specifičnost i točnost detekcije. Mogu se koristiti tekući, plinoviti i kruti uzorci. Za to postoje i različito spregnuti sustavi poput plinske kromatografije za plinovite uzorke, tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza za tekuće uzorke i laserska ablacija za krute uzorke [71].



Slika 17. Određivanje zlatnih nanočestica ICP-MS-om, kao i dijelovi uređaja. Preuzeto i adaptirano prema [72].

1.8. DNA-mikročipovi

Tehnologija DNA-mikročipova se pojavila devedesetih godina dvadesetog stoljeća napretkom nanotehnologije i minijaturizacije uređaja te potrebom za simultanom analizom ekspresije genoma određenog organizma. Mikročipovi DNA prema definiciji skupina su metoda u kojima je specifična DNA-sekvenca postavljena ili sintetizirana kovalentno ili nekovalentno na površinu čipa. Metoda se rapidno razvija 1990-tih i 2000-tih kao odgovor na flurescentnu detekciju koja ima prednost nad pojedinačnim eksperimentima koji se temelje na analizi ekspresije jednog ili manjeg broja gena uz detekciju kemiluminiscencijom ili radioaktivnim obilježavanjem. Metoda je idejno i tehnološki začeta 1965-te kada su Gillespie i Spieglman imobilizirali DNA na membranu koja može vezati komplementarnu RNA ili DNA specifičnom hibridizacijom. Kompletni eukariotski ekspresijski genom kvasca (Saccharomyces cerevisiae) je objavljen 1997. kao prvi analizirani genom [73].

Postoje dvije vrste mikročipova: cDNA mikročipovi i oligonukleotidni čipovi. Mikročipovi cDNA se sintetiziraju na staklu kao dvostruki lanci DNA upotrebom robotskih igala. Oligonukleotidni mikročipovi se sintetiziraju i utiskuju na staklenu površinu određenim redoslijedom upotrebljavajući metodu fotolitografije. In situ

sintetizirani mikročipovi kemijski se sintetiziraju na čvrstom substratu te je za njih potrebna mala količina kemikalija (4 nukleotida te reagensi za deblokiranje i sastavljanje) [74,75]. Tehnologija mikročipova koju koristi Agilent, a koju smo primijenili u ovom doktoratu temelji se na metodi tzv. „inkjet“ tehnologije koja koristi in situ sintezu oligonukleotida pri čemu dolazi do kemijske reakcije nukleotidnih fosforamidita s hidroksilnim skupinama na staklenoj podlozi. Metoda DNA mikročipova je uspješna za globalne genomske analize. Danas na raspolaganju postoje mikroRNA (miRNA) mikročipovi kojima se analizira status ekspresije nekodirajućih miRNA molekula, čipovi za komparativnu hibridizaciju čitavog genoma (CGH čipovi) kojima se analiziraju delecije ili duplikacije unutar genoma, i ekspresijski mikročipovi kojima se analizira ekspresija čitavog genoma. Tipična DNA-mikročip analiza (diferencijalna ekspresijska analiza) sastoji se od slijedećih koraka:

1. RNA ekstrakcija iz stanica ili tkiva

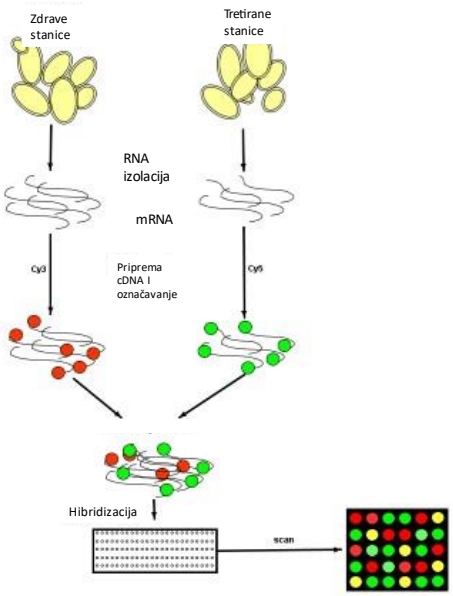
2. Označavanje RNA molekule (primjerice fluorescentnim nukleotidima ili biotinom, često tijekom reverzne transkripcije)

3. Hibridizacija oligonuklotida DNA mikročipa s obilježenim cRNA ili cDNA molekulama na površinu čipa.

4. Skeniranje signala

5. Analiza slike dobivene skeniranjem DNA mikročipa

6.Obrada tekstualne datoteke u bioinformatičkom programu koja uključuje normalizaciju, filtriranje i statističku analizu. Rezultat je obično podatak o promjenjeno eksprimiranom genu sa zadanom statističkom značajnošću (najmanje $p<0,05$).



Slika 18. Proces mikročip analize. Preuzeto i adaptirano prema [76].

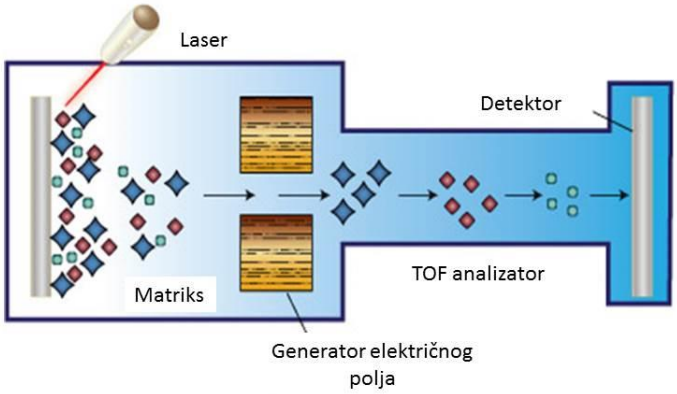
Mikročipovi DNA nalaze veliku primjenu u biomedicini. Upotrebljavaju se u analizi diferencijalne genske ekspresije, detekciji biomarkera, u razjašnjavanju molekularnog profila bioloških uzoraka, identifikaciji prognostičkih gena, detekciji genetičkih poremećaja, epigenetici i metilaciji DNA, genskom polimorfizmu, genetičkoj kontroli i transkripcijskoj regulaciji te detekciji patogena [77,78]. U današnje vrijeme sekvencioniranje RNA molekula postaje sve jeftinije tako da se pretpostavlja da će ta metoda vjerojatno istisnuti DNA mikročipove iz komercijalne upotrebe [79].

1.9. Proteomika

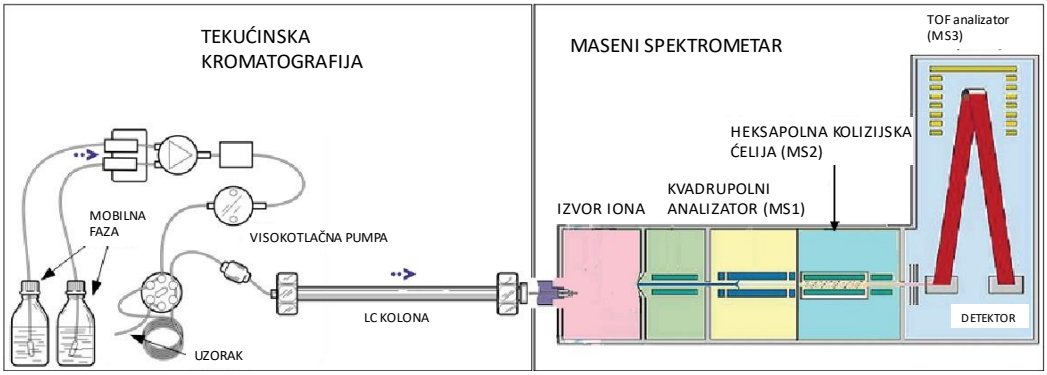
Proteomika je metoda izučavanja ukupnih proteina (proteoma, proteinskog komplementa genoma) u stanici, tkivu ili organizmu. Područje istraživanja discipline proteomike može se podijeliti na ekspresijsku, strukturnu i funkcionalnu [80,81]. Budući je korelacija genske ekspresije s DNA mikročipovima i ukupno eksprimiranih proteina relativno niska, za podrobnije analize potrebno je osim transkriptoma istražiti i proteom stanice [82].

Metode koje se koriste u ekspresijskoj proteomici dijele se na one temeljene na poliakrilamidnim gelovima i onima bez gela. Jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza se u prvoj grupi metoda koriste za separaciju proteina iz smjese koji se potom identificiraju uz pomoć spektrometrija masa. U jednodimenzionalnoj elektroforezi ukupno ekstrahirani proteini iz stanice ili tkiva podvrgnuti su SDS-elektroforezi. Nakon toga slijedi analiza slike i izrezivanje diferencijalno eksprimiranih proteinskih traka digestiji proteina koji će se podvrgnuti masenoj spektrometriji u svrhu identifikacije diferencijalno eksprimiranih proteina. U dvodimenzionalnoj elektroforezi prva metoda razdvajanja proteina iz smjese je izoelektrično fokusiranje u kojem proteini u amfolitnom gelu bivaju odijeljeni na temelju izoelektrične točke, a zatim slijedi elektroforeza u drugoj dimenziji na SDS-poliakrilamidnom gelu pri čemu se proteini odvajaju na temelju mase. Diferencijalne razlike, točke na gelu, između dva uzorka na temelju analize slike izrezuju se iz gela i podvrgavaju masenoj spektrometriji radi karakterizacije [83]. Najčešće se u ovakvom eksperimentalnom set-upu koristi masena spektrometrija MALDI-TOF/TOF, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom MALDI (engl. Matrix assisted laser desorption/ionization) u uređaju s analizatorom preleta leta (engl. time-of-flight TOF). MALDI spada u „meke“ tehnike ionizacije u proteomici u kojoj se izolirani uzorak za analizu miješa s matricom, nanosi se na pločicu te se podvrgava laserskom zračenju koji ionizira uzorak. MALDI je spregnut s TOF analizatorom. Količina iona i njihovo vrijeme leta se snimaju te se signal prevodi u maseni spektar pri čemu je na x-osi nanesen omjer m/z, a na y-osi relativna količina iona. Na slici 19. prikazan je tipičan MALDI-TOF maseni spektrometar sa svojim građevnim dijelovima.

U gel slobodnoj proteomici, uzorak u otopini se odmah podvrgava triptičkoj digestiji, nakon čega slijedi separacija uz pomoć tekućinske kromatografije te karakterizacija proteina uz pomoć spektrometrije masa, često tandemske masene spektrometrije [84]. Slika tandemske masene spektrometrije prikazana je na slici 20.



Slika 19. MALDI/TOF spektrometar. Preuzeto i adaptirano prema Pharmaceutical Microbiology (pharmamicroresources.com)



Slika 20. Tandemska masena spektrometrija. Preuzeto i adaptirano prema [85].

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog doktorata bio je utvrditi potencijal klinoptilolita za detoksikaciju, posebice aluminija *in vitro i in vivo*. Ispitivanja su se u tu svrhu provela s četiri vrste zeolita: zeolitom A (sintetski zeolit), jednostruko tribomehaničko aktiviranim klinoptilolitom TMAZ (prirodni zeolit), dvostruko aktiviranim klinoptilolitom PMA (prirodni zeolit) i dvostruko aktiviranim oksigeniranim klinoptilolitom PMAO2 (prirodni zeolit).

Specifični ciljevi:

- Analiza fizikalno-kemijskih karakteristika zeolita.
- *In vitro* analiza kapaciteta ionske izmjene ili adsorpcije teških metala (kontaminanata) zeolita *in vitro* u modelnim otopinama koje imitiraju pH želuca i crijeva čovjeka.
- *In vivo* analiza detoksikacijskog potencijala zeolita, s naglaskom na aluminij, u štakora koji primaju subkronične doze aluminijevog klorida u kombinaciji s testiranim zeolitima.
- Analiza sistemskih molekularnih mehanizama djelovanja klinoptilolita analizom globalne ekspresije gena i proteina u jetri štakora koji primaju subkronične doze aluminijevog-klorida u kombinaciji s testiranim zeolitima.

Hipoteze istraživanja:

1. Fizikalno-kemijske karakteristike testiranih zeolita razlikovat će se kao posljedica različitog sastava/strukture umjetnog zeolita i prirodnih zeolita kao i zbog razlike u aktivnoj površini istog zeolita (klinoptilolita) što je posljedica razlika proizvodnog procesa testiranih klinoptilolitnih materijala.
2. Svi zeoliti pokazat će određeni potencijal u vezanju teških metala *in vitro* u modelnim otopinama koje imitiraju pH želuca i crijeva.
3. Kapacitet ionske izmjene ili adsorpcije teških metala (kontaminanata) zeolita *in vitro* u modelnim otopinama koje imitiraju pH želuca i crijeva čovjeka ovisit će o afinitetu zeolitnog materijala prema određenim kationima i razlikovat će se s obzirom na vrstu zeolita.
4. Klinoptiloliti će uspješno smanjiti količinu aluminija u krvi i ostalim organima štakora koji primaju subkronične doze aluminijevog klorida. Budući je zeolit A

nestabilan, u uvjetima *in vivo* te posljedično ulaska aluminija u krv životinja, doći će do povećanja količine aluminija u krvi i/ili organima štakora tretiranih zeolitom A.

5. Klinoptilolitni zeoliti promijenit će ekspresiju gena i proteina u jetri štakora koji primaju subkronične doze aluminijevog klorida, osobito se očekuje promjena ekspresije gena i proteina koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika i oksidativni stres.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci zeolita

Zeolitni klinoptilolitni materijali dobiveni su od tvrtke Panaceo International Active Mineral Production Gmbh, Austrija. Sintetski zeolit A bio je od tvrtke A. E. Fischer-Chemie (Njemačka). Prirodni klinoptilolit TMAZ mikroniziran je metodom tribomehaničke mikronizacije, a zeolit PMA (Panaceo Micro Activation) proizveden je tehnologijom dvostruke aktivacije (mikronizacije) (patent WO / 2018/100178). Zeolit PMAO2 dobiven je istom metodom kao PMA uz oksigenaciju.

3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

3.2.1. Infracrvena spektroskopija tehnikom KBr pastile

Postupak: Korištena je tehnika KBr pastile. Metoda priprave sastoji se od homogeniziranja male količine uzorka i KBr u omjeru 1:100 uz pomoć tučka u tarioniku. Tako priređena homogena smjesa prebaci se u cilindar za uzorke i hidrauličnom prešom ispreša u tanku pločicu. Priređena KBr-pastila se potom uloži u odgovarajući nosač uzoraka za snimanje vibracijskih spektara. Spektri su snimani u području 4000-450 cm^{-1} na Spectrum RXI, FT-spektrometru (Perkin-Elmer, SAD). Dobiveni podaci su obrađeni pomoću javno dostupnog računalnog programa Spekwin32 (https://www.effemm2.de/spekwin/index_en.html). Za potrebe analize klinoptilolitnih materijala određene su površine za netretirane klinoptilolite, klinoptilolitne materijale u modelnoj otopini želuca i crijeva pomoću programa ACD/Labs/Spectrum processor. Time se može generirati metoda za određivanje omjera Si/Al u različitim klinoptilolitnim materijalima u različitim medijima u korelaciji s dobivenim rezultatima XPS-analize na temelju baždarnih pravaca. Metoda bi mogla poslužiti za brzu provjeru kvalitete klinoptilolitnih materijala. U prilogu 1. obrađeni su spektri pomoću ACD/Labs/Spectrum processor.

3.2.2. Infracrvena spektroskopija tehnikom atenuirane totalne refleksije

Postupak: Uzorak stavi se na dijamant uređaja, dostatnim pritiskom preša te snimi spektar. (Carry 360 FTIR-ATR uređaj, Germany).

3.3. Određivanje veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS)

Dinamičkim raspršenjem svjetlosti na instrumentu ZetaPlus (Instrument ZetaPlus, Brookheaven Instrument Corporation, USA) moguće je odrediti srednju veličinu čestica od 40 nm do 2500 nm u koloidnoj otopini.

Postupak: Koloidna otopina pripremljena je miješanjem 250 mg zeolita u 250 mL ultra-čiste vode do finalne koncentracije zeolita od 0,001 mg/L. Nakon tretmana u ultrazvučnoj kupelji od 5 minuta alikvot od 2,4 mL stavljen je u kivetu te je na uređaju određena veličina čestica.

3.4. Određivanje zeta potencijala zeolita

Sve kemikalije bile su od Sigma Aldrich, MO, USA.

Postupak: 50 mL alikvota prethodno pripremljene otopine zeolita stavljeno je na magnetsku miješalicu te je određen pH otopine zeolita uz pomoć staklene/Ag/AgCl elektrode (Lab pH meter, Metrohm, Švicarska). Za Zeolit A nije bilo potrebno podešavati inicijalni pH koji je iznosio 11,5 dok je za ostale zeolite pH podešen uz pomoć 1,0 mol dm^{-3} NaOH do pH ≈ 11. Potom je određen zeta potencijal u pH rasponu od 3-11 dodavanjem 0,1 mol dm^{-3} HCl. Određeni su i zeta potencijali uz ione Ni^{2+} i Pb^{2+} u koncentraciji 0,001 mol/dm^3.

3.5. Fotoelektronska spektroskopija rendgenskim zrakama (XPS)

Fotoelektronski spektri snimljeni su na XPS instrumentu opremljenim Phoibos MCD 100 elektronskim analizatorom i izvorom monokromatskog zračenja Al Kα X-rays of 1486.74 eV (SPECS Surface Nano Analysis Germany). Tlak u UHV komori tijekom mjerenja je 10^{-7} Pa. Fotoemisijski spektri obrađeni su programom CasaXPS

(http://www.casaxps.com/). Na temelju podataka izračunata je empirijska formula površine zeolita, kao i u modelnim otopinama želuca i crijeva.

3.6. Brunauer-Emmet-Teller analiza specifične površine

Za određivanje specifične površine po dušikovoj apsorpcijsko/desorpcijskoj izotermi upotrebljava se Brunauer-Emmet-Teller analizator TriStar II 3020 (Micromeritics, Norcross, GA, USA). Specifična površina uzorka izmjerena je određivanjem apsorpcije u relativnom rasponu pristiska između 0,05 i 0,30. Veličina pora određena je živinim porozimetrom (PASCAL 440, ThermoQuest 2, Italia, Rodano, Italija) u rasponu od 0 do 10000 nm.

Postupak: Uzorci su se vagali 2 puta, aproksimativno po 0,1 g uzorka u suhom stanju. Standardna devijacija mjerenja iznosila je +/- 3,7%.

Površina je korelirana s veličinom čestica i s omjerom Si/Al klinoptilolitnih materijala izračunatih iz XPS-a.

3.7. Određivanje kapaciteta ionske izmjene/adsorpcije teških metala in vitro

Ovim pokusom pratio se kapacitet i svojstva uklanjanja teških metala iz suspenzije adsorpcijom na različite zeolite. Prema literaturi, pH u ljudskom želucu iznosi od 1-3. U ovom eksperimentalnom pristupu odabrali smo model želuca s nižim pH prije jela. Postupak: Modelna otopina želuca imala je pH 1,2 sa 7 mL 37% HCl (Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Croatia) i 2 g NaCl (Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), anhydrous, ACS reagent, 99%) u 1L destilirane vode. Točan pH otopine određen pH metrom (FiveEasy Benchtop Meter FE20 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Jednako se modelna otopina crijeva pripremila pri pH=6,5 s 8,649 g s NaCl otopljenim u 1L destilirane vode. U Erlenmeyerove tikvice od 200 mL dodalo se 100 mL destilirane vode i 98 mL modelnih otopina. Slijepa proba sadržavala je sve sastojke osim zeolita. U 8 tikvica bit će raspoređene po 4 modelne otopine želuca i crijeva, dodalo se 100 µl multimetalnog standarda (QC Standard: Pb, Cd, As, Ni, Cr, at 100 mg/L each, VHG labs, LGC Standard, USA), i 100 µL standardne otopine žive (Hg). U otopinu se dodala destilirana voda do 200 mL. U tikvice s otopinama dodali

su se zasebno korišteni zeoliti. Iz takvih otopina uzeo se alikvot od 30 mL za određivanje početne koncentracije metalnih iona u suspenzijama atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (GF-AAS) (AAS800, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) tj., koncentracije metala prije inkubacije sa zeolitima. Atomska apsorpcijska spektroskopija temelji se na atomizaciji električnim grijanjem uzorka u grafitnoj kiveti i struji inertnog plina te analizi mjerenja karakterističnog apsorpcijskog spektra. Testne otopine i slijepe probe su se inkubirale uz miješanje 4 sata pri 37°C. Eksperiment se ponovio 3 puta. Po završenom pokusu odnosno inkubacije otopina s metalima i zeolitima, ponovno se uz pomoć GF-AAS izmjerila koncentracija metalnih iona u suspenzijama. Za analizu žive određivanje se provelo u živinom analizatoru (AMA254, Leco, St. Joseph, Michigan) koji se temelji na direktnom sagorijevanju uzorka u struji kisika i posljedične atomizacije. Živa se odredila stoga, po emisijskom spektru. Napravljena je korelacija sa Si/Al omjerom zeolita u području podudarnosti Pb^{2+} iona s klinoptilolitnim materijalima radi procjene ionske izmjene.

3.8. Mjerenje pH vrijednosti zeolita

Postupak: Po 2 g testiranih zeolita TMAZ, PMA, PMAO2 i A dodano je u 200 mL ultra-čiste vode . Za pripremu želučanog modela otopine pomiješano je 100 mL ultra-čiste vode i 100 mL otopine načinjene od 2g NaCl-a (Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) i 7 mL 37% HCl (Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Croatia)) u 1 L ultra-čiste vode. Za pripremu modelne otopine crijeva pomiješano je 100 mL ultra-čiste vode i 100 mL otopine načinjene otapanjem 8,649 g NaCl-a u 1 L ultra-čiste vode podešene na pH 6,5. Vrijednost pH određena je pH-metrom (pH Lab Meter, Metrohm, Švicarska).

Napravljena je korelacija s Si/Al omjerom i udjelom kojim zeolit diže pH da bi se izračunala maksimalna topljivost zeolita.

3.9. Analiza elektronskom mikroskopijom spregnuta s disperzivnom rendgenskom spektroskopijom

Zeolitni materijali snimljeni su elektronskim mikroskopom (SEM analiza) FE-SEM instrumentom (JSM-7800F PRIME, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Elementna analiza EDS provedena je uz pomoć X-MAX80 Aztec (Oxford instruments, UK) pričvršćenog na instrument FE-SEM.

Postupak: Čestice zeolita stavljene su na nosač premazan ugljikom. Voltaža ubrzavanja za SEM bila je 2 kV (0,5 kV) i za EDS 15 kV. Za EDS mjerenja odabrano je 5 različitih položaja radi procjene reproducibilnosti. Tražio se prosječni Si/Al omjer u frakcijama dekantiranog zeolita, centrifugiranog na 4000 rpm, 14000 rpm, 140000 rpm. Testirana su sva četiri zeolita.

3.10. Studija na štakorima *in vivo*

Za pokus su korišteni ženski štakori (HsdBrlHan:Wistar, 160 -180 g) Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb. Životinje su uzgajane i održavane u patogen-slobodnim uvjetima te su hranjene standardnom hranom za laboratorijske štakore (GLP Mucedola 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) ad libitum, sa slobodnim pristupom vodi i ciklusima svjetla koji su se izmjenjivali svakih 12h prema smjernicama za održavanje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, National Academies Press, 2010). Pokus i procedure su odobrene od strane Institucijske jedinice za održavanje životinja i Komiteta (Use Committee, IACUC).

Za potrebe *in vivo* eksperimenta, 80 životinja podijeljeno je u eksperimentalne skupine za tretman intragastričkom sondom različitim zeolitima u koncentraciji 8g/kg tjelesne težine na dan / (kontrole) sa ili bez subkroničnih doza soli aluminijevog klorida, $AlCl_3$ finalne koncentracije aluminija 23,13 mg/kg tjelesne težine (Merck, Germany) tijekom 42 dana. Subkronična doza $AlCl_3$ iznosila je 100 mg/kg/dan. S obzirom kako je hipoteza istraživanja da silicijeve forme imaju veze s detoksikacijom Al *in vivo*, jedna je grupa životinja tretirana i koloidnom disperzijom SiO_2 (LUDOX® HS-40 colloidal silica, 40 wt. % suspension in H_2O, Sigma-Aldrich, SAD) gdje je u 1ml koloidne suspenzije bilo 243 mg SiO_2, odnosno kombinacijom $AlCl_3$ i SiO_2.

Tablica 2. Prikazuje raspored životinja po skupinama

Kontrolne grupe životinja	Grupe životinja intoksicirane AlCl3
Grupa 0: negativna kontrola – voda za piće	Grupa 1: pozitivna kontrola (intoksiciriane životinje, aluminij-klorid $AlCl_3$)
Grupa 2A: Zeolit A	Grupa 2: $AlCl_3$+Zeolit A
Grupa 3A: TMAZ	Grupa 3: $AlCl_3$+TMAZ
Grupa 4A: PMA	Grupa 4: $AlCl_3$+PMA
Grupa 5A: PMAO2	Grupa 5: $AlCl_3$+PMAO2
Grupa 6A: Koloidna silika	Grupa 6: Koloidna silika+$AlCl_3$

Nakon završenog pokusa, životinje su žrtvovane potpunim iskrvarenjem pod totalnom anestezijom (Narketan,80 mg/kg tjelesne težine, Xylapan, 12 mg/kg tjelesne težine, i.p., Chassot AG, Bern, Švicarska) te su sakupljeni: bubreg, jetra, mozak, kost, pluća, jajnici te krvna plazma s kojima se odmah pokrenula procedura određivanja količina minerala i teških metala (natrij, magnezij, aluminij, silicij, fosfor, kalcij, željezo, mangan, kobalt, bakar, cink, arsen, selen, kadmij, kositar, olovo i kalij) uz pomoć induktivno spregnute plazme u sprezi s masenim spektrometrom (ICP-MS) (Agilent 7500cx Series ICPMS).

Postupak: Za potrebe te analize oko 0,5 grama tkiva dodano je 2 mL koncentrirane nitratne kiseline (Merck, Germany) (prethodno se destilirala kako bi se uklonili tragovi teških metala) i 1 mL ultra-čiste vode. Smjesa se u teflonskim epruvetama (PTFE, China) stavila u UltraCLAVE IV uređaj (Milestone S.r.l. Italy) za destrukciju pod mikrovalnim zračenjem i visokim tlakom. Nakon destrukcije uzorka, 6g ultra-čiste vode (vodljivosti 0,059 µS/cm) dodaje se uzorku i uzorak se sprema u polipropilenske epruvete (Agilent, Germany) za mjerenje na ICP-MS. Standardna otopina metala priprema se iz 1000 mg/L ICP multi element standard solution IV (Merck, Germany). Nakon mjerenja provela se statistička analiza elemenata u programu Statistica 12 (StatSoft; $p < 0.05$). Za neparametrijsku statističku analizu korišten je Kruskal-Wallis,

Mann Whitney U i Median test za intoksicirane životinje hranjene zeolitima u usporedbi s pozitivnom kontrolom (intoksicirane životinje) te za zdrave životinje tretirane samo zeolitima u usporedbi s negativnom kontrolom (životinje bez ikakvog tretmana). Za aluminij u jetri MedCalc program-test razlike proporcija. (Prilog 2.).

3.11. Izolacija molekula RNA iz jetre

3.11.1. Homogenizacija tkiva

Postupak: Homogenizacija se vrši u MagNA Lyser-u (Roche, USA). Prije pokusa, „MagNA Lyser Green Beads“ (Roche, USA) epruvete se stave u frižider na +4 °C a okrugli željezni stalak (Roche, USA) stavi se u zamrzivač na -20 °C.

Postupak se izvodio po Rneasy Mini kit-u od Qiagena .

Postupak: U ohlađene epruvete oznake „MagNA Lyser Green Beads“ stavilo se 600 µL RLT pufera + 6-10 µL β-merkaptoetanola (Sigma, Aldrich) te se u to uronio komadić jetre težine oko 30 mg. Potom se uzorak centrifugirao pri 6000 rpm/20 sekundi, te hladio 1 min na +4°C te centrifugirao na 6000 rpm/20 sekundi. Nakon toga potrebno je uzorak hladiti 1 minutu i centrifugirati u običnoj centrifugi na 8200 rpm/2 minute da se spusti pjena lizata.

3.11.2. Izolacija RNA

Postupak: Odpipetirani supernatant lizata prebaci se u novu epruvetu, centrifugira na 8200 rpm/2 minute, te se dobiveni supernatant prebaci u novu epruvetu. Na supernatant doda se 600 µL 70% EtOH (Kemika, Hrvatska) i dobro resuspendira bez centrifugiranja. Prebacilo se 700 µL tako resuspendiranog uzorka u Qiagen Rneasy Mini kolonu iz kita za izolaciju RNA, centrifugiralo pri 8000 g/15 sekundi, kolona se prebacila u novu epruvetu i dodalo se 350 µL RW1 pufera. Nakon toga centrifugirao se uzorak 8000 g/15 sekundi. U posebnoj epruveti pomiješao se DNAza i RDD pufer (10 µL DNAze u 70 µL RDD pufera po uzorku iz RNAze free DNAze seta od Qiagena). Kolona se prebacila u novu epruvetu i dodalo se 80 µL te mješavine i inkubiralo 15 sekundi na sobnoj temperaturi. Dodalo se zatim 350 µL

RW1 pufera u kolonu, centrifugiralo se pri 8000 g/15 sekundi, kolonu se prebacilo u novu epruvetu i dodalo se 500 µL RPE pufera, centrifugiralo se na 8000 g/15 sekundi, kolonu se prebacilo u novu epruvetu i dodalo se 500 µL RPE pufera. Nakon toga se centrifugiralo pri 8000 g/ 2 minute, prebacilo kolonu u sakupljajuću epruvetu od 1,5 mL, dodalo se 30-50 µL ultra-čiste vode (RNase free water) direktno na kolonu, centrifugira na 8000 g/ 1 minutu da bi se RNA eluirala. Svi puferi, DNAaza, kolonice, RNAaza „free water“su od QIAGENA, Njemačka, a centrifuga je Eppendorf, Njemačka.

3.11.3. Analiza kvalitete RNA

Svi instrumenti i pripadajući dijelovi te kemikalije su od Qiagen, Njemačka. Analiza je napravljena na Qiaexel instrumentu.

3.11.3.1. Priprema lađice za pufer

Postupak: Prije svega bilo je potrebno temperirati sve reagense na 15-25°C prije upotrebe, te oprati lađicu s toplom deioniziranom vodom. Potom su se napunile WP i WI pozicije lađice s 8 mL ispirajućeg pufera, te se napunila puferska pozicija na lađici s 18 mL separacijskog pufera. Pažljivo se dodalo mineralno ulje na lađicu kako bi se spriječilo isparavanje: 2 mL mineralnog ulja na poziciju WP i WI i 4 mL mineralnog ulja na poziciju separacijskog pufera. Lađicu se postavilo s reagensima u za to predviđeno mjesto na uređaju.

3.11.3.2. Priprema QX RNA poravnavajućeg markera

Postupak: Dodalo se 15 µL QXRNA poravnavajućeg markera u svaku epruvetu. Dodala se po 1 kap mineralnog ulja u svaku epruvetu i postavila na to predviđeno mjesto na uređaju.

3.11.3.3. Instaliranje QIAxcel RNA spremnika i pametnog ključa

Postupak: Izvadio se QIAxcel RNA gel spremnik iz njegovog nosača. Otvorila su se vrata spremnika za QIAxcel RNA gel spremnik i postavio se spremnik u za to predviđeno mjesto. Nakon toga se postavio pametni ključ u za to predviđeno mjesto.

3.11.3.4. Kalibracija intenziteta

Postupak: Svaki QIAxcel spremnik zahtjeva kalibraciju intenziteta, vrijeme kalibracije traje oko 16 minuta. Na poziciju MARKER2, postavile su se epruvete s 15 µL kalibracijskog markera. Pokrenula se kalibracija pritiskom na ikonu „Pokreni kalibraciju“.

3.11.3.5. Priprema uzorka za QIaxel

Postupak: Razrijedila se izolirana RNA u vodi bez nukleaza, pipetirao se RNA uzorak (1 µL ukupno, ≤1 µg/ µL) i QX RNA marker veličine 200-6000 nukleotida, 1 µL u epruvetice od 0,2 mL. Dodao se isti volumen QX RNA denaturacijskog pufera te se ugrijala otopina na 70°C dvije minute u PCR mašini (Applied Biosystems iProFlex, Germany). Uzorak se potom hladio na ledu 1 minutu. Centrifugiranje uzorka se potom provelo da bi se skupio kondenzat. Dodalo se nakon toga do 10 µL QX RNA pufera za razrjeđivanje, te se uzorak analizirao na QIAxcel uređaju.

3.11.4. Priprava uzorka za DNA mikročip

Sve kemikalije i oprema su od Agilenta, a postupak prema protokolu proizvođača „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis“.

Postupak: Šiljak miks („Spike mix“) pripremao se na temelju koncentracije RNA. S obzirom da je potrebna koncentracija RNA za mikročip analizu 100 ng/ µL, potrebno je bilo raditi tri serije razrjeđenja.

Razrjeđenje br.1.: Prije početka šiljak miks se izvorteksirao, grijao 5 minuta na 37°C te ponovno vorteksirao. U epruvetu od 1,5 mL dodalo se 38 µL pufera za razrjeđenje i 2 µL šiljak miks koncentrata. Vorteksiralo se i kratko centrifugiralo (kratki puls). U epruveticu od 1,5 mL dodalo se 48 µL pufera za razrjeđenje i 2 µL prvog razrjeđenja. Vorteksiralo se i centrifugiralo. U epruveticu se dodalo 38 µL pufera za razrjeđenje i 2 µL drugog razrjeđenja. Vorteksiralo se i centrifugiralo. Prvo razrjeđenje spremilo se na -80°C, a drugo razrijeđenje se bacilo. Treće se razrijeđenje koristilo za daljnji eksperiment.

Priprema reakcije: Razrijeđeni RNA uzorci (100 ng/ µL) dodali su se u epruveticu u količini od 1,5 µL. Na svaki uzorak dodalo se 2 µL vršak miksa razrjeđenja broj 3. Priprema T7 miksa početnice: 1 µL vode bez nukleaza i 0,8 µL T7 početnica po uzorku. U svaki uzorak dodalo se 1,8 µL T7 početničkog miksa. Sve se stavilo na 65°C tijekom 10 minuta, te su se uzorci prebacili na led tijekom 5 minuta.

Priprema cDNA miksa: u epruveticu od 1,5 mL po uzorku dodalo se 2 µL 5x pufera za prvi lanac, 1 µL 0,1 M DTT, 0,5 µL 10 mM miksa deoksiribonukleotida, 1,2 µL afinitetnog skript RNaze blokirajućeg miksa. Lagano se resuspendiralo i stavilo nakratko u mikrocentrifugu da bi se pokupile eventualno kapljice sa stijenke (tzv. „Spin down“). U svaki uzorak dodalo se 4,7 µL cDNA miksa i resuspendiralo. Inkubiralo se na 40°C kroz dva sata te potom na 70°C tijekom 15 minuta. Uzorci su prebačeni na led kroz 5 minuta te su na kratko stavljeni u mikrocentrifugu da bi se pokupile kapljice sa stijenke i poklopca koje su se kondenzirale prilikom hlađenja (tzv. „spin down“).

Priprema transkripcijskog miksa: u epruvetice od 1,5 mL dodalo se 0,75 µL vode slobodne od nukleaza, 3,2 µL 5x transkripcijskog pufera, 0,6 µL 0,1 M DTT, 1 µL ribonukleotidnog miksa, 0,21 µL miješavine T7 RNA polimeraze i 0,24 µL cijanin 3-

CTP te se u svaki uzorak dodalo 6 µL transkripcijskog miksa te se lagano resuspendiralo. Nakon toga inkubiralo se na 40°C tijekom 2 sata.

Pročišćavanje umnožene RNA upotrebom RNeasy mini kita: uzorci su prebačeni u epruvetice od 1,5 mL. U uzorak (cRNA) se dodao 84 µL vode bez nukleaza, dodalo se 350 µL RLT pufera i dobro se sve resuspendiralo. Nakon toga se dodalo 250 µL 96% etanola i dobro se resuspendiralo. Od toga se 700 µL uzorka prebacilo u kolonu te se centrifugiralo 30s/13000 rpm. Prebacila se kolonica u novu epruveticu i dodalo se 500 µL RPE pufera, centrifugiralo se sve 30s/13000 rpm na 4°C te su se centrifugirale kolonice na suho u slučaju da je zaostalo još RPE pufera. Prebacilo se kolonice u 1,5 mL epruvetice te dodamo 30 µL vode slobodne od RNaze. Pričekalo se 1 minutu i centrifugiralo se 30 s/13000 rpm na 4°C te su bačene kolonice i stavila se RNA na led.

Kvantifikacija RNA: kvantifikacija se izvodila na uređaju BioDrop (BioChom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Potrebna je bila koncentracija cRNA u ng/ µL, absorbanca na 260/280 nm, Cy3 koncentracija u pmol/ µL. Morao se odrediti prinos i specifična aktivnost svake reakcije.

Jednadžba za prinos:

$$\frac{koncentracija\ RNA\ X\ 30\ \mu l\ (volumen\ eluacije)}{1000} = \mu g\ cRNA$$

Jednadžba za određivanje specifične aktivnosti:

$$\frac{koncentracija\ Cy3}{koncentracija\ cRNA} x\ 1000 = pmol\ Cy3\ po\ \mu g\ cRNA$$

Preporučena iskorištenja i specifične aktivnosti:

Format DNA mikročipa	Iskorištenje (µg)	Specifična aktivnost (pmol Cy3 po µg cRNA)
1	5	Jednako ili više od 6
2	3,75	Jednako ili više od 6
4	1,65	Jednako ili više od 6
8	0,825	Jednako ili više od 6

Postupak hibridizacije

Priprema 10x blokirajućeg reagensa:

U liofilizirani genski ekspresijski blokirajući reagens dodano je 500 µL vode bez nukleaze. Resuspendiralo se i vorteksiralo te grijalo na 37°C kroz 4-5 minuta.

Priprema uzoraka za hibridizaciju: prema formatu DNA mikročipa miješao se fragmentacijski miks:

Tablica 3. Priprema fragmentacijskog miksa

Komponenta	Volumen/masa
Cijanin 3-obilježena umnožena cRNA	600 ng
10xgenski ekspresijski blokirajući reagens	5 µL
Voda bez nukleaze	Do 24 µL
25x fragmentacijski pufer	1 µL
Ukupni volumen	µL

Inkubacija se provela na 60°C kroz 30 minuta, odmah se prebacilo na led tijekom 1 minutu, dodao se 2xHi-RPM hibridizacijskog pufera, resuspendiralo se te centrifugiralo 1 minutu na 13000 rpm. Stavili su se uzorci na led i prenijeli na DNA mikročip.

Priprema hibridizacijskog aparata: stavila su se brtvila u Agilent SureHyb komoru s oznakom prema gore. Barkod oznaka mora biti s lijeve strane, a kružnim pokretima se nanio hibridizacijski uzorak od 40 µL na mikročip SurePrint G3 Rat GE 8X60 K (8 polja na mikročipu od kojih svaki sadrži 60-mer oligonukleotid proba). Dodao se isti volumen pufera kao i uzoraka, te se primio DNA mikročip na oba kraja i polako stavio s „aktivnom stranom“ dolje, paralelno s brtvilom. „Agilent“ obilježeni barkod treba se okrenuti prema dolje i numeričku barkod stranu okrenuti prema gore. Stavile su se

SureHyb komore u sendvičasta brtvila te se dobro stisnula. Zatim su se iste ubacile u hibridizacijsku pećnicu na 65°C tijekom 17 sati.

Ispiranje DNA mikročipa: dodao se Triton X-102 u oba pufera (1 i 2) u volumenu od 2 mL, a nakon toga pažljivo se promiješalo pufere okrećući ih 5-6 puta. Zagrijavanje genskog ekspresijskog ispirajućeg pufera 2: zagrijavao se pufer na 37°C tako da se 1 L pufera prebacio u sterilnu bocu (ako je potreban veći volumen zbog više uzoraka, staviti više pufera). Zatvorila se boca i stavila na 37°C u vodenu kupelj, noć prije ispiranja. Ispralo se posuđe s ultra-čistom vodom. U prvu posudu dodao se genski ekspresijski pufer 1 na sobnoj temperaturi. Pincetom se odvojio DNA mikročip od brtvila u puferu. Ispiranje se vršilo u drugoj posudi sa genskim ekspresijskim puferom 1 na sobnoj temperaturi 1 minutu uz magnetsku mješalicu s tim da je DNA mikročip bio na staklenom nosaču. Ispiranje u trećoj posudi s genskim ekspresijskim puferom 2 na temperaturi od 37°C 1 minutu provodilo se uz magnetsku mješalicu s tim da je DNA mikročip bio na staklenom nosaču. Čip je skeniran uz pomoć instrumenta za mikročip analizu SureScan Microarray Scanner (Agilent, SAD).

3.11.5. Obrada mikročipa u programu „Feature Extraction“

Postupak: podesila se obrada signala mikročipova u programu uređaja SureScan Microarray Scanner (Gene Expression, GE_1105_Oct12). Nakon obrade dobio se izvještaj o kvaliteti snimljenog mikročipa („QC-REPORT“) zajedno s tekstualnim datotekama koje ulaze u obradu u program Genespring verzija 12 . U program se unosila tekstualna datoteka dobivena programom Feature Extraction za eksperimentalne triplikate po svakoj grupi. U opisu eksperimenta odabrala se opcija „Agilent single colour“ te su normalizirani uzorci s obzirom na intenzitet i obavljena je kontrola kvalitete na uzorcima u našem slučaju na način da je odabran filter ekspresije s obzirom na vrijednost ekspresije. Nakon toga odabran je statistički test za obradu podataka (t-test) na način da se tražila diferencijalna ekspresija između grupa s vjerojatnošću od 95% ($p<0,05$) i ekspresija s obzirom na razliku signala 2 puta u odnosu na kontrolnu skupinu (engl. fold change 2).

3.11.6. Bioinformatička obrada odabranih transkriptomskih kandidata

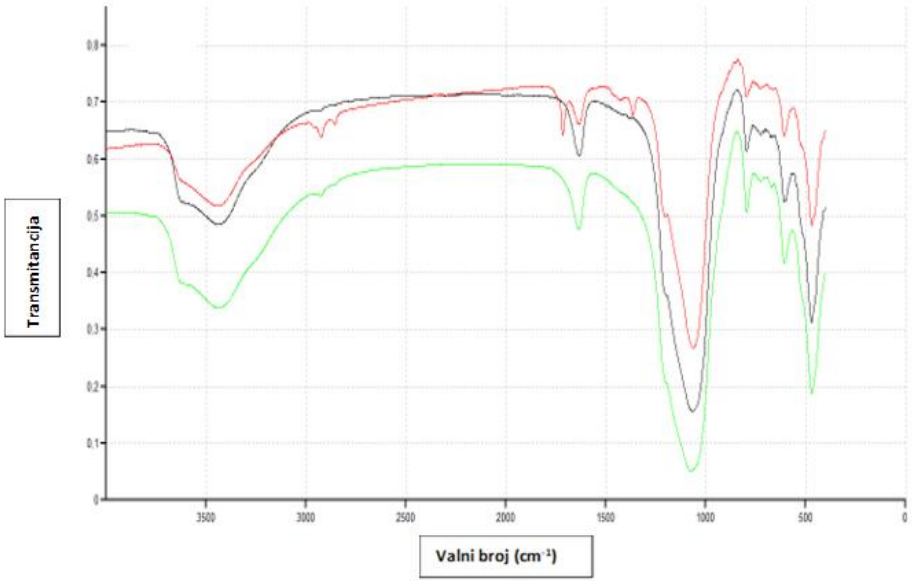
Da bi se shvatile biološke funkcije diferencijalno eksprimiranih gena, identificirani geni su obrađeni uz pomoć platforme PANTHER (http://pantherdb.org).

4. REZULTATI

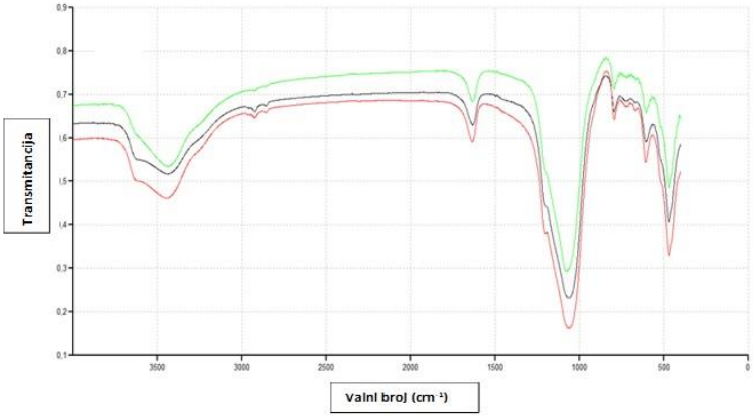
4.1. Infracrvena spektroskopija tehnikom KBr pastile

Cilj analize uzoraka zeolita infracrvenom spektroskopijom bio je praćenje razlika u spektrima zeolita TMAZ, PMA i PMAO2 odnosno praćenja promjena površine zeolitnih materijala u valnim brojevima tipičnim za pojedinačni zeolit nakon tretmana u modelnim otopinama crijeva i želuca. Promjene su praćene na valnim brojevima ~ 1075 cm^{-1} (asimetrično istezanje kemijske veze Si-O-Si i Si-O-Al), ~ 602 cm^{-1} (simetrično istezanje kemijske veze Al/Si-O) i ~468 cm^{-1} (savijanje ili tzv. „bending“ kemijske veze O-Si-O i O-Al-O).

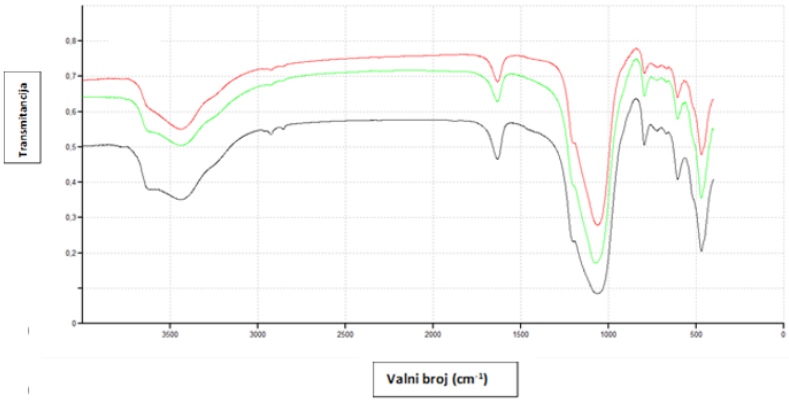
Rezultati ove analize korelirani su s omjerom Si/Al izmjerenim za pojedine zeolitne materijale te se mogu vidjeti u tablicama 4. i slici 22. Voda adsorbirana na zeolit pri ~ 1635 cm^{-1} očekivano je vidljiva u svim prisutnim uzorcima.



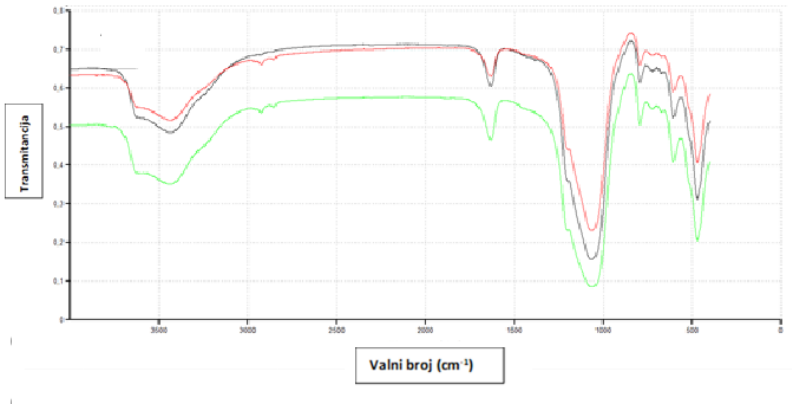
A


Transmitancija
Valni broj (cm⁻¹)

B


Transmitancija
Valni broj (cm⁻¹)

C



D

Slika 21. Spektri dobiveni analizom testiranih zeolitnih materijala uz pomoć infracrvene spektroskopije (IR) tehnikom KBr pastile. Valne duljine ~1063 cm^{-1}, 608 cm^{-1} i 467 cm^{-1} tipične su za klinoptilolitne materijale. Prikazani su spektri čistih zeolitnih materijala PMA, PMAO2 i TMAZ odnosno istih zeolitnih materijala tretiranih modelnim otopinama želuca i crijeva. Panel A: Zeolit PMA (2xaktiviran) - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel B: Zeolit PMAO2 - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel C: Zeolit TMAZ - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel D: Zeolit krutine PMA – crno, PMAO2 crveno i TMAZ zeleno.

Najveći pomaci ispod površina vidljivi su na valnim duljinama od 608 cm^{-1}, 469 cm^{-1} i 1063 cm^{-1}. To govori da su razlike u obradi klinoptilolitnih materijala kao i mediju kojim su tretirani (modelna otopina želuca i crijeva) uzrokovali strukturne razlike navedenih klinoptilolita.

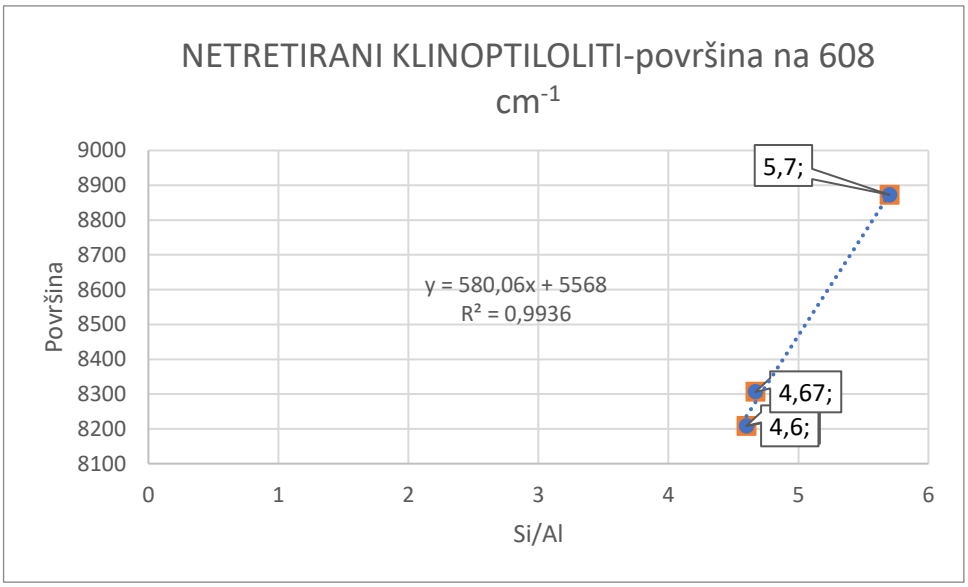
Rezultati izmjera na valnim duljinama tipičnim za klinoptilolitne materijale krutine TMAZ, PMA i PMAO2 u formi praha ili tretirane modelnom otopinom želuca i crijeva prikazani su u tablici 4. Korelacija rezultata prikazana je na slici 22.

Tablica 4. Izmjere površina krutina zeolita TMAZ, PMA i PMAO2 bez i uz tretman modelnim otopinama želuca i crijeva na tri karakteristične valne duljine tipične za klinoptilolitne materijale ~1063 cm^{-1}, 608 cm^{-1} i 467 cm^{-1} u usporedbi s rezultatima omjera Si/Al na površini zeolitnih materijala dobivenih XPS analizom.

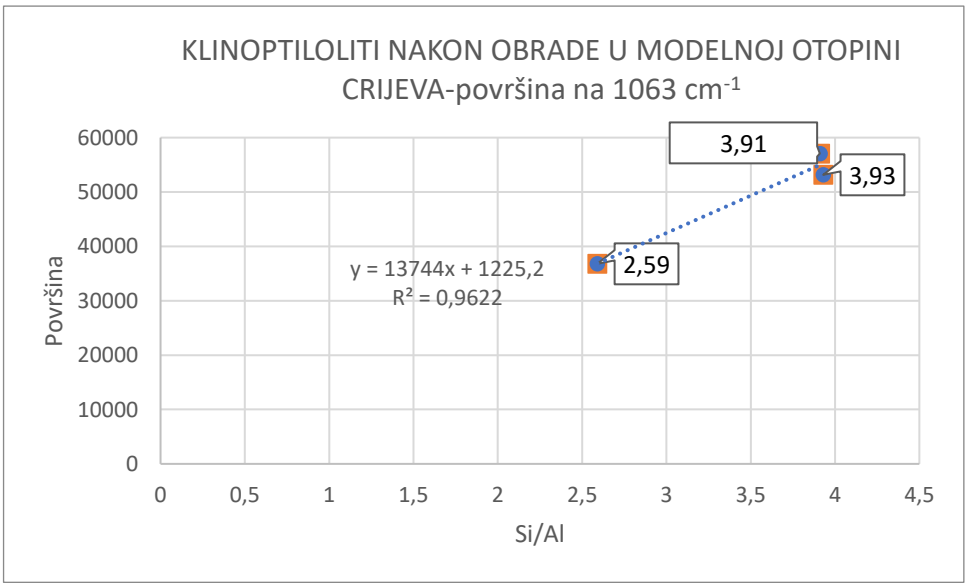
ZEOLIT/krutina	**POVRŠINA NA 608 cm^{-1}**	**XPS:Si/Al omjer**
TMAZ	8208,68	4,6
PMA	8872,48	5,7
PMAO2	8306,38	4,67
ZEOLIT/MODELNA OTOPINA ŽELUCA	**POVRŠINA NA 469 cm^{-1}**	**XPS: Si/Al omjer**
TMAZ	12257,97	5,97
PMA	11351,33	5,94
PMAO2	9335,93	4,44
ZEOLIT/MODELNA OTOPINA CRIJEVA	**POVRŠINA NA 1063 cm1**	**XPS: Si/Al omjer**
TMAZ	57068,97	3,91
PMA	36789,66	2,59
PMAO2	53162,59	3,93

Analizom korelacije dobivenih rezultata vidljivo je kako veći omjer Si/Al korelira s porastom udjela vibracije Si-O veze na 608 cm^{-1} s obzirom na to da da ista ima višu energiju od Al-O veze. Na ovaj je način moguće stoga, jednostavnom

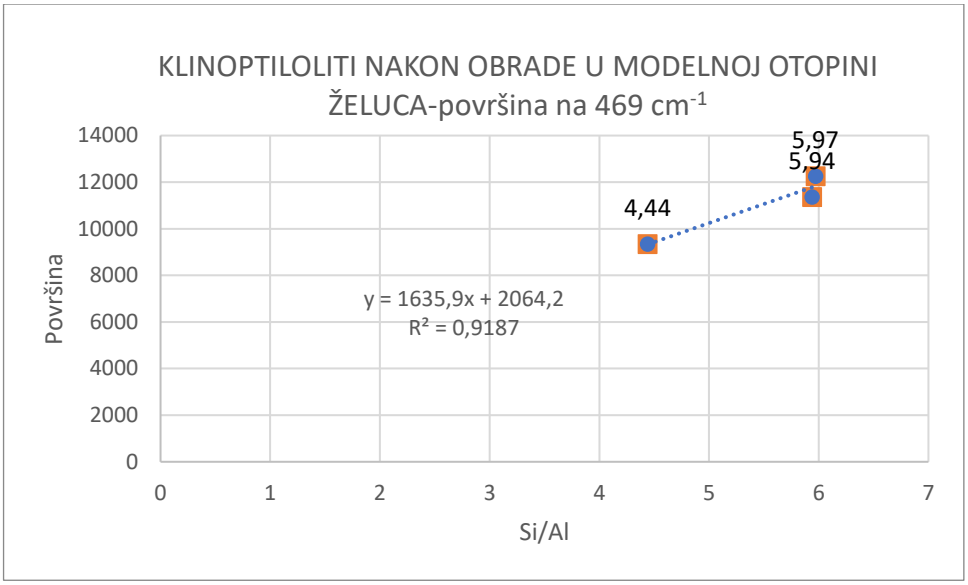
metodom kao što je IR spektroskopija pratiti kvalitetu klinoptilolitnih materijala. Također, vidjelo se kako povećanje omjera Si/Al korelira s površinom materijala na 1063 cm^{-1}. Budući da je omjer asimetričnog istezanja Si-O-Si veći od Si-O-Al podjelom ta dva omjera govori nam da je veći udio asimetričnog istezanja vrpce Si-O-Si zbog više energije veze Si-O-Si od Si-O-Al. Analogno se može zaključiti i za vezu savijanja Si-O-Si (Al) na valnom broju od 469 cm^{-1} u modelnoj otopini želuca.



A



B

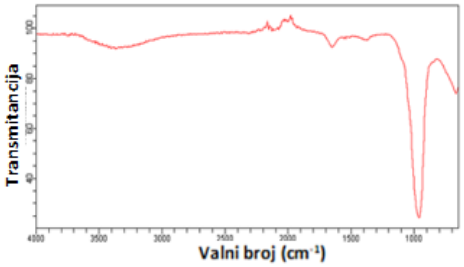


C

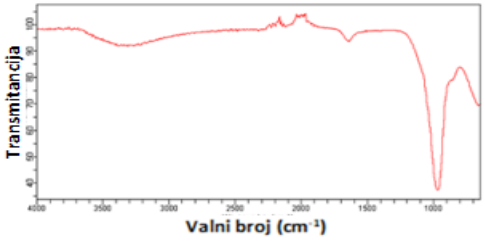
Slika 22. Prikaz rezultata izračuna korelacije omjera Si/Al i površine IR spektra za odabrane valne brojeve tipične za klinoptilolitne materijale. Panel A: netretirani klinoptiloliti, površina na 608 cm^{-1}: Panel B: klinoptilolitni materijali tretirani u modelnoj otopini crijeva, površina na 1063 cm^{-1}. Panel C: klinoptilolitni materijali tretirani u modelnoj otopini želuca, površina na 469 cm^{-1}.

4.2. Infracrvena spektroskopija s atenuiranom totalnom refleksijom

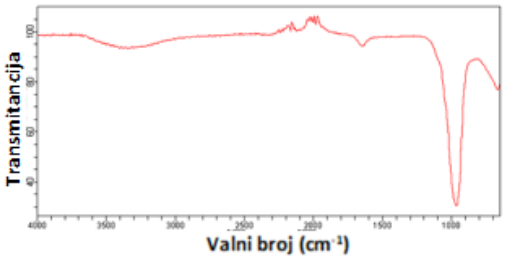
Cilj analize uzoraka testiranih zeolita Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2 infracrvenom spektroskopijom (IR) s atenuiranom totalnom refleksijom bila je analiza razlika u valnim brojevima vrpci dobivenih tretiranjem zeolita s modelnim otopinama želudca i crijeva u usporedbi s netretiranim zeolitom. Rezultati su prikazani na slikama 23-26. Za razliku od tehnike KBr pastile, ova tehnika ne ovisi o debljini uzorka, nije destruktivna i ne ovisi o količini adsorbirane vode na uzorku. Nedostatak ove tehnike je u rasponu snimanja valnih brojeva 700-4000 cm^{-1}, gdje nisu obuhvaćene valne duljine karakteristične za klinoptilolitne materijale ispod 700 cm^{-1}. Usporedbom snimljenih spektara nisu uočene razlike između materijala i u krutom stanju i materijala pri različitim tretmanima (slike 23-26).



A

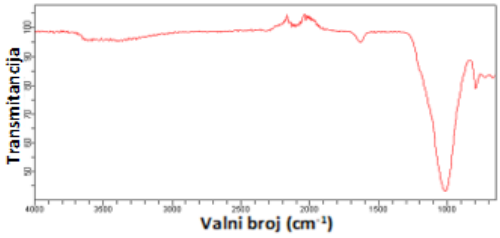


B

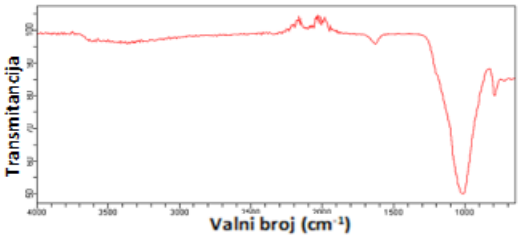


C

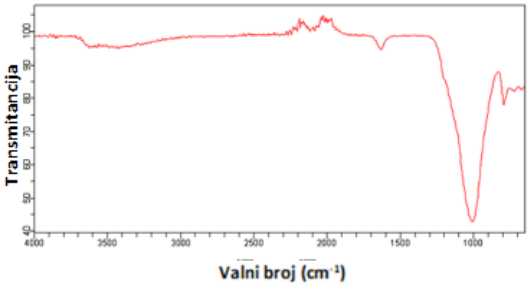
Slika 23. Analiza Zeolita A uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine Zeolita A. Panel B: Spektar dobiven snimanjem Zeolita A tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem Zeolita A tretiranog modelnom otopinom crijeva. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.



A

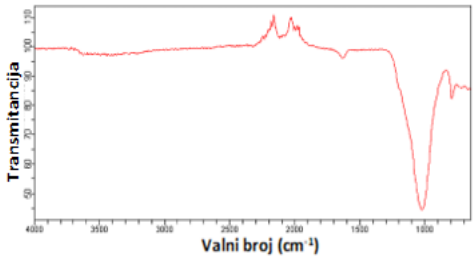


B

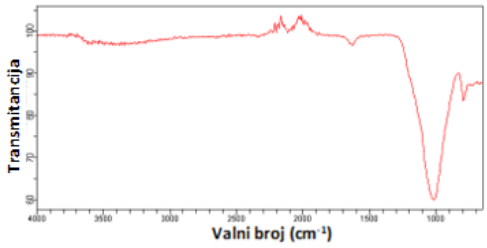


C

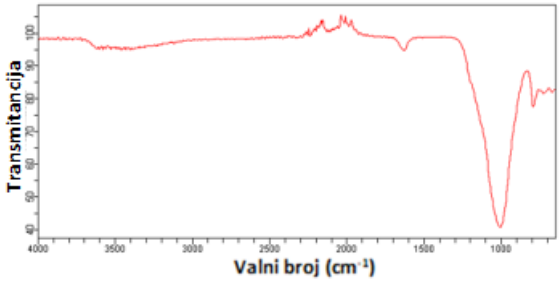
Slika 24. Analiza zeolita TMAZ uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine TMAZ. Panel B: Spektar dobiven snimanjem zeolita TMAZ tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem TMAZ tretiranog modelnom otopinom crijeva. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.



A

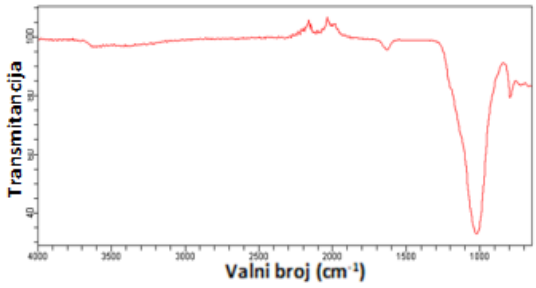


B

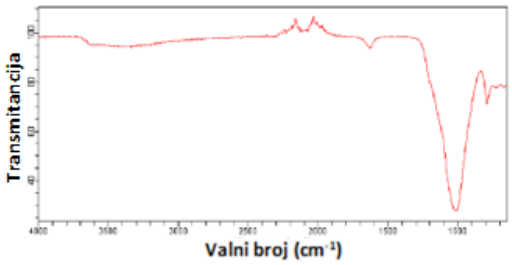


C

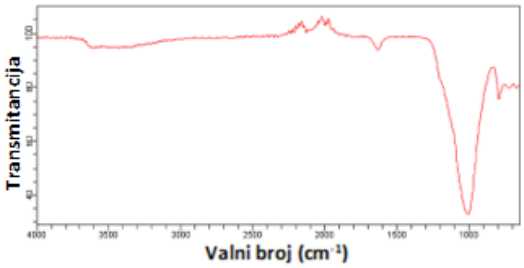
Slika 25. Analiza zeolita PMA uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine zeolita PMA. Panel B: Spektar dobiven snimanjem PMA tretiranog modelnom otopinom želuca. Panel C: Spektar dobiven snimanjem PMA tretiranog modelnom otopinom crijevo. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.



A



B



C

Slika 26. Analiza zeolita PMAO2 uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine zeolita PMAO2. Panel B: Spektar dobiven snimanjem PMAO2 tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem PMAO2 tretiranog modelnom otopinom crijevo. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.

4.3. Određivanje veličine čestica zeolita dinamičkim raspršenjem svjetlosti

Dinamičkim raspršenjem svjetlosti (engl. dynamic light scattering, DLS) može se odrediti veličina mikroniziranih čestica zeolitnih materijala te vidjeti dolazi li do promjene prilikom tribomehaničke aktivacije. Naime, zeolit TMAZ dobiven je jednostrukom tribomehaničkom aktivacijom, dok su PMA i PMAO2 dobiveni

dvostrukom tribomehaničkom aktivacijom bez i uz dodatak kisika. Rezultati su prikazani u tablici 5. s dijametrom i standardnom devijacijom.

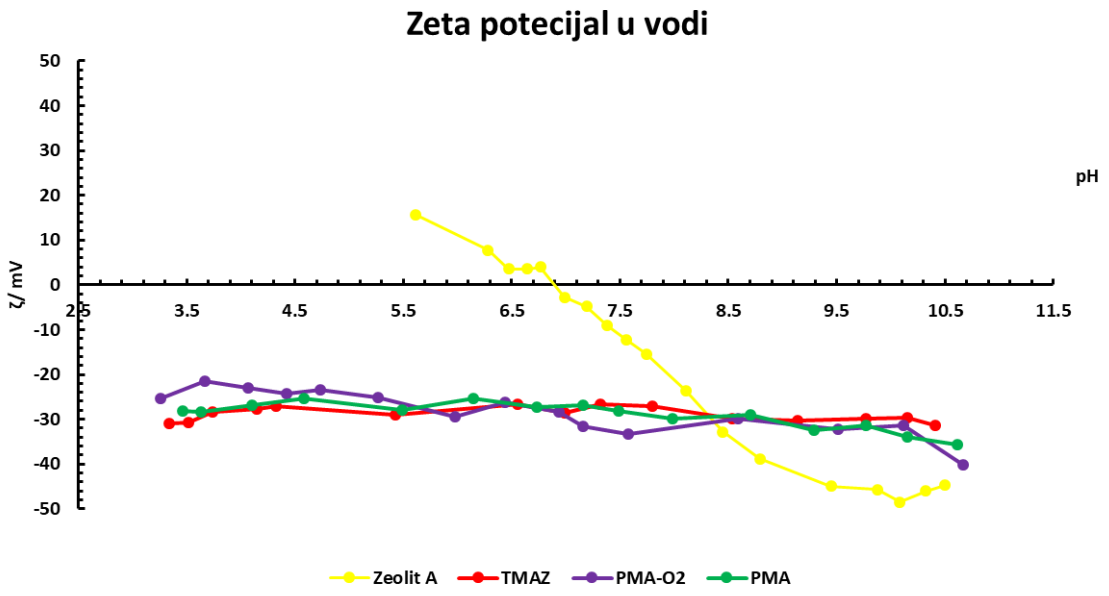
Tablica 5. *Analiza veličine čestica zeolita Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2 određena metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Rezultati su prikazani u nm ± standardna devijacija.*

TIP ZEOLITA	DIJAMETAR ČESTICA/nm
Zeolit A	437,5±22,8
PMAO2	494,1±11,2
PMA	540,4±15,6
TMAZ	794,2±29,5

Može se zaključiti kako je promjer čestica materijala TMAZ dobivenog tribomehaničkim postupkom usitnjavanja veći od promjera čestica sintetskog Zeolita A, te dvostruko mikroniziranih klioptilolitnih materijala PMA i PMAO2.

4.4. Određivanje zeta potencijala zeolita

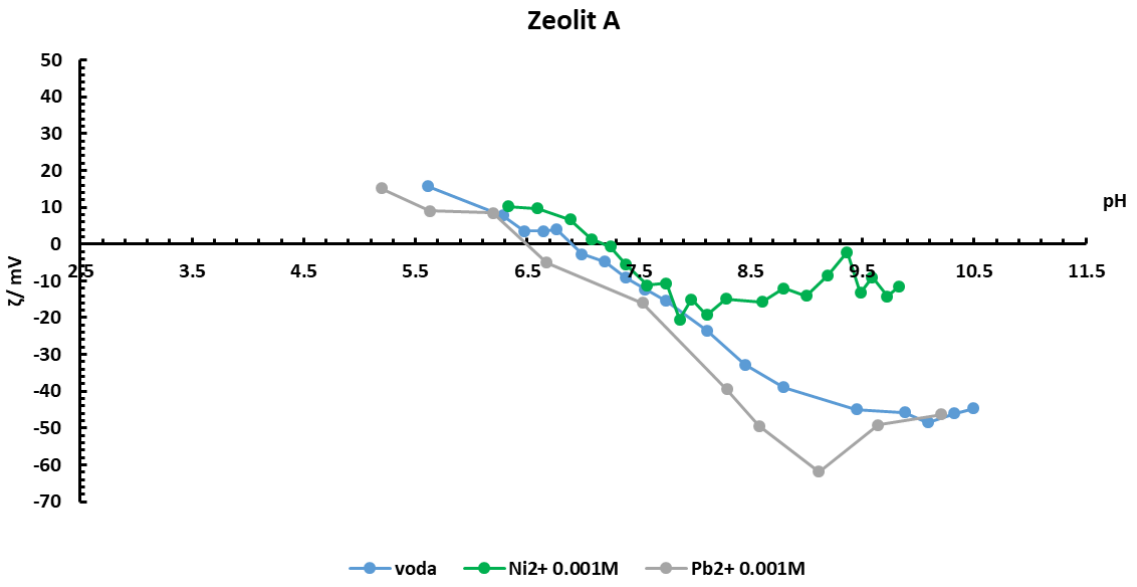
Zeta potencijal (ζ) elektrokinetički je potencijal koji se odnosi na potencijal difuznog sloja iona koji okružuju nabijenu koloidnu česticu, i koji je uvelike odgovoran za stabilnost koloida. Ovom metodom izmjerili smo zeta potencijal Zeolita A i klinoptilolitnih materijala u ovisnosti o pH vrijednosti u vodi te u prisustvu iona nikla i olova. Ukoliko je potencijal koloidne čestice iznad +15 mV ili ispod -15 mV znači da su čestice tako nabijene da se odbijaju. Niži potencijali dovode čestice do koagulacije. Izmjereni zeta potencijal u ovisnosti o pH vrijednosti u vodi prikazani su na slici 27, odnosno izmjereni zeta potencijali uz dodatak nikla i olova na slici 28.



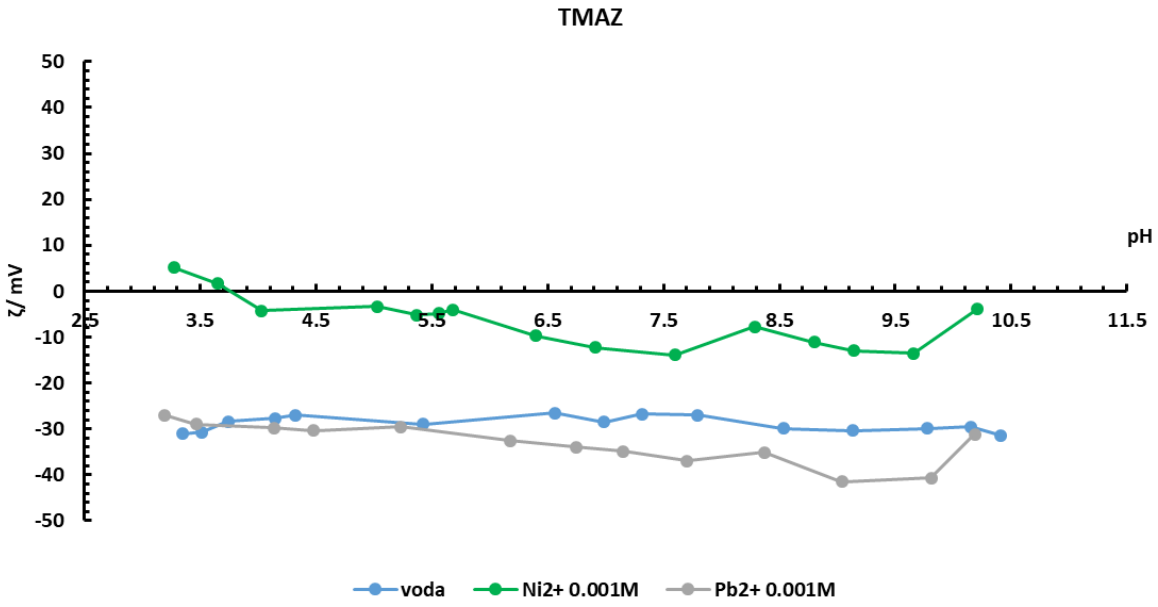
Slika 27. Zeta potencijal (ζ) u mV zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u ovisnosti pH u vodi. Zeolit A pokazuje značajno različita fizikalno-kemijska svojstva u odnosu na klinoptilolitne materijale.

Iz rezultata može se zaključiti kako je zeta potencijal klinoptilolitnih materijala u vodi negativan, oko -30 mV u pH rasponu od 3-12. Znači da klinoptilolitni materijali ne koaguliraju i ponašaju se isključivo kao anionske čestice. Povišenjem pH, potencijal opada, što je u skladu s površinskom strukturom zeolitnih materijala. One na svojoj površini imaju Si-OH silanolne skupine, koje pri višem pH postaju deprotonirane, tj. imaju negativan naboj ($Si\text{-}O^-$) te ukupna površina ima negativan naboj. Dokazano je i da udio klinoptilolita u vodenom mediju ne utječe na zeta potencijal te do udjela od 20% [86]. Zeolit A pokazuje sasvim drugačiji zeta potencijal te tek iznad pH 8 pokazuje približavanje -30 mV što znači da koagulira u vodenoj otopini do te pH vrijednosti. Pri neutralnom pH, tj. vrijednosti pH pitke vode svi testirani klinoptilolitni materijali ne koaguliraju. Zeolit A pak u modelnoj otopini crijeva i pri pH pitke vode koagulira. Ova koagulacija može biti i biološki korisna za hvatanje nekih iona ili molekula u „mrežu“ koagulansa. Od značenja je to i za druge ione koje nisu ispitani ovom metodom osim olova, za koje možemo tvrditi da se ionska izmjena većim dijelom odvija mehanizmom ionske izmjene, tj. oni ulaze u strukturnu rešetku

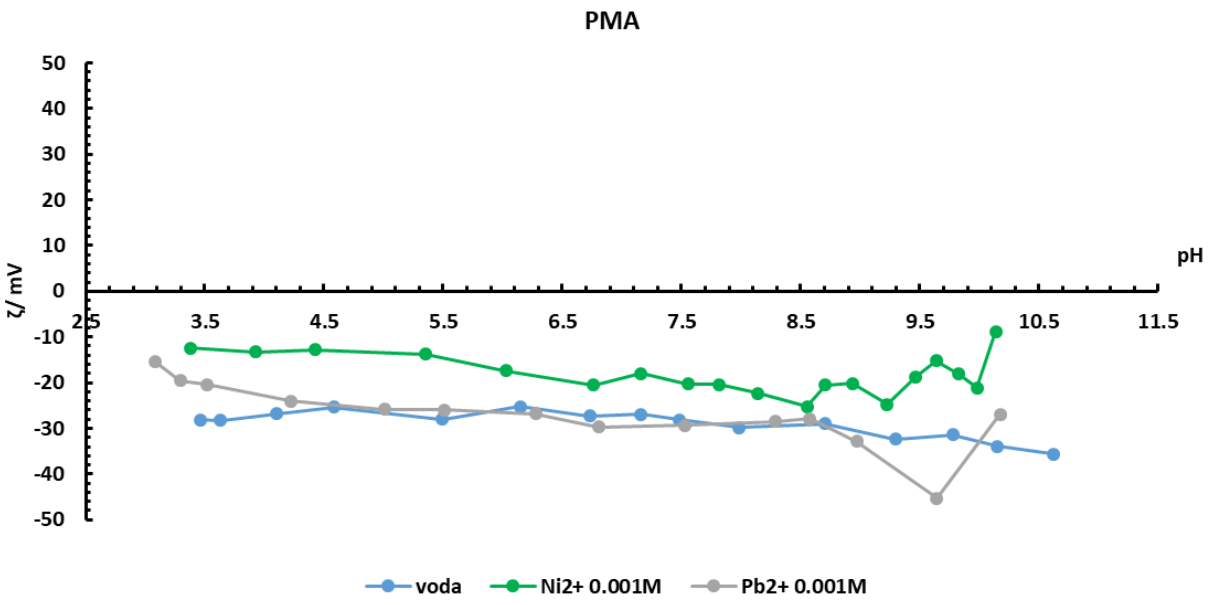
klinoptilolita jer ne mijenjaju zeta potencijal istih u vodi, tj. njihovi se zeta potencijali u velikoj mjeri preklapaju.



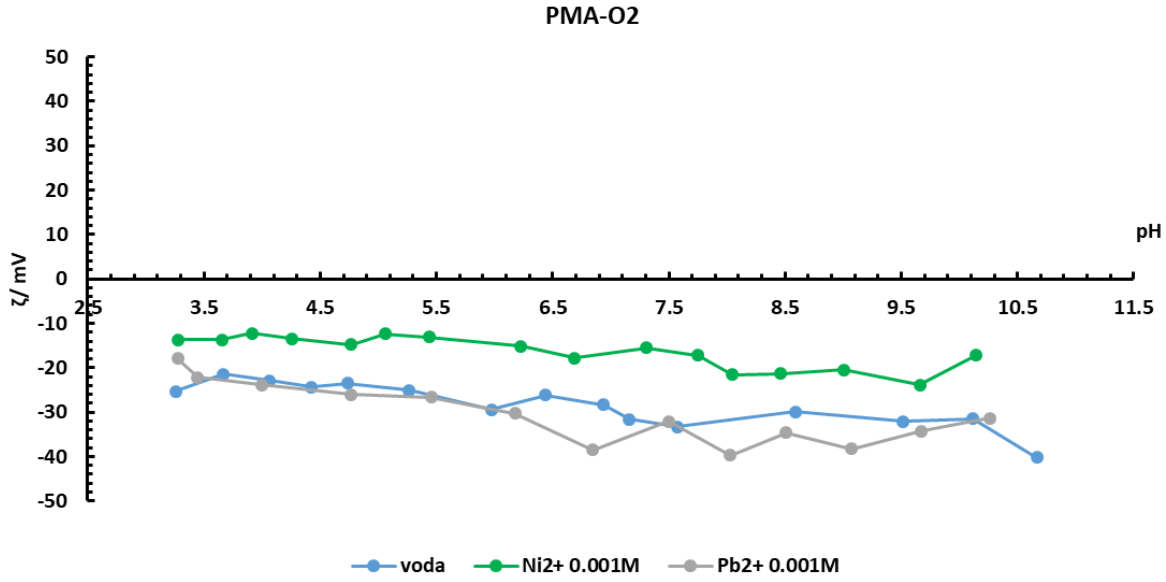
A



B



C



D

Slika 28. Zeta potencijal (ζ) u mV zeolitnih materijala u ovisnosti pH uz dodatak iona Ni^{2+} i Pb^{2+}. Zeolit A - panel A; TMAZ – panel B, PMA – panel C, PMAO2 – panel D.

Iz slike 28. može se zaključiti da ion Ni^{2+} povisuje zeta potencijal zeolita. Može se stoga zaključiti da se ion Ni^{2+} adsorbira na površinu zeolita i utječe na njegovu koagulaciju. Pb^{2+} ion neznatno utječe na zeta potencijal zeolita pa bi mogli zaključiti da kod njega većinom dolazi do ionske izmjene, a ne adsorpcije iona na površinu

zeolita. Time bi preko zeta potencijala mogli računati udio iona koji se adsorbiraju na površinu zeolita i udio iona koji se izmjenjuju s ionima iz kristalne rešetke tj. mehanizam je ionska izmjena.

4.5. Određivanje omjera Si/Al zeolita XPS metodom

Omjer Si/Al karakteristično je svojstvo zeolita koje određuje niz fizikalno-kemijskih svojstava materijala. To je broj koji se odnosi na brojnost atoma silicija u odnosu na atome aluminija, tzv. omjer silicija i aluminija (Si/Al). Vrijednost omjera Si/Al koristi se u klasifikaciji zeolita, pa se često u literaturi mogu naći nazivi „high silica“ zeoliti ili „low silica“ zeoliti. Ovaj omjer govori i o broju tetraedara koji grade jediničnu ćeliju zeolita (op. .a. u uvodu su navedene primarne građevne jedinice zeolita). Što je veći udio silicija u zeolitu to je on manje topljiv u vodi, pa govorimo o hidrofobnim zeolitima. Materijal kvarc, SiO_2, građen je, primjerice samo od SiO_4 tetraedara. Smanjeni omjer Si/Al mjeri se kod hidrofilnih zeolita. Omjer Si/Al može se izračunati na površini materijala uz pomoć metode XPS te se temeljem dobivenih rezultata može izračunati empirijska formula površine zeolita (tablice 6,7,8 i 9). Da bi se izračunala empirijska formula zeolitnih materijala potreban je atomski udio pojedinog elementa pretvoriti u maseni udio, a iz masenog udjela u množinu u 2 grama zeolita.

Tablica 6. Rezultati elementne analize XPS za površinu Zeolita A kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

ZEOLIT A	Al	Si	O	K	Na
w (maseni udio) dobiven	0,2023	0,2239	0,3984	0,0327	0,1426
m (masa elementa)/ g	0,4046	0,4478	0,7968	0,0654	0,2852
Množina /mol	0,0149	0,0159	0,0498	0,001672	0,012405

Empirijska formula površine	Si/Al
$Al_{8,93}Si_{9,53}O_{29,78}KNa_{7,4}$	1,06

A

ZEOLIT A-CRIJEVA	Al	Si	O	Na
W (maseni udio)	0,2201	0,2587	0,3906	0,1304
m (masa elementa)/ g	0,4402	0,5174	0,7812	0,2608
Množina /mol	0,016315	0,018439	0,0448825	0,011344

Empirijska formula površine	Si/Al
$Al_{1,43}Si_{1,62}O_{3,92}Na$	1,13

B

ZEOLIT A-ŽELUDAC	Al	Si	O	Mg
w (maseni udio)	0,1980	0,18528	0,38931	0,22737
m (masa elementa)/ g	0,39604	0,37056	1,00182	0,45475
Množina /mol	0,01467	0,01319	0,062613	0,018706

Empirijska formula površine	Si/Al
$Al_{1,1}SiO_{4,74}Mg_{1,41}$	0,90

c

Tablica 7. Rezultati elementne analize XPS za površinu TMAZ kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

TMAZ-KRUTINA	Al	Si	O	Ca	K
w (maseni udio)	0,08613	0,41285	0,463	0,0101922	0,027822
m (masa elementa)/ g	0,17226	0,8257	0,926	0,020304	0,05555
Množina /mol	0,006384	0,029394	0,057875	0,000506	0,001428

Empirijska formula površine	Si/Al
$Al_{12,61}Si_{58,08}O_{114,37}CaK_{2,8}$	4,60

A

TMAZ-CRIJEVO	Al	Si	O	Ca	K	Fe	Na
w(maseni udio)	0,09802	0,399	0,44963	0,00707	0,01912	0,00797	0,01276
m (masa elementa)/ g	0,19604	0,798	0,89926	0,01414	0,03824	0,01594	0,025534
Množina/mol	0,007266	0,028408	0,0562	0,000352	0,00098	0,000285	0,00111

Empirijska formula površine	Si/Al
$Al_{25,49}Si_{99,67}O_{197,19}Ca_{1,23}K_{3,43}Fe$	3,91

B

TMAZ-ŽELUDAC	Al	Si	O	K	Fe
w (maseni udio)	0,072522	0,45326	0,44458	0,014499	0,005116
m (masa elementa)/ g	0,145044	0,90652	0,90916	0,028998	0,010232
Množina /mol	0,005375	0,032306	0,005725	0,0007433	0,000189

Empirijska formula spoja	Si/Al
$Al_{29,37}Si_{175,57}O_{31,28}K_{4,061}Fe$	5,97

C

Tablica 8. Rezultati elementne analize XPS za površinu PMA kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

PMA-KRUTINA	Al	Si	O	Ca	K
w(maseni udio)	0,0707	0,41891	0,47822	0,015965	0,01187
Masa/g	0,1414	0,83782	0,95644	0,03193	0,032374
Množina/mol	0,00524	0,029858	0,059775	0,00079805	0,0008298

Empirijska formula	Si/Al
$Al_{6,56}Si_{37,41}O_{74,9}CaK1_{,03}$	5,7

A

PMA-CRIJEVO	Al	Si	O	Ca	K	Fe	Na
w(maseni udio)	0,11331	0,3197	0,502	0,010538	0,02427	0,02023	0,0138
Masa/g	0,2262	0,6314	1,004	0,021076	0,04854	0,04046	0,0276
Množina/mol	0,00867	0,0225	0,06275	0,0005267	0,001244	0,00072444	0,0,0012

Empirijska formula	Si/Al
$Al_{16,46}Si_{42,71}O_{119,13}CaK_{2,36}Fe_{1,37}Na_{2,27}$	2,59

B

PMA-ŽELUDAC	Al	Si	O	K	Fe
w(maseni udio)	0,074311	0,44179	0,44325	0,034952	0,005685
Masa/g	0,148622	0,88358	0,8865	0,069904	0,01137
Množina/mol	0,0056986	0,033879	0,05540625	0,00179195	0,000203

Empirijska formula	Si/Al
$Al_{28,07}Si_{166,89}O_{272,93}K_{8,82}Fe$	5,94

C

Tablica 9. Rezultati elementne analize XPS za površinu PMAO2 kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (2 g ukupno) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

PMAO2-KRUTINA	Al	Si	O	Ca	K	Fe
w(maseni udio)	0,07876	0,39284	0,42872	0,022519	0,02562	0,05155
Masa elementa/g	0,15752	0,78568	0,85744	0,045038	0,05124	0,1031
Množina/mol	0,006	0,028	0,05359	0,0011237	0,00131	0,00184

Empirijska formula	Si/Al
$Al_{5,33}Si_{24,91}O_{47,69}CaK_{1,16}Fe_{1,63}$	4,67

A

PMAO2-CRIJEVA	Al	Si	O	Ca	K	Fe	Na
w(maseni udio)	0,1023	0,41859	0,43595	0,01169	0,014552	0,00663	0,006522
Masa/g	0,2046	0,83718	0,8719	0,02338	0,029104	0,01326	0,013044
Množina/mol	0,007538	0,029835	0,05449	0,00005845	0,0007443	0,0,0002374	0,00056

Empirijska formula	**Si/Al**
$Al_{31,94}Si_{125,67}O_{223,52}Ca_{2,46}K_{3,13}FeNa_{2,38}$	3,93

B

PMAO2-ŽELUDAC	Al	Si	O	K	Fe
w(maseni udio)	0,08864	0,409515	0,478762	0,013205	0,00987
Masa/g	0,17728	0,81903	0,957524	0,02641	0,01974

Množina/mol	0,00657	0,029188	0,059845	0,000677	0,000353

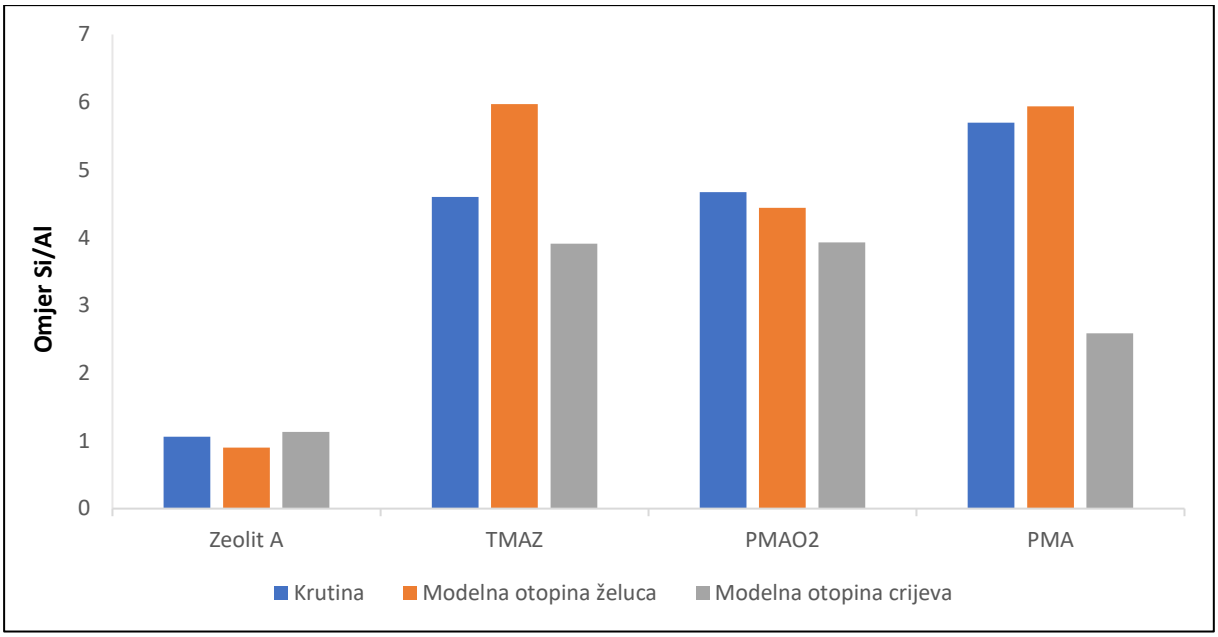
Empirijska formula	Si/Al
$Al_{18,61}Si_{82,68}O_{169,53}K_{1,91}Fe$	4,44

C

Omjer molova silicija i aluminija na površini izmjerenih materijala, odnosno omjer Si/Al za krutine zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 bez i s tretmanom u modelnim otopinama želuca i crijeva nalazi se u Tablici 10. S obzirom na to da se omjer mijenja s pH modelne otopine, možemo pretpostaviti kako se i afinitet površine za adsorpciju iona i ionsku izmjenu mijenja što je analizirano u daljnjim poglavljima.

Tablica 10. Omjer brojnosti silicija i aluminija na površini izmjerenih materijala, odnosno omjer Si/Al određen uz pomoć metode XPS možemo prikazati u tablici 10. za krutine zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 bez i s tretmanom u modelnim otopinama želuca i crijeva.

ZEOLIT	KRUTINA	Materijal tretiran u modelnoj otopini želuca	Materijal tretiran u modelnoj otopini crijeva
Zeolit A	1,06	0,90	1,13
TMAZ	4,6	5,97	3,91
PMA	5,7	5,94	2,59
PMAO2	4,67	4,44	3,93



Slika 29. Promjena omjera Si/Al na površini analiziranih krutina zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 tretiranih u modelnim otopinama želuca i crijeva.

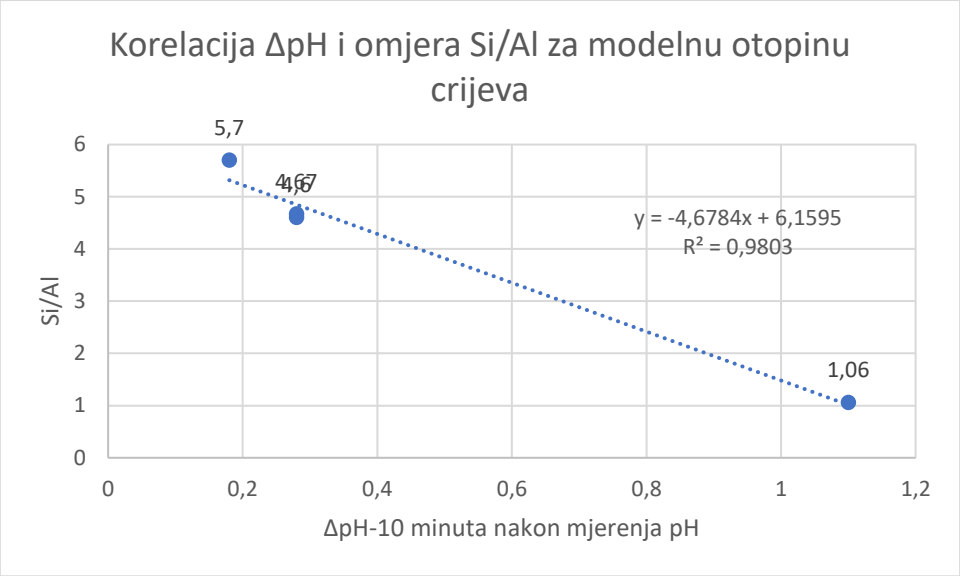
4.6. Mjerenje pH vrijednosti suspenzije zeolita u vodi i modelnim otopinama crijeva i želuca

Mjerenjem pH vode i modelnih otopina crijeva i želuca uz dodatak zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 i na temelju jednadžbe otapanja zeolita: $Mx(AlO4)y(SiO2)z + H_2O \rightarrow xM + yAl(OH)_4^- + zSi(OH)_4^-$, približno smo odrediti maksimalnu koncentraciju otpuštene ortosilicijeve kiseline i aluminija u korištenim otapalima. Osnovne vrijednosti pH suspenzija zeolita u vodi i modelnim otopinama prikazane su u tablici 11.

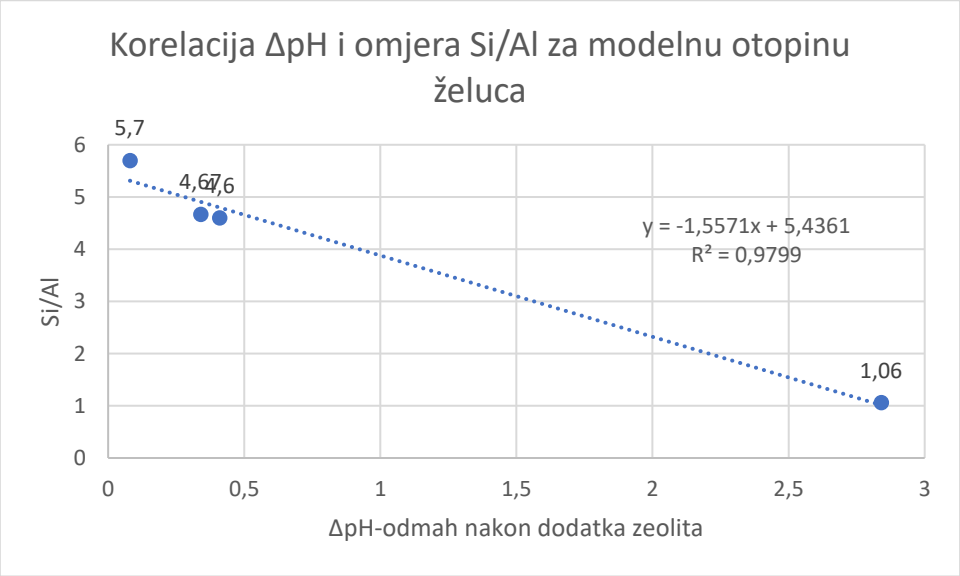
Tablica 11. Osnovne vrijednosti pH suspenzija zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u vodi i modelnim otopinama crijeva i želuca.

Vrijeme u kojem je zeolit ostavljen u modelnoj otopini/minute	pH zeolita u modelnoj otopini želudca			
	A	TMAZ	PMA	PMAO2
0	4,05	1,62	1,55	1,29
10	4,81	1,53	1,5	1,43
20	4,98	1,52	1,51	1,52
30	5,05	1,52	1,51	1,52
	pH zeolita u modelnoj otopini crijeva			
	A	TMAZ	PMA	PMAO2
0	8,81	7,76	7,92	7,76
10	9,92	8,04	8,1	8,04
20	10,07	8,06	8,1	8,06
30	10,11	8,06	8,1	8,06
	pH zeolita u ultračistoj vodi			
	A	TMAZ	PMA	PMAO2
0	10,57	7,12	7,14	7,13
10	11,14	7,46	8,92	8,8
20	11,12	8,1	8,85	8,79
30	11,1	8,32	8,79	8,75

Za modelnu otopinu želuca i crijeva određena je korelacija (slika 30).



A



B

Slika 30. Prikazuje ovisnost promjene pH o Si/Al omjeru za testirane zeolite: Panel A: Ovisnost ΔpH i omjera Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini crijeva; Panel B: Ovisnost ΔpH i omjera Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini želuca.

Promjene pH određene su nakon postizanja ustaljenog stanja pH. Za modelnu otopinu crijeva to je nakon 10 minuta, dok je za modelnu otopinu želuca to odmah

nakon dodatka zeolita u otopinu.

Tablica 12. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) ultra-čiste vode nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera Si/Al za svaki pojedini materijal.

	pH zeolitne suspenzije u ultra-čistoj vodi			
Tretman	zeolit A	TMAZ	PMA	PMAO2
0 min (prije dodatka zeolita)- ultra-čista voda	5,73	5,74	6,9	5,47
Dodatak zeolita (nakon1 min)	11,23	9,08	9,2	8,85
Inkubacija nakon 4 sata	9,35	7,51	7,81	7,66
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	9,32	6,98	7,03	7,12
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	9,33	7,15	7,42	7,39
	ΔpH (promjena pH) nakon tretmana u ultra-čistoj vodi			
Prije dodatka zeolita	0	0	0	0
Dodatak zeolita (nakon 1 minute)	5,5	3,34	2,3	3,38
Inkubacija nakon 4 sata	3,68	1,77	0,91	2,19
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	3,59	1,24	0,13	1,65
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	3,6	1,41	0,52	1,92
Omjer Si/Al (XPS) za pojedini zeolit	*1,06*	*4,6*	*5,7*	*4,67*

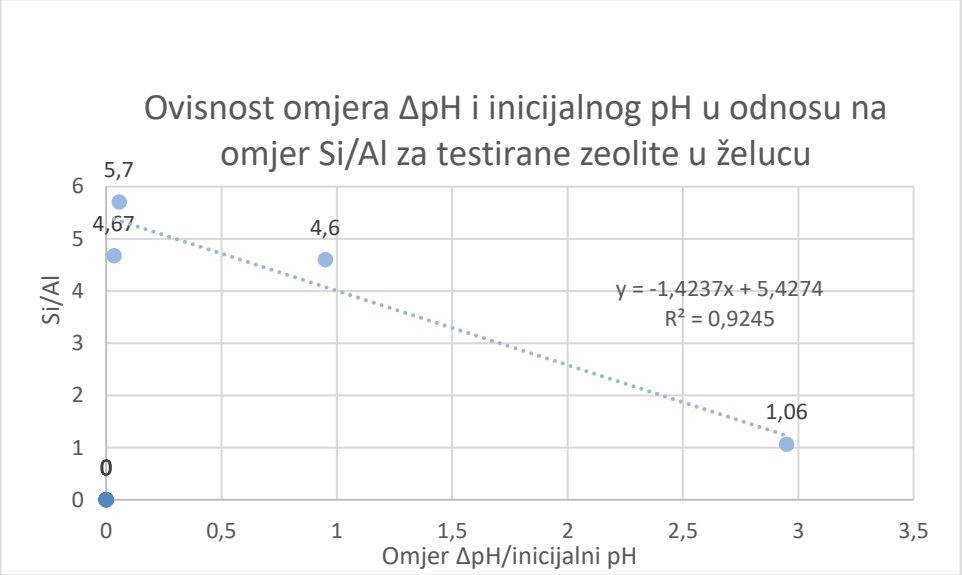
Tablica 13. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) modelne otopine želuca nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera Si/Al za svaki pojedini materijal.

	pH zeolitne suspenzije u modelnoj otopini želudca			
Tretman	zeolit A	TMAZ	PMA	PMAO2
0 min (prije dodatka zeolita)- modelna otopina želudca	1,05	1,01	0,88	1,19
Dodatak zeolita (nakon 1 minute)	4,15	1,97	0,93	1,23
Inkubacija nakon 4 sata	6,97	1,93	1,86	1,91
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	6,66	2,01	1,92	1,95
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	6,81	1,97	1,85	1,93
	ΔpH (promjena pH) nakon tretmana u modelnoj otopini želudca			
Prije dodatka zeolita	0	0	0	0
Dodatak zeolita (nakon 1 minute)	3,1	0,96	0,05	0,04
Inkubacija nakon 4 sata	5,92	0,92	0,98	0,72
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	-0,31	0,08	0,06	0,04
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	0,15	-0,04	-0,07	-0,02
Omjer Si/Al (XPS) za pojedini zeolit	*1,06*	*4,6*	*5,7*	*4,67*

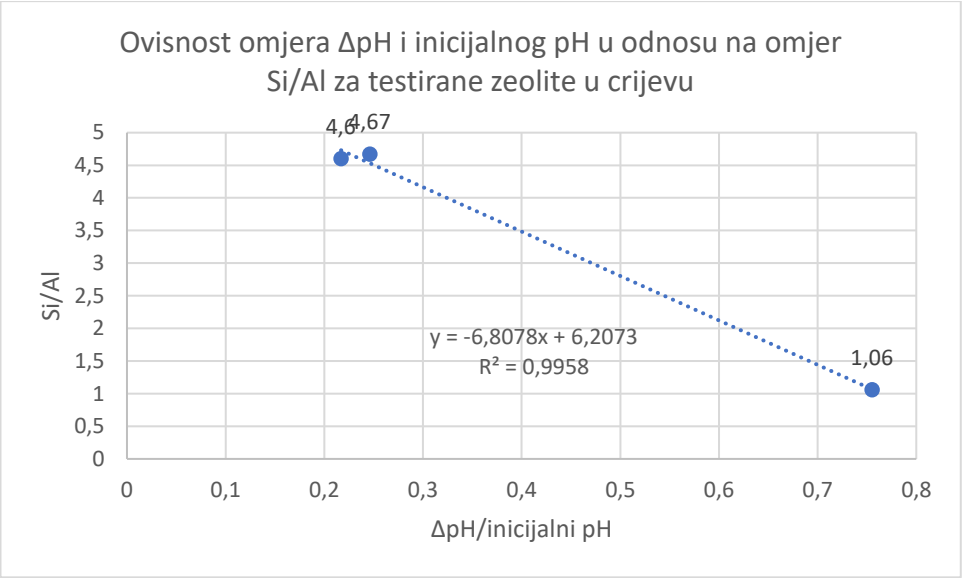
Tablica 14. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) modelne otopine crijeva nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera Si/Al za svaki pojedini materijal.

	pH vrijednost zeolitne suspenzije u modelnoj otopini crijeva			
Tretman	zeolit A	TMAZ	PMA	PMAO2
0 min (prije dodatka zeolita)- modelna otopina crijeva	5,69	6,71	8,61	6,50
Dodatak zeolita (nakon 1 minute)	9,99	8,17	8,31	8,10
Inkubacija nakon 4 sata	8,97	7,09	7,25	7,18
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	8,88	7,05	7,04	7,10
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	9,00	7,06	7,14	7,15
	ΔpH (promjena pH) nakon tretmana u modelnoj otopini crijeva			
Prije dodatka zeolita	0	0	0	0
Dodatak zeolita (nakon 1 minute)	4,3	1,46	0,3	1,6
Inkubacija nakon 4 sata	3,28	0,38	-1,36	0,68
Dekantirana suspenzija (centrifuga 14000 rpm)	-0,09	-0,04	-0,21	-0,08
Dekantirana suspenzija (ultracentrifuga 140000 rpm)	0,12	0,01	0,1	0,05
Omjer Si/Al (XPS) za pojedini zeolit	*1,06*	*4,6*	*5,7*	*4,67*

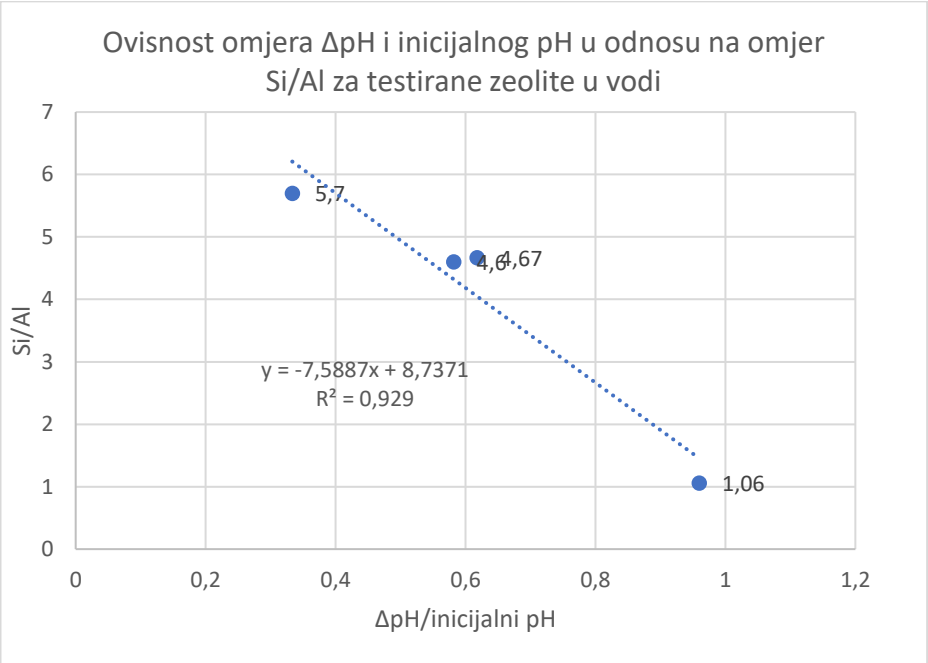
Iz rezultata mjerenja pH može se zaključiti kako zeoliti reagiraju lužnato tj. oslobađaju hidroksidne ione u suspenziju bilo da se radi o vodi ili modelnim otopinama. Posljedica je to ionske izmjene koja se događa u reakciji iona u zeolitima s molekulama vode, ali i otapanja kristalne rešetke zeolita. To vodi posljedično do stvaranja aluminijevog hidroksida i ortosilicijeve kiseline u reakcijama aluminijevih i silicijevih tetraedara s molekulama vode. Na temelju rezultata dobivenih mjerenjem pH u korelaciji s omjerom Si/Al utvrđenog za zeolitne materijale metodom XPS došlo se do slijedećih korelacija prikazanih na slici 31.



A



B



C

Slika 31. Prikazuje ovisnost udjela promjene pH vrijednosti svakog zeolita o ovisnosti s omjerom Si/Al krutog zeolita za svaku modelnu otopinu i vodu. Panel A: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini želuca; Panel B: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini crijeva; Panel C: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u vodi.

Iz rezultata se može zaključiti da povisivanjem udjela pH vrijednosti opada omjer Si/Al. Stoga je zeolit A najlužnatiji, a PMA zeolit najmanje lužnat. Na temelju XPS analize može se izračunati oslobođeni silicij i aluminij u 2g materijala u 0,2 dm^3 volumena vode ili modelnih otopina želuca i crijeva na temelju promjene sastava površine (Tablica 15).

Tablica 15. Predviđene mase otpuštenog aluminija (Al) i silicija (Si) s površine testiranih zeolitnih materijala (izraženih u mg) u modelnim otopinama želuca i crijeva.

	Modelna otopina crijeva		Modelna otopina želuca	
	Al	Si	Al	Si
Zeolit A	339 mg	371 mg	355 mg	400 mg
TMAZ	78 mg	85 mg	82 mg	92 mg
PMA	63 mg	69 mg	66 mg	81 mg
PMAO2	77 mg	84 mg	81 mg	91 mg

Budući da je pH crijeva blizak pH vode u ovom eksperimentu, ovi se izračunati podaci mogu aproksimirati kao dnevni unos aluminija i silicija u organizam. Mase $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ su stoga stehiometrijski prikazane u tablici 16.

Tablica 16. Stehiometrijski izračunate mase $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ u modelnim otopinama crijeva i želuca uz dodatak zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2. Rezultati su prikazani u mg.

	Modelna otopina crijeva		Modelna otopina želuca	
	$Al(OH)_3$	$Si(OH)_4$	$Al(OH)_3$	$Si(OH)_4$
Zeolit A	980 mg	1270 mg	986 mg	1369 mg
TMAZ	225 mg	290 mg	237 mg	327 mg
PMA	182 mg	236 mg	190 mg	277 mg
PMAO2	222 mg	287 mg	234 mg	311 mg

Temeljem ovih izračuna, može se opaziti da se zeolit A bolje otapa u modelnoj otopini želuca, dok se klinoptilolitni materijali isto tako ponašaju. Posljedica je to udjela aluminija u površini zeolita. Koncentracije $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ dane su u tablici 17. Budući da je pH crijeva blizu pH vode u ovom eksperimentu, ovo možemo aproksimirati kao dnevni unos aluminija i silicija u organizam. Američka federalna agencija za hranu i lijekove (FDA) ima na svom popisu antacid Gaviscon koji sadrži 160 mg $Al(OH)_3$ s 40 mg magnezijevog trisilikata. Lijek se može koristiti i 2-3 puta na dan što bi značilo da klinoptilolitni materijali uz ortosilicijevu kiselinu ne prelaze tu granicu. Zeolit A bi prelazio. Koncentracije aluminijevog hidroksida i ortosilicijeve kiseline u 200 mL vode prikazane su u tablici 17.

Tablica 17. Stehiometrijski izračunate koncentracije $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ u 200mL modelnih otopina zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2. Rezultati su prikazani u mmol/L.

	CRIJEVO		ŽELUDAC	
	$Al(OH)_3$	$Si(OH)_4$	$Al(OH)_3$	$Si(OH)_4$
A	62 mmol/L	66 mmol/L	66 mmol/L	71 mmol/L
TMAZ	14 mmol/L	15 mmol/L	15 mmol/L	16 mmol/L
PMA	12 mmol/L	12,3 mmol/L	12 mmol/L	14 mmol/L
PMAO2	14 mmol/L	15 mmol/L	15 mmol/L	16 mmol/L

Prema Exeleyu hidroksialuminosilikati tipa HAS_b nastaju kada reagira jednak omjer aluminijevog hidroksida i ortosilicijeve kiseline [64]. Prema ovoj tablici najveću količinu hidroksialuminosilikata kod klinoptilolitnih materijala stvara PMA zeolit, no treba napomenuti da analiza nije ispravno napravljena. Ostatak od aluminosilikata slobodna je ortosilicijeva kiselina. Prema ovim podatcima, najviše otpuštene ortosilicijeve kiseline daje PMAO2, s obzirom na to da zeolit A koagulira pri toj vrijednosti pH.

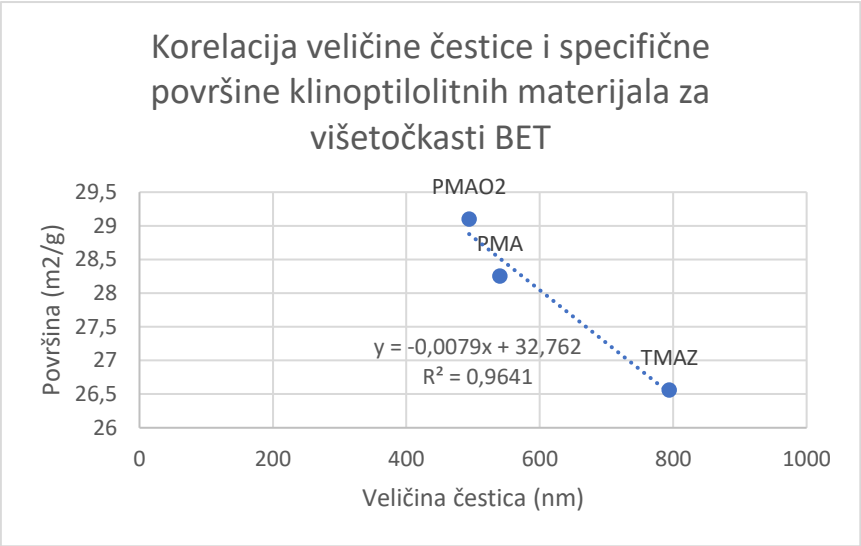
4.7. Brunauer–Emmett–Teller (BET) analiza površine materijala

Podaci o specifičnoj aktivnoj površini materijala bitni su za analizu svojstva adsorpcije određenih molekula, molekula plina ili molekula u otopini i iona. Što je veća specifična aktivna površina to je veći broj dostupnih mjesta za vezanje molekula. Površine testiranih zeolita određene su Brunauer–Emmett–Teller (BET) analizom. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 18.

Tablica 18. Brunauer–Emmett–Teller analiza zeolitnih materijala Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2 izražena u m^2g^{-1}. Veličina pora izražena je u nm. Standardna devijacija metode <0,5%.

UZORAK	VIŠETOČKASTA B.E.T. POVRŠINA (m^2g^{-1})	Veličina pora u nm
Zeolite A	3,2	997,4
TMAZ	28,7	996,8
PMA	29,4	374,3
PMAO2	30,7	258,3

Rezultati su pokazali da klinoptilolitni materijali imaju za 13 puta veću površinu od zeolita A. Uspoređujući veličinu čestice s njezinom specifičnom površinom može se zaključiti da što je manja klinoptilolitna nanočestica to je veća njezina specifična površina. Također se može vidjeti razlika svojstava površine dvostruko tribomehanički obrađenog klinoptilolita (PMA i PMAO2) od jednostruko obrađenog (TMAZ), na način da PMA i PMAO2 teoretski mogu adsorbirati veći broj molekula. Korelacija veličine čestice i specifične površine klinoptilolitnih materijala prikazana je na slici 31.



Slika 32. Ovisnost veličine čestice testiranih klinoptilolitnih TMAZ, PMA i PMAO2 o specifičnoj površini prikazana kao tih dvaju svojstava.

4.8. Kapacitet ionske izmjene/adsorpcije zeolita za teške metale *in vitro*

Za određivanje kapaciteta ionske izmjene/ adsorpcije teških metala zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 *in vitro* korišten je model multimetalne suspenzije zeolita uz elementarnu analizu GFAAS. Metali Pb, Cd, Hg, As, Cr i Ni su stoga, u suspenziju dodani kao multimetalni standard, a koncentracija metala u µg/L mjerena je na početku te nakon inkubacije metala sa zeolitima. Rezultati su prikazani u Tablici 19.

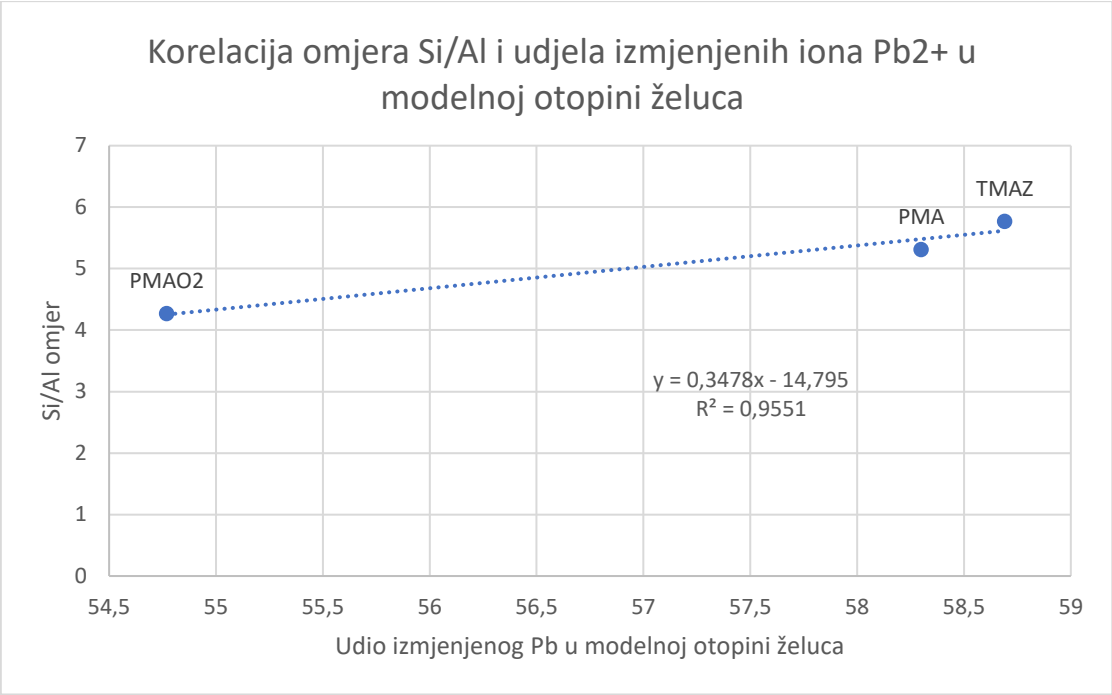
Tablica 19. GF-AAS elementna analiza koncentracija metala u modelnim otopinama želuca i crijeva uz dodatak 2g zeolita A, TMAZ, PMA ili PMAO2. Koncentracija metala određena je na početku pokusa neposredno po dodatku multimetalnog standarda u suspenziju zeolita te nakon inkubacije. Statistički relevantni rezultati su označeni zvjezdicom (*) ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao postotak količine metala (%) ± relativna SD.

			Postotak metala (%) ± relativna SD					
Modelna otopina	Zeolit	Tretman	Pb	Cd	As	Cr	Ni	Hg
ŽELUDAC	Zeolit A	Početno stanje	99,8 ± 13,5*	98,5 ± 0,6*	87,7 ± 6,9*	106,6 ± 12,9*	101,7 ± 13,1*	121,5 ± 0,9
		Nakon inkubacije	<2*	27,1 ± 24,1*	28,8 ± 34,2*	29,2 ± 36,6*	67,3 ± 14,3*	104,2 ± 4,1
	PMA	Početno stanje	102,9 ± 7,62*	98,6 ± 1,1	94,4 ± 9,9	112,5 ± 14,1	108,9 ± 0,3	115,68 ± 2,7
		Nakon inkubacije	38,0 ± 3,7*	96,3 ± 0,8	87,9 ± 13,9	126,7 ± 17,2	115,0 ± 16,5	108,38 ± 15,2
	PMAO2	Početno stanje	101,6 ± 14,52*	102,6 ± 14,6 6	96,7 ± 4,7	131,2 ± 38,7	113,1 ± 7,2	123,68 ± 12,6
		Nakon inkubacije	54,8 ± 19,05*	110,2 ± 16,5	94,7 ± 0,5	140,0 ± 38,8	121,9 ± 19,2	99,8 ± 11,5
	TMAZ	Početno stanje	95,4 ± 8,78*	93,4 ± 1,4	88,1 ± 4,4	109,4 ± 13,7	102,1 ± 2,3	126,18 ± 14,1
		Nakon inkubacije	36,7 ± 0,16*	84,1 ± 4,7	90,0 ± 3,6	115,4 ± 27,6	89,9 ± 7,6	112,68 ± 1,4
CRIJEVO	Zeolit A	Početno stanje	97,1 ± 0,5*	83,2 ± 3,5*	85,9 ± 13,8	101,5 ± 1,4*	97,5 ± 15,6*	122,7 ± 0,8*
		Nakon inkubacije	<4*	<2*	83,3 ± 27,6	9,7 ± 0,5*	<8*	23,84 ± 24,1*
	PMA	Početno stanje	99,5 ± 12,9*	99,1 ± 1,8	87,2 ± 3,7*	113,7 ± 11,2*	101,3 ± 6,3	112,16 ± 1,1
		Nakon inkubacije	<4*	73,2 ± 5,9	33,7 ± 9,1*	10,9 ± 1,9*	79,1 ± 1,7	110,84 ± 13,8
	PMAO2	Početno stanje	107,5 ± 9,1*	96,5 ± 4,7	86,0 ± 10,1*	112,2 ± 5,6*	103,1 ± 0,1*	126,52 ± 1,5
		Nakon inkubacije	<4*	81,4 ± 11,9	16,8 ± 8,3*	6,3 ± 1,7*	73,3 ± 2,5*	116,78 ± 24,6
	TMAZ	Početno stanje	100,6 ± 2,6*	87,2 ± 9,4*	82,5 ± 13,2*	118,6 ± 15,0*	104,9 ± 3,6*	127,84 ± 4,1
		Nakon inkubacije	7,3 ± 10,1*	39,3 ± 54,9*	22,2 ± 23,3*	5,8 ± 7,4*	34,8 ± 41,3*	61,86 ± 86,1

Ovim eksperimentom dokazali smo da zeoliti mogu biti adsorbensi za teške metale. Najbolji kapacitet uklanjanja metala iz suspenzije zeolita i multimetalnog standarda imao je Zeolit A koji je jedini vezao i Hg. Svi su zeoliti imali veliku sposobnost uklanjanja Pb pri niskom pH modelne otopine želuca (pH 1.2) te uklanjanje Pb, As, i Cr u modelnoj otopini crijeva (pH 6.5). U usporedbi s PMA, PMAO2 nešto je bolje vezao Ni, Cr i As a u usporedbi s TMAZ bolje je uklanjao Pb i As u modelnoj otopini crijeva. U istoj je otopini TMAZ bolje uklanjao ione Cd.

Tablica 20. Predloženi afinitet vezanja iona metala za pojedine zeolite temeljem podataka iz Tablice 19.

ZEOLIT	Masa/g	Redoslijed kapaciteta iona
ZEOLIT A	2	$Pb^{2+}>Ni^{2+}>Cr^{3+}>Hg^{2+}$
TMAZ	2	$Hg^{2+}>Cr^{3+}>Ni^{2+}>As^{3+}>Pb^{2+}$
PMA	2	$Pb^{2+}>Cd^{2+}>Cr^{3+}>As^{3+}>Ni^{2+}$
PMAO2	2	$Pb^{2+}>Cr^{3+}>As^{3+}>Ni^{2+}>Cd^{2+}$

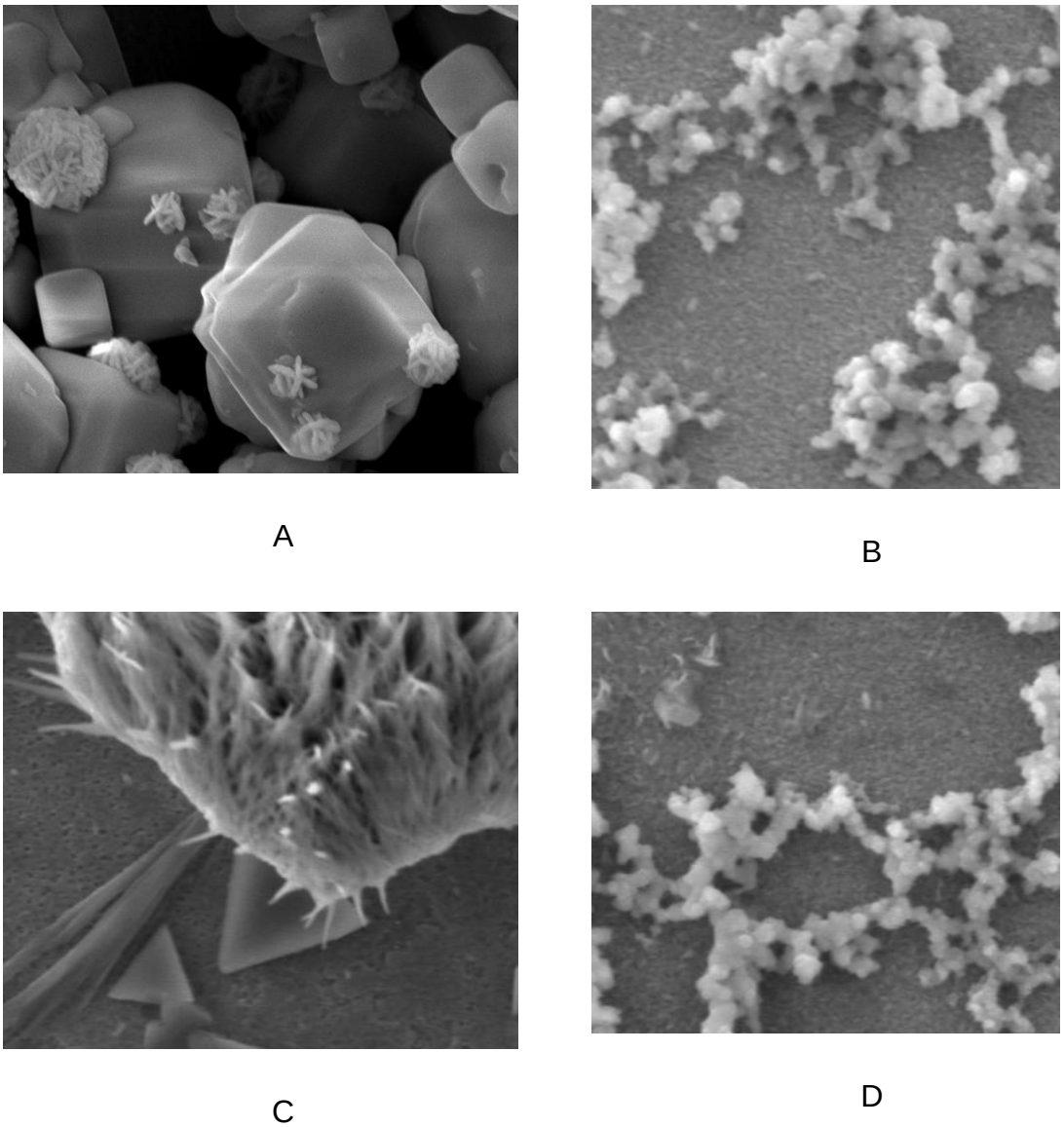


Slika 32. Korelacija omjera Si/Al i udjela izmijenjenih iona Pb^{2+} u modelnoj otopini želuca.

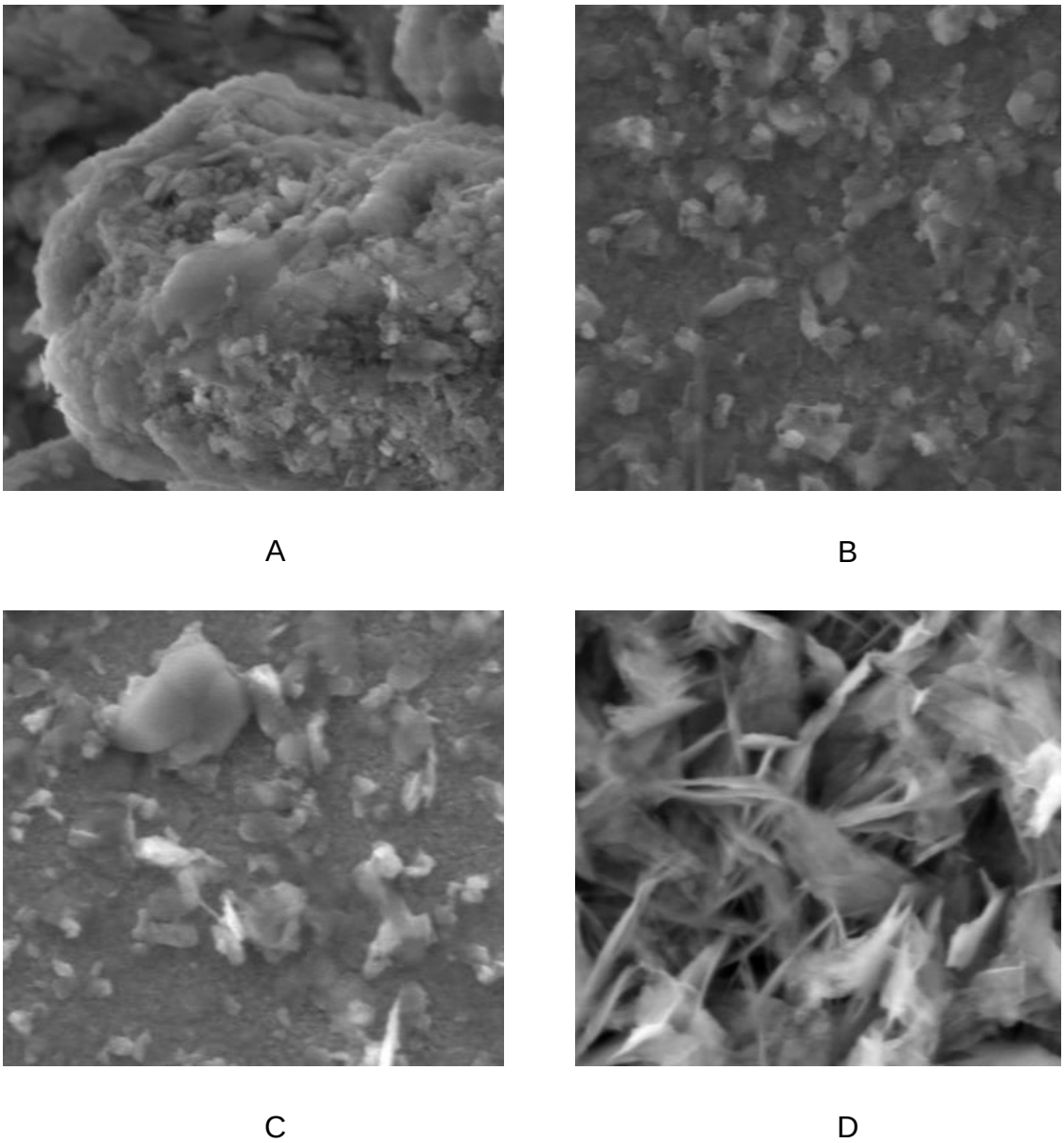
Ako u obzir uzmemo podatak kako je zeta potencijal pri niskoj pH vrijednosti klinoptilolitnih materijala bio jednak onima dobivenim u izmjeri s Pb^{2+} ionima, pretpostavljamo kako je došlo do izmjene iona, a ne do adsorpcije na površinu kao kod Ni^{2+}, jer se za nikal mijenjao zeta potencijal klinoptilolitnih materijala (Slika 28).

4.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) s elektronskom disperzijskom spektroskopijom (EDS)

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) u sprezi s elektronskom difrakcijskom spektroskopijom (EDS) omogućuje nam vizualizaciju materijala i kristala iz otopina i suspenzija te utvrđivanja elementnog sastava njihove površine. U ovome radu smo proveli snimanje površine zeolitnih materijala Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2, taloga zaostalih nakon dekantiranja i centrifugiranja njihovih suspenzija sa svrhom analize razlika u površini pojedinih materijala, ali i analize procesa otapanje zeolitnih materijala u vodi (slike 33- 36).



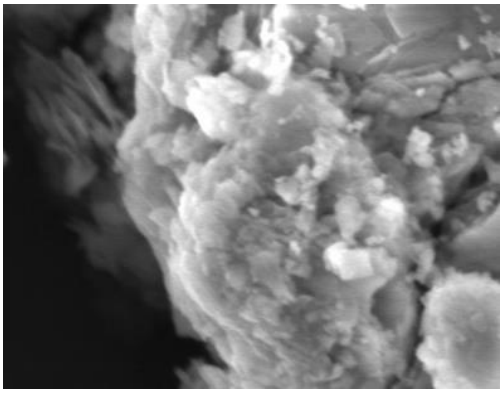
Slika 33. Snimke zeolita A te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: Zeolit A iz dekantirane suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 0,9; za panel B 27,6; za panel C 28; Za panel D: 3.



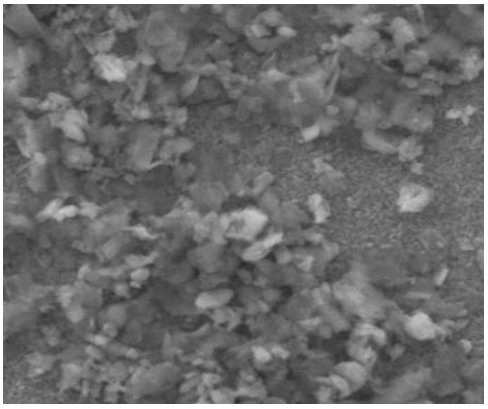
Slika 34. Snimke zeolita TMAZ te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: TMAZ iz dekantirani suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 7; Za panel B 100; Za panel C 63; za panel D samo Si signal.

SEM analiza Zeolita A i TMAZ pokazuje kako su čestice TMAZ veće od zeolita A, a omjer Si/Al površine krutine dobiven EDS analizom u skladu je s rezultatima XPS.

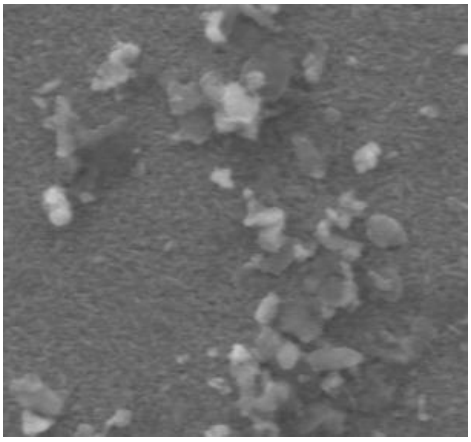
Nakon prvog centrifugiranja u suspenziji (paneli B) ostaju manje čestice zeolita i kristali formirani otapanjem površine koji pokazuju veći udio silicija na površini odnosno moguće se odnose na kristale topljivih formi silicija. Čestice ne koaguliraju. Nakon drugog centrifugiranja (panel C) vide se čestice manjeg udjela Si, ali su nešto većeg volumena što znači da je gustoća manja. Nakon ultracentrifugiranja uglavnom ostaje oligomerna ortosilicijeva kiselina (panel D).



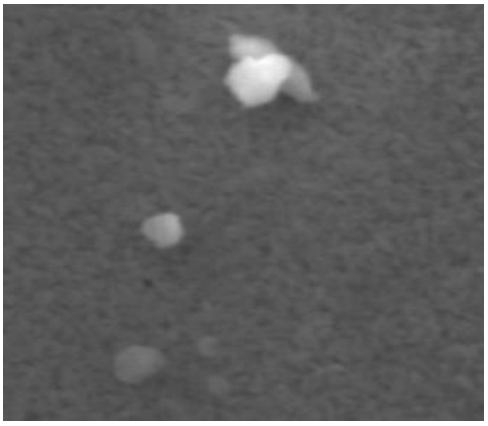
A



B



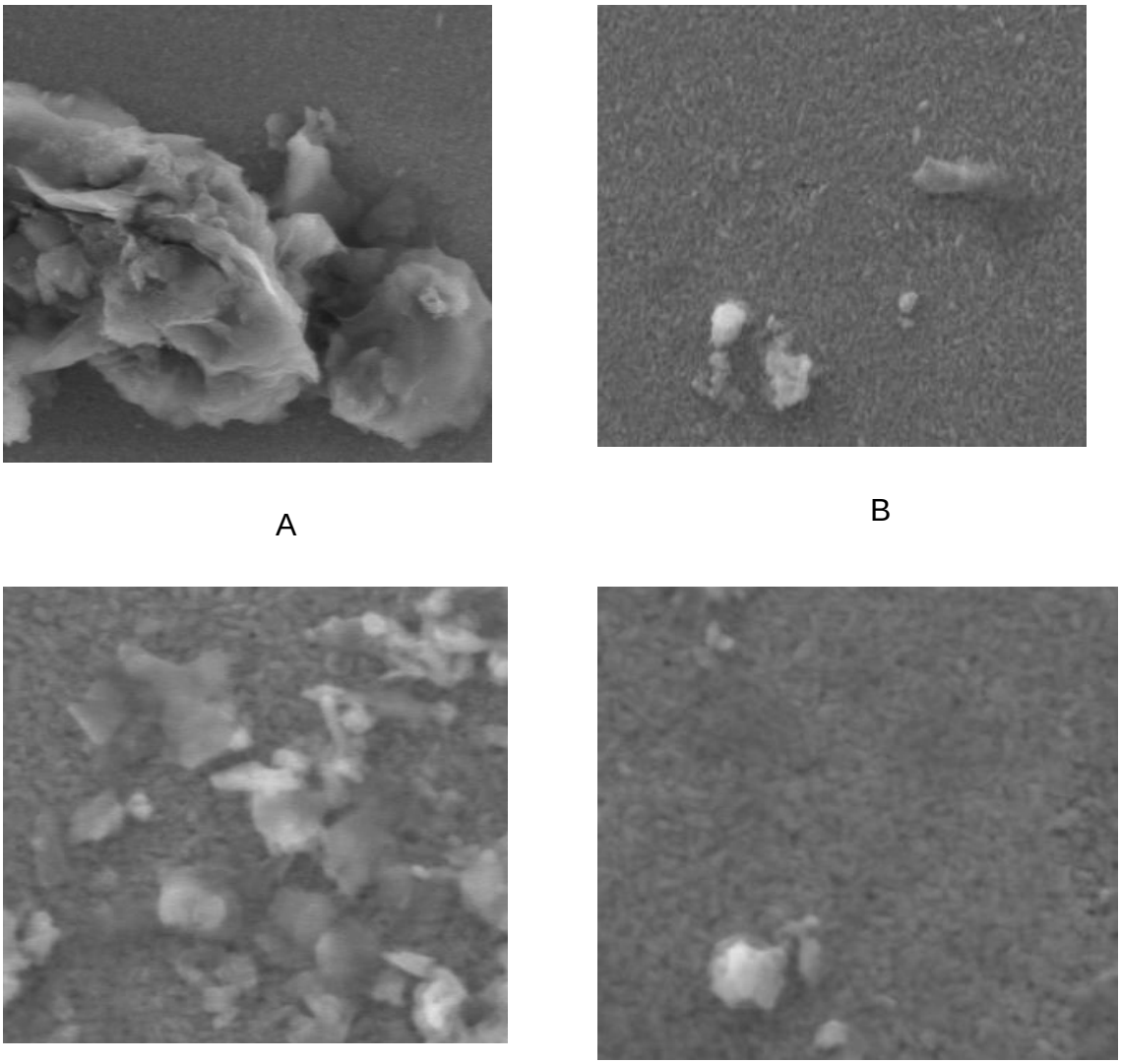
C



D

Slika 35. Snimke zeolita PMA te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: PMA iz dekantirane suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 4,7; Za panel B 93; Za panel C 114; za panel D samo Si signal.

EDS analiza zeolita PMA pokazuje omjer Si/Al u skladu s XPS rezultatima. Nakon prvog centrifugiranja u suspenziji (paneli B) ostaju manje čestice zeolita i kristali formirani otapanjem površine koji pokazuju veći udio silicija na površini. Nakon drugog centrifugiranja (panel C) vide se čestice s još većim udjelom silicija, a nakon ultracentrifugiranja uglavnom ostaje oligomerna ortosilicijeva kiselina (panel D). Rezultati za PMAO2 zeolit vrlo su ujednačeni s rezultatima za PMA zeolit.



Slika 36. Snimke zeolita PMAO2 te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: PMAO2 iz dekantirane suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 5,8; Za panel B 75; Za panel C 103; za panel D samo Si signal.

4.10. *In vivo* studija na štakorima

4.10.1. Razine metala i minerala u plazmi i organima štakora

Pokus sa zdravim štakorima imao je za cilj analizu učinka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 na razine metala i minerala u plazmi i organima (jetra, pluća, mozak, jajnici, bubreg i kost) životinja koje su dnevno hranjene pojedinim zeolitima u periodu od 42 dana odnosno analogno i u životinja koje su primale i subkroničnu dozu $AlCl_3$. Posebno smo željeli potvrditi ili odbaciti hipotezu o detoksikacijskom učinku klinoptilolitnih materija s obzirom na aluminij te pratiti učinak različitiih zeolita na homeostazu metala i minerala u zdravih životinja i životinja intoksiciranih $AlCl_3$. Koncentracije metala i minerala određene su u plazmi i organima životinja kao mjera fizioloških koncentracija metala i minerala (Tablica 21)

Tablica 21. Početne razine metala i minerala određene plazmi i organima životinja kao mjera fizioloških koncentracija metala i minerala na početku pokusa in vivo. Koncentracije izmjerenih elemenata u plazmi izražene su kao mg/l ili µg/l, a koncentracije izmjerenih elemenata u organima u mg/kg ili µg/kg.

	Element							
ORGAN	**Na**	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**
Koncentracija	mg/mL	mg/mL	µg/L	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	µg/L
Plazma	3274,08	23,86	7,80	3,73	137,77	105,69	8,02	2,55
Koncentracija	mg/kg	mg/kg	µg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Mozak	1270,21	199,0	247,00	1,81	3243,51	4602,72	185,89	19,68
Pluća	1650,21	104,54	637,06	2,84	1974,49	3257,28	120,60	108,12
Kost	7681,03	5747,96	952,41	6,18	128332,3	2202,11	313003,3	62,28
Jetra	622,33	172,96	175,97	2,70	2666,46	4014,76	39,43	450,53
Jajnici	1076,83	128,08	128,08	4,93	1520,03	2299,95	56,25	70,78
Bubreg	1689,43	224,34	369,14	1,71	2832,43	2989,42	88,51	99,54
	Element							
ORGAN	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**
Koncentracija	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
Plazma	0,80	1660,90	1620,02	42,25	382,24	0,04	0,67	0,22
Koncentracija	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Mozak	444,85	4,31	2888,26	14112,51	55,27	121,54	0,10	1,60
Pluća	223,89	7,98	1925,11	26886,11	936,46	319,85	0,87	4,30
Kost	570,47	215,72	877,26	215596,06	151,66	108,55	0,74	17,74
Jetra	2855,95	21,19	5446,44	33970,60	418,85	1429,98	13,20	2,48
Jajnici	281,48	5,47	1107,54	13412,21	130,35	197,19	0,94	5,25
Bubreg	977,90	320,88	15719,0	27243,05	154,32	1367,15	28,78	11,95

Tablica 22. Smanjenje ili povisivanje metala i nemetala u plazmi i organima primjenom Zeolita A, klinoptilolitnih materijala i koloidnog silicija. Strelicama gore i dolje označene su statistički značajne promjene u usporedbi s pozitivnom kontrolom ($p<0.05$). 0 – negativna kontrola; 1 – pozitivna kontrola ($AlCl_3$ intoksicirane životinje); 2 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + zeolit A; 3 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + TMAZ; 4 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + PMA; 5 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + PMAO2; 6 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + Ludox.

		Na	Mg	Al	Si	P	Ca	Fe	Mn	Co	Cu	Zn	As	Se	Cd	Sn	Pb	K
PLAZMA	0	↓	↓	↓	↓		↓	↓		↓			↓		↓	↓	↓	
	2	↑	↑	↑	↓		↑	↓		↓			↓		↑	↓	↓	
	3	↑	↑	↓	↓		↓	↓		↓			↓		↑	↓	↓	
	4	↑	↑	↓	↓		↑	↓		↓			↓		↑	↓	↑	
	5	↑	↑	↓	↓		↓	↓		↓			↓		↓	↓	↑	
	6	↓	↑	↓	↓		↓	↓		↓			↓		↓	↓	↑	
	1																	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
MOZAK	0	↑		↑	↑			↑	↓				↑					
	2	↓		↑	↑			↑	↓				↑					
	3	↓		↑	↑			↑	↑				↑					
	4	↓		↑	↑			↑	↑				↑					
	5	↓		↓	↓			↑	↑				↑					
	6	↓		↑	↑			↑	↑				↑					
	1																	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
JETRA	0	↓		↓							↑			↑			↓	↓
	2	↑		↓							↑						↓	↓
	3	↓		↓							↑			↑			↓	↓
	4	↑		↓							↑			↑			↓	↓
	5	↑		↓							↑						↓	↓
	6	↑												↑			↑	↓
	1																	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
BUBREG	0				↑			↑					↑		↑		↑	
	2				↑			↓					↑		↑		↑	
	3				↑			↑					↑		↑		↑	
	4				↑			↑					↑		↑		↑	
	5				↑			↓					↑		↑		↑	
	6				↑			↑					↓		↑		↑	
	1																	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
JAJ	0				↑		↑	↑					↑		↑		↑	
	2				↑		↑	↑					↑		↑		↑	
	3				↑		↑	↑					↑		↑		↑	

NICI	4				↑		↑	↑					↑		↑		↑	
	5				↑		↑	↑					↑		↑		↑	
	6				↑		↑	↑					↑		↑		↑	
	1																	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
KOST	0	↑	↑	↓	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↑	↑		↓	↑
	2	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↑	↓		↓	↑
	3	↑	↑	↓	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↓	↓		↑	↑
	4	↑	↑	↓	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↑	↓		↑	↑
	5	↑	↑	↓	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↓	↓		↑	↓
	6	↑	↑	↓		↑	↑		↑	↑	↑	↑		↓	↓		↑	↓
	0						↑											
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
PLUĆA	0				↓				↑	↑		↑	↑		↑		↑	↑
	2				↓				↓	↑		↑	↑		↑		↑	↓
	3				↓				↓	↑		↑	↑		↑		↑	↓
	4				↓				↓	↓		↑	↑		↑		↑	↓
	5				↓				↓	↓		↑	↑		↑		↑	↓
	6				↓				↓	↓		↑	↑		↑		↓	↓
	1																	

Tablica 23. Smanjenje ili povisivanje metala i nemetala u plazmi i organima primjenom Zeolita A, klinoptilolitnih materijala i koloidnog silicija. Strelicama gore i dolje označene su statistički značajne promjene u usporedbi s negativnom kontrolom ($p<0.05$). 0 – negativna kontrola; 1 – pozitivna kontrola ($AlCl_3$ intoksicirane životinje); 2A - zdrave životinje + zeolit A; 3A - $AlCl_3$ zdrave životinje + TMAZ; 4A - zdrave životinje + PMA; 5A - zdrave životinje + PMAO2; 6A - zdrave životinje + Ludox.

		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
PLAZMA	0																	
	1	↑	↑	↑	↑		↑	↑		↑			↑		↑	↑	↑	
	2A	↑	↑	↑	↓		↑	↓		↓			↓		↓	↓	↓	
	3A	↑	↑	↓	↓		↑	↓		↑			↓		↓	↓	↓	
	4A	↑	↑	↓	↓		↑	↓		↑			↓		↑	↓	↑	
	5A	↑	↑	↓	↓		↑	↓		↑			↓			↓	↓	
	6A	↑	↑	↓	↓		↑	↓		↓			↓		↑	↓	↓	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
MOZA	0																	
	1	↓		↓	↓			↓	↑				↓					
	2A	↓		↑	↑			↓	↓				↑					
	3A	↓		↓	↓			↓	↑				↓					

K	4A	↓		↓	↓			↓	↑				↓					
	5A	↓		↑	↓			↓	↑				↑					
	6A	↓		↓	↓			↓	↑				↓					
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
J	0																	
E	1	↑		↑								↑		↓			↑	↑
T	2A	↑		↑								↑		↓			↑	↑
R	3A	↑		↑								↑		↓			↑	↑
A	4A	↑		↑								↑		↑			↑	↓
	5A	↑		↑								↓		↑			↑	↑
	6A	↑		↑								↓		↑			↓	↓
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
B	0																	
U	1				↓			↓					↓		↓		↓	
B	2A				↓			↓					↓		↑		↓	
R	3A				↑			↓					↓		↓		↓	
E	4A				↓			↓					↓		↓		↓	
G	5A				↓			↓					↓		↑		↓	
	6A				↓			↓					↓		↑		↓	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
J	0																	
A	1				↓		↓	↓					↓		↓		↓	
J	2A				↓		↑						↑		↓		↓	
N	3A				↓		↓						↑		↑		↓	
I	4A				↓		↑	↑					↑		↑		↑	
C	5A				↓		↑	↑					↑		↓		↓	
I	6A				↓		↑	↑					↑		↓		↓	
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
	0																	
	1	↓	↓	↑	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓		↓	↓		↑	↓
K	2A	↓	↓	↑	↓	↓	↓		↑	↓	↑	↓		↓	↓		↑	↓
O	3A	↓	↓	↓	↓	↑	↑		↑	↓	↓	↓		↓	↓		↑	↓
S	4A	↓	↓	↓	↓	↑	↑		↑	↑	↓	↓		↓	↓		↑	↓
T	5A	↓	↓	↓	↓	↑	↑		↑	↑	↓	↓		↓	↓		↑	↓
	6A	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↑	↓		↓	↓		↑	↓
		Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**Ca**	**Fe**	**Mn**	**Co**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Se**	**Cd**	**Sn**	**Pb**	**K**
P	0				↑													
L	1				↑				↓	↓		↓	↓		↓		↓	↑
U	2A				↑					↓		↑			↑		↑	↓
Ć	3A				↑				↓	↓		↓	↑		↑		↑	↓
A	4A				↑				↑	↑		↑	↑		↑		↑	↓
	5A				↑				↑	↑		↑	↑		↑		↑	↓
	6A				↑				↓	↓		↓	↑		↑		↑	↓

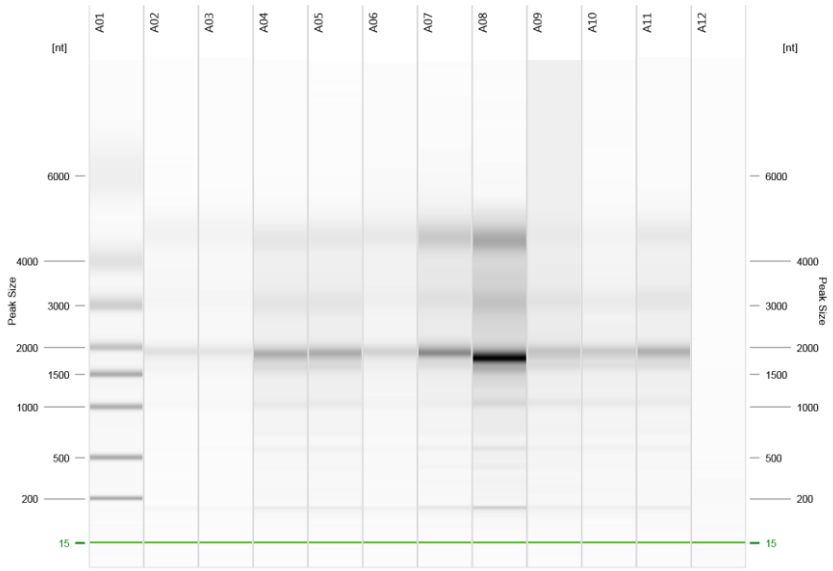
Iz tablica 22. i 23. može se zaključiti da dolazi do otpuštanja natrijevih, magnezijevih i kalcijevih iona u plazmu od strane klinoptilolitnih materijala. Zeolit A otpušta aluminij u plazmu, dok klinoptilolitni materijali smanjuju aluminij u plazmi. Isto tako dolazi do smanjenja arsena u plazmi od strane klinoptilolitnih materijala. Može se uočiti da je došlo do intoksikacije jetre od aluminija u životinja koje su primale subkroničnu dozu aluminijevog klorida. U jetri dolazi do smanjenja aluminija u plazmi primjenom klinoptilolitnih materijala. Svi klinoptilolitni materijali smanjuju razinu aluminija u jetri nakon intoksikacije aluminijevim kloridom, što dokazuje njihov detoksikacijski učinak koji se htio uočiti u ovom radu. Iako je hrana certificirana, u njoj se mogu naći teški metali poput olova, kadmija i arsena tako da analiza tih metala nije reprezentativna.

4.10.2. Izolacija RNA

Za potrebe provedbe DNA-mikročip analize, nakon ekstrakcije RNA iz jetre određena je njezina koncentracija i čistoća. Svi uzorci su zadovoljili uvjete za čistoću temeljem utvrđenog omjera absorbancije A260/280 te su podvrgnuti daljnjoj analizi.

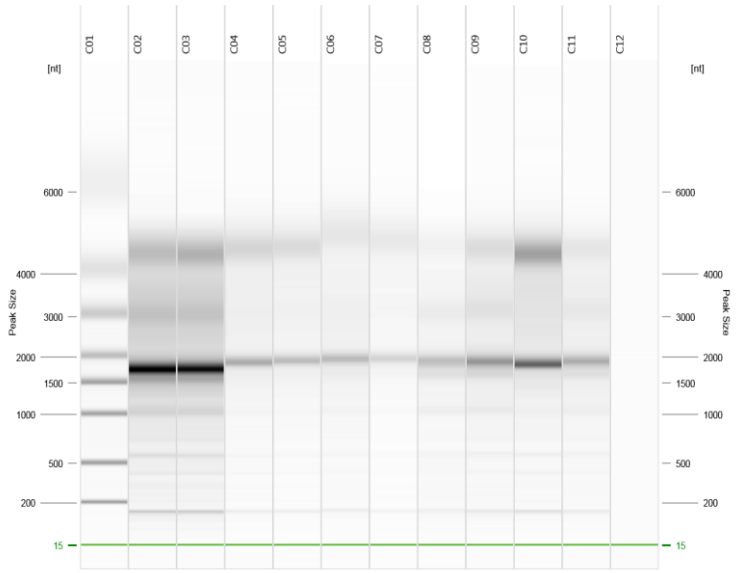
4.10.3. Provjera integriteta izoliranih RNA molekula

Nakon provjere koncentracije i čistoće RNA, kreće se u provjeru integriteta RNA molekula uz pomoć analize na gelu pri čemu se računa omjer koncentracije 18S i 28S ribosomske RNA, potom izražen kao RIS broj. Za mikročip analizu potrebno je imati RIS broj RNA veći od 7, što znači da molekule RNA nisu degradirane. Rezultati analize integriteta RNA uzoraka kojim se išlo u daljnju DNA mikročip analizu prikazani su na slikama 37-39.



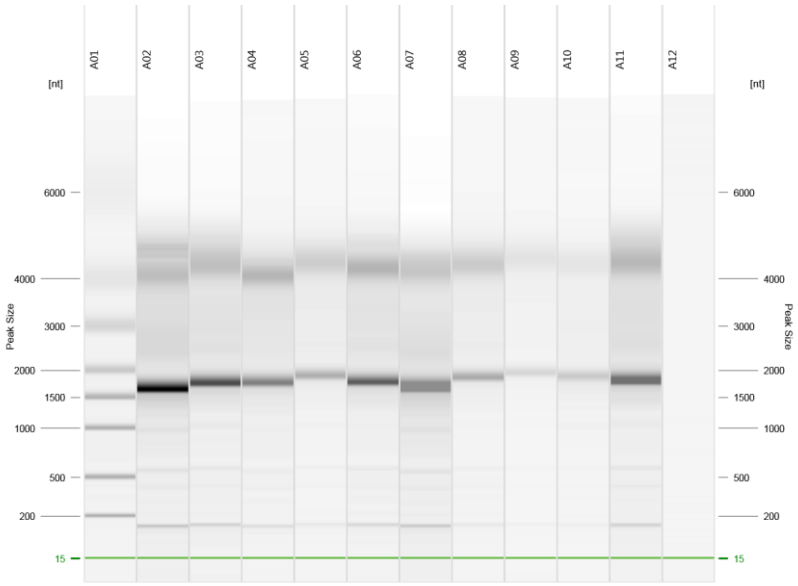
Red na elektroferogramu	Grupa	RIS broj
A01	Marker veličine	
A02	0	7,8
A03	0	7,3
A04	1	9,2
A05	1	9,2
A06	2	8,6
A07	3	8,6
A08	4	7,6
A09	5	8,1
A10	6	8,9
A11	5A	8,3
A12	pufer	

Slika 37. Elektroferogram prvog seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa in vivo.



Red na elektroferogramu	Grupa	RIS broj
C01	Marker veličine	
C02	0	6,8
C03	0	7,0
C04	1	7,6
C05	1	8,1
C06	2	7,9
C07	3	8,7
C08	4	7,9
C09	5	6,9
C10	6	6,2
C11	5A	8,1
C12	pufer	

Slika 38. Elektroferogram drugog seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa in vivo.



Red na elektroferogramu	Grupa	RIS broj
A01	Marker veličine	
A02	0	7,9
A03	0	8,0
A04	1	8,8
A05	1	8,7
A06	2	8,4
A07	3	6,7
A08	4	8,8
A09	5	8,1
A10	6	7,4
A11	5A	8,0
A12	Pufer	

Slika 39. Elektroferogram trećeg seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa in vivo.

4.10.4. Diferencijalna genska ekspresija po grupama i analiza funkcije gena u programu PANTHER

Nakon obrade DNA mikročipova uz pomoć komercijalnog programa uz mikročip platformu Feature Extraction, tekstualne datoteke analizirane su uz pomoć programa Genespring. Analiza je provedena usporedbom ekspresije gena u različitim skupinama sa statističkom značajnošću od $p<0,05$ i promjenom razine ekspresije 2 puta u odnosu na normalizirani, najmanje eksprimiran gen (Tablica 23). Diferencijalno eksprimirani geni dodatno su analizirani platformom Panther (http://www.pantherdb.org/) s ciljem utvrđivanja funkcije i signalnih putova u kojima navedeni geni sudjeluju.

Analiza diferencijalno eksprimiranih gena provedena je za grupe:

za grupu 0 - negativnu kontrolu

grupu 1 - intoksicirane životinje s $AlCl_3$

grupu 5A - životinje tretirane zeolitom PMAO2

grupu 5 - životinje tretirane $AlCl_3$ te dodatkom PMAO2 zeolita

Tablica 24. Popis diferencijalno eksprimiranih gena u štakorima intoksiciranim s $AlCl_3$ i hranjenih zeolitom PMAO2 (grupa 5) u odnosu na pozitivnu kontrolu (životinje intoksicirane $AlCl_3$, grupa 1)

Simbol gena	Naziv gena	Ekspresijski status (grupa 5)	Promjena ekspresije (engl. fold change)	Funkcija
A_43_P20274		Povišen	2,5	
A_44_P669616		Povišen	5,5	
Sfrp1	sekretorni frizzled-odnosni protein 1	Povišen	4,0	Sekretorni protein uključen u vezanje Wnt i antagonizira Wnt signalizaciju.
Fam160b2	Obitelj sa sličnosti u sekvenci 160, član B2	Povišen	2,3	Stupa u interakciju s bisfenolom A; C60 fulerenom; aflatoksinom B1 (Ortolog).
LOC683722	Fgfr1 onkogeni partner	Povišen	2,1	Kodira za protein koji ispoljava homodimerizacijsku aktivnost (ortolog); protein kinazno vezanje (ortolog); protein tirozinski kinazni inhibitor (ortolog); Uključen u negativnu regulaciju protein kinazne aktivnosti (ortolog); pozitivna regulacija staničnog rasta (ortolog); pozitivna regulacija stanične migrupamacije (ortolog); Nađen u centrosomima (ortolog); jezgrama (ortolog); perinuklearnoj

				regiji citoplazme (ortolog); Stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom (ortolog); 2,4-diaminotoluenom (ortolog); 4,4-diaminofenilmetanom (ortolog).
A_64_P007279		Povišen	2,2	
LOC103691658	Nekarakterizirani LOC103691658	Povišen	2,2	
LOC102555026	Nekarakterizirani LOC102555026	Povišen	2,3	
Sntn	sentan, cilijarni apikalni strukturni protein	Povišen	2,1	Stupa u interakciju s bisfenolom A; furanom ; 3,4-metilendioksimetamfetaminom (ortolog).
Cry1	Kriptokrom cirkadijarni sat 1	Povišen	3,5	Ovaj gen kodira flavin adenin nukleotid vezni protein koji je glavna komponenta cirkadijarnog oscilatorskog kompleksa koji regulira cirkadijarni sat. Ovaj gen je uzvodno reguliran s Clock/Arntl heterodimerima, ali onda smanjuje ekspresiju uzvodnom regulacijom u povratnoj sprezi koristeći Per/Cry heterodimer za interakciju s Clock/Arntl. Polimorfizam ovog gena je povezan s promjenom

				ritma spavanja. Kodirajući protein je široko očuvan u biljkama i životinjama. Gubitak gena u miševa rezultira u skraćivanju cirkadijarnog ciklusa u potpunom mraku.
Sp8	Sp8 transkripcijski faktor	Povišen	2,1	Kodira za protein koji ispoljava vezanje metalnih iona; vezanje nukleinskih kiselina; Uključen u dorzalno ventralnu formaciju (ortolog); embrionsku limbičku morfogenezu; proksimalno distalnu formaciju (ortolog); Stupa u interakciju s 3,3,5,5-tetrabromobisfenolom A (ortolog); 3,4-metilendioksimetamfetaminom (ortolog); aflatoksinom B1 (ortolog).
Hist1h2bh	Histonski klaster 1, H2bh	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava protein homodimerizacijsku aktivnost; Sudjeluje u sistemskom lupus eritematoznom putu; Nađen u citosolu (ortolog); ekstracelularnim egzosomima (ortolog); nukleoplazmi (Ortolog); Stupa u interakciju s oktilfenolom; 6-propil-2-tiouracilom; 7,12-

				dimetiltetrafenom.
Rassf8	Ras povezujuća (RalGDS/AF-6) obitelj domena , član 8 , N-terminalni	Povišen	2,3	Uključen u adherentne vezne spojeve ; signalni prijenos; Povezan s karcinomom malih stanica pluća; Stupa u interakciju s 6-propil-2-tiouracilk; alaklor; bisfenol A.
Tac3	tahikinin 3	Povišen	2,3	Navodni tahikininski protein 3
A_64_P023355		Snižen	2,1	
A_64_P073829		Snižen	3,0	
LOC102551726	Nekarakterizirani LOC102551726	Snižen	2,3	
Nr1d2	Nuklearna receptorska obitelj 1, Grupa D, član 1	Snižen	3,3	Ovaj gen kodira člana nuklearne hormonske receptorske obitelji, specifično NR1 subobitellj receptora. Kodirajući protein ima ulogu transkripcijskog represora i ulogu u cirkadijarnom ritmu i metabolizmu ugljikohidrata i lipida.
A_42_P829933		Snižen	2,1	
Slc35d2	Solutni nosać obitelji 35 carrier obitelji 35 (UDP-GlcNAc/UDP-glukozni transporter), član D2	Snižen	2,1	Uključen u pirimidin nukleotid-ugljikohidratni transmembranski transport; Nađen u Golgijevom aparatu (ortolog); Stupa u interakciju s 14-betaestradiolom; 2,4-dinitrotoluenom; 2,6-dinitrotoluenom.

Amdhd1	Amidohidrolazna domena 1	Snižen	2,4	Kodira za protein koji ispoljava hidrolaznu aktivnost, djelujući na ugljik-dušik veze, (ali ne u peptidu), u cikličkih amida; Uključen u histidinski katabolički proces do glutamata i formamida; Sudjeluje u histidinskom metaboličkom putu; histidinemija bolesnom putu; Nađen u citoplazmi; Stupa u interakciju s indol-3-metanolom; troglitazonom; 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom (ortolog).
RGD1309362	Sličan interferon-inducibilnoj GTPazi	Snižen	66,7	Kodira za protein koji ispoljava GTP vezanje; Stupa u interakciju s 4-(etoksimetilen)-2-feniloksazol-5-on; 6 – propil-2-tiouracilom;kadmijevim dikloridom.
Fntb	farnesiltransferaza, CAAX box, beta	Snižen	2,1	Beta podjedinica transferaze enzima; povezuje farnezil Grupama na cistein u ras i drugih membranski vezanih proteina.
Lrtomt	Leucin bogata transmembrana i O-metiltransferazna domena	Snižen	2,1	Kodira za protein koji ispoljava katehol O-metiltransferaznu aktivnost (ortolog); Uključen u auditivni receptorski stanični razvoj (ortolog); kateholaminski katabolički

				proces (ortolog); senzorna percepcija zvuka (ortolog); Povezan s višestrukim abnormalnostima; gluhoća, autosomalno recesivna 63 (ortolog); urođene genetičke bolesti (ortolog); Nađen u citoplazmi (naslijeđeno); Stupa u interakciju s bisfenolom A; furanom; 17 beta-estradiolom (ortolog).

Identificirani diferencijalno eksprimirani geni uključeni u sljedeće signalne putove stanica jetara:

- Angiogenezu
- Cirkadijalni satni geni
- Gena uključenih u Huntigtonovu bolest
- „Beskrilni Int-1“ signalni put (Wnt)

Tablica 25. Popis diferencijalno eksprimiranih gena u zdravih, neintoksiciranih štakora hranjenih zeolitom PMAO2 (grupa 5A) u odnosu na negativnu kontrolu (zdrave netretirane životinje, grupa 0).

Simbol gena	Naziv gena	Ekspresijski status (grupa 5A)	Promjena ekspresije (engl. fold change)	Funkcija
Kifc2	kinezinska obitelj član C2	Povišen	2,1	Mišji homolog može igrati ulogu u aksonalnom transportu.
LOC317471	Identičan hipotetičnom proteinu MGC35182.	Povišen	8,0	kodira za protein koji ispoljava vezanje mikrotubula (ortolog); uključen u stanični transport na hladnoću (ortolog); pozitivni regulator u građenju cilija (ortolog); nađen u aksonemalnim mikrotubulima (ortolog); centriolima (ortolog);
Car12	ugljična anhidraza 12	Povišen	2,2	Kodira za protein koji ispoljava karbonat dehidrataznu aktivnost; uključen u homeostazu kloridnih iona; asociran s hiperklorhidrozom; nađen u integralnoj komponenti membrane; stupa u interakciju s 17-beta-estradiolom;2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom; bisfenolom A.
LOC102549464	TBC1 domena	Povišen	3,5	
LOC102553173	nekarakterizirani	Povišen	2,2	

	LOC102553173			
Col20a1	Kolagen , tip XX, alfa 1	Povišen	2,9	Nađen u ekstracelularnom području; stupa u interakciju s amonijevim kloridom; bisfenolom A; C60 fulerenom.
Rpl10l	sličan ribosomalnom proteinu L-10	Povišen	4,8	Uključen u spermatogenezu (ortolog); Povezan s neoplazmom prostate ; nađen u velikoj ribosomalnoj podjedinici; membrani; ;jezgri; Stupa u interakciju s amonijevim kloridom; benzo[a] pirenom; bisfenolom A.
Hsp90aa1	šaperon 90, alfa (citosolni), klasa A, član 1	Povišen	2,3	Molekularni šaperon; uključen za izoliranje oštećenih proteina kao i u ATP-ovisnom strukturiranju proteina.
Ak1	adenilat kinaza 1	Povišen	2,1	Katalizira konverziju ATP-a u AMP do ADP-a u metabolizmu adenin nukleotida.
Brd1	bromodomena sadržavajući protein 1	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava vezanje histona: Uključen u odgovor za električni stimulus; odgovor na imobilizacijski stres; histon 3 acetilacija; Uključen u put histonske modifikacije; povezan s napadajima; Poremećajima autističnog spektra; Bipolarni poremećaj; nađen u dendritima;

				perikarionu; Kompleksu MOZ/MORF histon acetiltransferaze; stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksina ; 4-amino-2,6-dinitrotoluena; bisfenola A.
LOC102554877	Nekarakterizirani LOC102554877	Povišen	2,0	
Schip1	Švanomin intereagirajući protein 1	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava identično proteinsko vezivanje (ortolog); uključen u metabolički proces estrogena (ortolog); morfogenezu lica (ortolog); razvoj ženskih gonada (ortolog); Stupa u interakciju s beta-naftoflavonom; bisfenolom A; dibutil ftalatom.
LOC100909928	Nekarakterizirani LOC100909928	Povišen	2,2	
Olr35	olfaktorni receptor 35	Povišen	2,2	Olfaktorni receptor koji stupa u interakciju s mirisnim molekulama u nosu , započinje inicijaciju neuronskog odgovora za percepciju mirisa. Olfaktorni receptor proteini su članovi velike obitelji G-proteinskih receptora (GPCR) koji dolaze od jednog kodirajućeg egzona . Olfatorni receptori dijele 7-transmembransku strukturu s puno neurotransmitera i hormonskih receptora i

				ogovorni su za prepoznavanje za G-protein signalizaciju. Olfaktorna receptorska obitelj gena je najveća u genomu.
A_64_P181171		Povišen	22,2	
Glrx2	Glutaredoksin 2	Povišen	2,2	Kodira za protein koji ispoljava protein disulfidnu oksidoreduktaznu aktivnost ; uključen u starenje; stanični odgovor na superoksid; odgovor na vodikov peroksid; nađen u dendritima; mitohondrijskom matriksu; tijelu neurona; intereagira s 2,6-dinitrotoluenom; bisfenolom A; dialil sulfidom.
Dtna	distrobrevin, alfa	Povišen	3,0	Kodira za protein koji ispoljava PDZ veznu domenu: Povezan kardiomiopatijom (ortolog); Nađen u aksonu; citoplazmi; Stupa u interakciju s bisfenolom A; cisplatinom; dibutil ftalatom
RT1-A3	RT1 klasa I, lokus A3	Povišen	2,9	Antigensko procesiranje i autoimuni tiroidni patološki put; stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom; 2,4-dinitrotoluenom; 3-kloropropan-1,2-dionom.

Lcn2	lipokalin 2	Povišen	2,8	Mišji homolog igra ulogu u IL3 povlaćećoj -induciranoj apoptozi.
Rgma	odbijajuća vodljiva molekula obiteljski član A	Povišen	2,3	Kodira za protein koji ispoljava koreceptorsku aktivnost (ortolog); glikoproteinsko vezanje (ortolog); vezanje receptora (ortolog); Uključen u negativnu regulaciju aksonske regeneracije; negativnu regulaciju neuronskog projekscijskog razvoja; Sudjeluje u morfogenezi kostiju-signalnom putu; Povezan s epilepsijom; Temporalneg dijela; Ozljedi oka; Penetriranju;Srednjoj cerebralnoj arteriji; Nađen u neuronskoj projekciji; staničnoj površini (ortolog); endoplazmatskom retikulumu (ortolog); Stupa u interakciju s bisfenolom A; 17-alfa-etinilestradiol; (ortolog); 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom (Ortolog).
RT1-O1	RT1 klasa Ib, lokus O1	Povišen	50,2	Antigensko procesiranje i autoimuni tiroidni patološki put; stupa u interakciju s tioacetamidom.
LOC102546369	nekarakterizirani LOC102546369	Povišen	3,1	
Sema3c	sema domena imunoglobulinska domena (Ig), kratka	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava semaforinsko receptorsko vezanje

	bazična domena, sekrecijski, (semaforin) 3C			(ortolog); uključen u aksonsku vodljivost (ortolog); remodeliranje krvnih žila (ortolog); srčanu desnu ventrikulnu morfogenezu (ortolog); Povezan s artritisom, reumatoidnim (ortolog); napadajima (ortolog); Nađen u ekstracelularnom egzosomu (ortolog); ekstracelularnom prostoru (ortolog); stupa u interakciju 17beta-estradiol; 6-propil-2-tiouracil; bisfenol A
Chga	kromogrupamanin A	Povišen	2,1	Kiseli glikoprotein uključen u regulaciju gustoj-kori grupamanina biogeneze u neuroendokrinim i endokrinim stanicama.
LOC103690665	nekarakterizirani LOC103690665	Povišen	2,0	
Gnrh1	gonadotropin-oslobađajući hormon 1 (luteinizirajući oslobađajući hormon) hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	Povišen	2,0	Uključen u indukciju ovulacije; može inhibirati apoptozu prednjeg dijela stanica hipofize.
Tdrd1	sadrži tudor domesnku domenu 1	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava vezanje metalnih iona; Uključen u DNA metilaciju, uključen u generiranje gameta (ortolog); gensko utišavanje (ortolog); razvoj zametnih stanica (ortolog); Nađen u

				kromatoidnom tijelu; citoplazmi; intracelularnom ribonukleoproteinskom kompleksu; Stupa u interakciju s 1,3-dinitrobenzenom; bisfenolom A; 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom.
LOC102549526		Povišen	2,5	
Spire1	spire-tip actin nukleacija faktor 1	Povišen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava vezanje aktina: uključen u organizaciju citoskeleta (ortolog): ponašanje u strahu (ortolog); Nađen u staničnom korteksu; citoplazmatskoj vezikularnoj membrani (ortolog) ; stupa u interakciju s 17-beta-estradiolom;6-propil-2-tiouracil; bisfenol A.
Clic5	intracelularni kanala za kloridne ione 5	Povišen	2,5	Naponom ovisni kloridni kanal koji može igrati ulogu u funkciji bubrega.
Cdk1	ciklin ovisna kinaza 1	Snižen	3,5	navodni protein koji kontrolira stanični ciklus; homolog S. Pombe.
A_44_P496643		Snižen	3,4	
Tamm41	TAM41, mitohondrijski translokator i održavajući protein, homolog (S.cervisae).	Snižen	2,1	Kodira za protein koji ispoljava fosfatidat citidiltransferaznu aktivnost; uključen u kardiolipin biosintetički proces nađen u mitohondriju; interagira s bisfenolom A; oksaliplatinom;

				topotecanom.
Rbbp4	retinoblastoma vezni protein 4	Snižen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava DNA-ovisnu ATPaznu aktivnost: histon deacetilae vezanje; nukleosomalno DNA vezanje (ortolog); Uključen u odgovor na ATP-ovisno kromatinsko remodeliranje (ortolog); kromatinsko preuređivanje (ortolog); Sudjeluje u CHD kodiranju proteina koji ispoljava DNA-ovisnu ATPaznu aktivnost; histon deacetilazno vezanje (ortolog)histon deacetilazno vezanje (ortolog), Hedgehog signaliziranje, put histonske modifikacije, nađen u jezgri, CAF-1 kompleksu; citosolu; stupa u interakciju s bisfenolom A; stilbestrolom; indol-3-metanolom.
A_64_P013243		Snižen	2,9	
Mpv17l		Snižen	2.2	Kodira za protein koji ispoljava receptorsko vezivanje (ortolog); Uključen u negativnu regulaciju biosinteze vodikova peroksida (ortolog); negativnu regulaciju mitohondrijske vanjske mebrane uključene u apoptotički signalni put; metabolički proces reaktivnih

				kisikovih vrsta (ortolog); nađen u intracelularnoj membrani vezan za organele (oortolog); mitohondriju (ortolog); peroksisomu (ortolog); Stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom; bisfenolom A .
Slc39a5	Obitelj nosača otopljene supstance 39 (cinkov transporter), član 5	Snižen	2,0	Uključen u BMP signalni put (ortolog); stanični odgovor na nedostatak cinka; razvoj oka (ortolog); Nađen u bazolateralnoj memebrani ; ekstracelularnim egzosomima; Stupa u interakciju s bisfenolom A; Dekabromodifenil oksidom; furanom.
LOC102549812	faktor odgovora seruma homolog A-like	Snižen	10,1	
Pnpla5	patatin-slična fosfolipazna domena 5	Snižen	5,0	Kodira za protein koji ispoljava trigliceridnu lipaznu aktivnost; stupa u interakciju s 2,6-dinitrotoluenom; bisfenolom A.
A_44_P883462		Snižen	2,3	
Tcf19	transkripcijski faktor 19	Snižen	2,0	Mišji homolog može djelovati kao transkripcijski faktor da regulira gensku ekspresiju tijekom progresije staničnog ciklusa.
Psma2	proteasom (prosome, macropain) podjedinica, alfa tip 2	Snižen	2,0	Komponenta multikatalitičke komponente proteinaznog kompleksa.

Slco1a2		Snižen	2,0	prijenos edijata širokog spektra organskih aniona uključujući žučne kiseline, estrogenske konjugate, ouabain i digoksin, mogu biti uključeni u toksičnost digoksina.
Abcd2	ATP-vezna kazeta podobitelji A, ALD, član 2	Snižen	4,6	ATP-vezna kazeta (ABC), peroksisomalni polu-transporter s ALDRP koji formira funkcionalni heterodimer; mutacija u ABCD proteinu uzrokuje X-vezujuću adrenoleukodistrofiju.

Identificirani diferencijalno eksprimirani geni uključeni su u sljedeće signalne putove stanica jetre:

- Kolesticokinin receptorsku signalnu mapu
- De novo sintezu purina
- Signalni put gonadotropin-otpuštajućeg receptora
- Upalni proces reguliran preko kemokina i citokina
- Signalizaciju integrina
- Signalni put Parkinsonove bolesti
- p53 signalni put

Tablica 26. Popis diferencijalno eksprimiranih gena $AlCl_3$ intoksiciranih štakora (grupa 1) u odnosu na negativnu kontrolu (zdrave netretirane životinje, grupa 0).

Simbol gena	Naziv gena	Ekspresijski status	Promjena ekspresije (engl. fold change)	Funkcija
Tmem179	transmembranski protein 179	Povišen	3,9	Nađen kao integralna komponenta membrane: Stupa u interakciju s bisfenolom A; furanom; 2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenilom (ortolog)
Cadps	Ca++ ovisni sekrecijski aktivator	Povišen	2,6	Igra ulogu u kalcijevom ion-ovisnoj egzocitozi u neuroendokrinim stanicama
Tmem14a	transmembranski protein 14A	Povišen	5,0	
Cyp7a1	citokrom P450, obitelj 7, subobitelj a, polipeptid 1	Povišen	5,1	Katalizira konverziju kolesterola, NADPH i kisika u 7-α-hidroksikolesterol, NADP(+) i vodu. Igra ulogu u biosintezi žučnih kiselina i metabolizmu kolesterola.
Sbk1	SH3 domena vezna kinaza 1	Povišen	3,0	serine/treonin protein kinaza koja se eksprimira dominantnije u razvoju mozga
LOC103693279	nekarakterizirani LOC103693279	Povišen	4,9	
LOC102553864	Nekarakterizirani LOC102553864	Povišen	2,6	

Spink1	inhibitor serinske peptidaze, Kazal tip 1	Povišen	4,2	gušteračin sekretorni inhibitor
Nr1d2	Nuklearna receptorska subobitelj1, Grupa D, član 2	Povišen	3,5	Ovaj gen kodira člana nuklearne hormonske receptorske obitelji , specifično NR1 subobitelji receptora. Kodirani protein ima funkciju transkripcijskog represora i može imati ulogu u cirkadijarnom ritmu i metabolizmu ugljikohidrata i lipida.
Sult1c3	Sulfotransferazna obitelj , citosolna, 1C, član 3	Povišen	2,5	Za muški spol specifična sulfotransferaza koja katalizira sulfataciju N-hidroksi-2-acetilaminofluorena:igra ulogu u bioaktivaciji N-hidroksiarilamina u jetri.
LOC292603	slična kao SH3-vezna domena	Povišen	2,5	
Tmem14a	transmembranski protein 14A	Povišen	7,6	
Klhl25	kelch- obitelj član 25	Povišen	2,4	Uključen u ubikvitinaciju (ortolog);proteinska ubikvitinacija uključena u ubikvitin-ovisni katabolički proces (ortolog);Nađena u Cul3-RING ubikvitin ligazijskom kompleksu (ortolog); citoplazmi (ortolog); Stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksin; 2,4-

				dinitrotoluena; bisfenol A
Ackr2	atipični kemokinski receptor 2	Povišen	2,1	CC-kemokinski receptor; moguće je da ima ulogu u imunosti placente i hematopoezi.
Tnfaip2	Faktor tumorske nekroze, alfa-induciran protein 2	Povišen	2,3	Asociran s artritisom, interagira s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom: benzo [a] pirenom, bisfenolom A.
Ascl3	achaete-scute obitelj bHLH transkripcijski faktor 3	Snižen	10,3	Mišji homolog suprimira transkripciju i može imati ulogu u razvoju žlijezda slinovnica.
A_43_P16225		Snižen	2,8	
Rabif	RAB interreagirajući faktor	Snižen	2,4	Kodira za protein koji ispoljava vezanje cinka (ortolog); uključen u pozitivnu regulaciju GTP-azne aktivnosti; proteinskog transporta; male GTPazne signalne transdukcije; Interagira s 2,4-dinitrotoluenom; amonijevim kloridom; bisfenolom A.
Lingo4	Leucin bogato ponavljanje i Ig 4 domena.	Snižen	2,0	Uključen u pozitivnu regulaciju slaganja sinapsi (ortolog): nađen kao integralna komponenta membrane: stupa u interakciju s bisfenolom A; vinclozolinom; 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom

				(ortolog).
Ppm1k	Proteinska fosfataza , Mg2+/Mn2+ ovisna , 1K	Snižen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava vezanje metalnih iona;protein serin/treonin fosfatazna aktivnost; uključen u proteinsku defosforilaciju; nađen u mitohondriju; interagira s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom; 2,4-dinitrotoluenom; bisfenolom A
Scd2	Stearoil-koenzim A-desaturaza	Snižen	3,4	Enzim uključen u regulaciju sinteze oleinske kiseline u periferalnom živčanom sustavu.
A_44_P194939		Snižen	5,9	
Ascl3	achaete-scute obitelj bHLH transkripcijski faktor 3	Snižen	9,1	Mišji homolog suprimira transkripciju i može imati ulogu u razvoju žlijezda slinovnica.
Ccdc152	Sadrži zavijenu domenu 152	Snižen	2,1	Intereagira s 6-propil-2-tiouracil;bisfenol A; diuronom.
LOC103692469	Nekarakterizirani LOC103692469	Snižen	2,0	
A_42_P819067		Snižen	6,6	
Prom1	prominin 1	Snižen	2,4	Inducira ekspresiju 3-fosfat gliceraldehid dehidrogenaze (GADPH);može igrati ulogu u homeostazi glukoze.
Lonrf3	LON peptidaza N-terminalna domena	Snižen	2,0	Kodira za protein koji ispoljava cink ovisno vezanje.

	i kružni prsti 3			Stupa u interakciju s bisfenolom A; flutamidom, furanom.
A_44_P273515		Snižen	2,2	
Cry1	Kriptokrom cirkadijarni sat protein 1	Snižen	2,8	Ovaj gen kodira flavin adenin nukleotid vezni protein koji je glavna komponenta cirkadijarnog oscilatorskog kompleksa koji regulira cirkadijarni sat. Ovaj gen je uzvodno reguliran s Clock/Arntl heterodimerima, ali onda smanjuje ekspresiju u povratanoj sprezi koristeći Per/Cry heterodimer za interakciju s Clock/Arntl. Polimorfizam ovog gena je povezan s promjenom ritma spavanja. Kodirajući protein je široko očuvan u biljkama i životinjama.Gubitak gena u miševa rezultira u skraćivanju cirkadijarnog ciklusa u potpunom mraku
Zbtb16	Cinkovi prsti i BTB domena koja sadrži 16	Snižen	5,4	Kodira za protein koji se veže za metilirani histon (ortolog). Sudjeluje u negativnoj regulaciji transkripcije s promotora RNA polimeraze II (ortolog); pozitivna regulacija metilacije histona H3-K27 (ortolog); diferencijacija matičnih stanica (ortolog); sudjeluje u putu modifikacije histona; nađen u ESC/E(Z) kompleksu (ortolog); u interakciji s trans-retinoičnoj

				kiselini; bisfenolu A; kadmijevom kloridu.
Tcp11l2	t-komplex 11, testis-specifični-kao 2	Snižen	2,1	Stupa u interakciju s 2,3,7,8-tetraklordibenzodioksinom; 2,4-dinitrotoluenom; 2,6-dinitrotoluenom.
Ano7	anoktamin 7	Snižen	2,0	Ljudski homolog se eksprimira epitelnim stanicama prostate i tumoru prostate.
A_44_P883462		Snižen	2,0	
A_44_P1364260		Snižen	2,7	

Identificirani geni uneseni su u web platformu za klasifikaciju gena Panther (http://www.pantherdb.org/) prema kojoj je utvrđeno da su promijenjeni geni uključeni u sljedeći signalni put stanica jetre: cirkadijalni satni geni.

5. RASPRAVA

Trovanje topljivim aluminijevim solima opisano je u literaturi, a povezuje se s nizom bolesti, poput mikrocistične anemije, osteomalacije pa sve do neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimera, Parkinsonove bolesti, autizma itd. [54]. Iako je aluminij zastupljen u ljudskom organizmu, njegova uloga smatra se negativnom i nije u cijelosti razjašnjena. Dosadašnja istraživanja ukazuju primjerice, na njegovu toksičnost povezanu s nizom bolesti. To se najčešće povezuje s kemijskom interferencijom aluminija s fiziološkim metalima čime dolazi do poremećaja u radu enzima i bioloških procesa. Tako primjerice, aluminij povećava lipidnu peroksidaciju, oksidativni stres, remeti rad enzima, oštećuje membrane i biomolekule, te remeti hormonsku homeostazu [87]. Terapija nakon trovanja aluminijevim solima uključuje desferioksamin čiji je afinitet prema aluminiju velik, no izaziva niz neželjenih nuspojava poput gubitka svijesti, ototoksičnosti, trombocitopenija, renalne toksičnosti, katarakte itd. [88]. U današnje doba, raste broj dokaza o povećanom opterećenju ekosustava pa tako i živih bića, aluminijem. Budući je aluminij treći po zastupljenosti u Zemljinoj kori, a ima široku primjenu, došlo je do njegove sve veće eksploatacije u industriji. Nesavjesno odlaganje aluminija ima utjecaj na živi svijet pa tako primjerice i na biljke i životinje u kojima se može nagomilavati. Čovjek stoga ima kao član hranidbenog lanca direktne posljedice povećane količine aluminija u ekosustavu jer je isti topljiv u kiselom mediju, a svjedoci smo sve većeg utjecaja i kiselih kiša na okoliš. Aluminij stoga ulazi u biotički ciklus i trenutno ne postoji način kako ga eliminirati [56]. Stoga je svaki način detoksikacije aluminija koji bi imao manje ili neznatne neželjene nuspojave, važan za ljude i životinje.

U ovom doktoratu provedeno je istraživanje upravo jednog takvog materijala, prirodnog zeolita klinoptilolita, za koji se drži prema prethodnim rezultatima iz znanstvene literature smatra da može imati važnu ulogu u detoksikaciji organizma od aluminija [22]. Specifično, istražena su fizikalno-kemijska svojstva i biološki potencijal zeolita klinoptilolita pripravljenog za oralnu aplikaciju različitim metodama mikronizacije, na subkronično trovanje aluminijevim kloridom štakora kao modelnog organizma tijekom 42 dana. Od fizikalno-kemijskih svojstava klinoptilolitnih materijala obrađena su infracrvena spektroskopija tehnikom KBr pastile, atenuirana totalna refleksija, obje s Fourierovom transformacijom, dinamičko raspršenje svjetlosti, zeta

potencijal, rentgenska fotoelektronska spektroskopija, mjerenje pH vrijednosti u vodi i modelnim otopinama, BET analiza specifične površine, *in vitro* adsorpcija/ionska izmjena teških metala te skenirajuća elektronska mikroskopija spregnuta s elektronskom disperzijskom spektroskopijom.

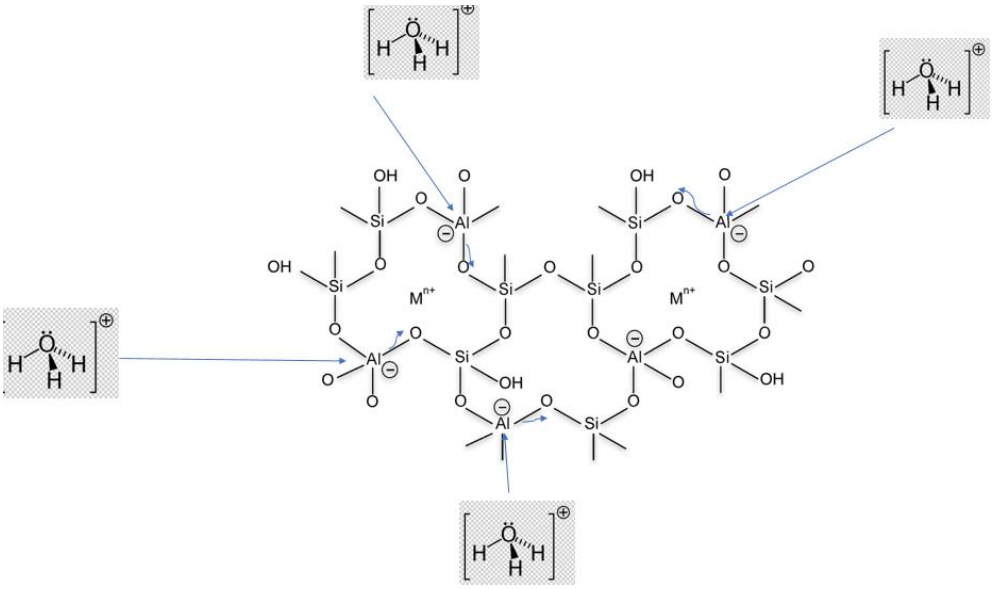
Zeoliti u prirodi dolaze kao nakupine minerala koje sadrže klinoptilolit i mordenit gdje je sadržaj zeolita 80% i više. Minerali s nižim postotkom zeolita su primjerice, bentonit, kristobalit, kalcit, feldspar ili kvarc [3]. Važno je međutim napomenuti kako naspram ovih kristalnih oblika zeolita u prirodi se nalaze i zeoliti koji sadrže vlakna, a čije je djelovanje opasno i štetno za ljudsko zdravlje [89], osobito stoga što induciraju biomolekule uključene u patološke procese [90,91]. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) u svom izvješću navodi kako je prirodni zeolit klinoptilolit siguran za oralnu aplikaciju životinja i ljudi čak i u vrlo visokim dozama (10000 mg/kg/hrane) [10]. Zadnjih desetljeća stoga je provedeno niz ispitivanja s pozitivnim biološkim učinkom ovog materijala u životinja i ljudi [22]. Biološki učinci zasigurno dijelom proizlaze iz specifične porozne strukture klinoptilolita i svojstva adsorpcije i ionske-izmjene čije se promjene očekuju u kiselim pH probavnog sustava čovjeka. U ovom radu je, primjerice, detaljnom analizom tehnikom KBr pastile pokazano kako dolazi do strukturnih promjena klinoptilolitnih materijala nakon njihove obrade u modelnim otopinama crijeva i želuca uslijed razlike u pH. Snimana su područja valnih brojeva 400-4000 cm^{-1}. Zeolitni su materijali, također, u ovom radu snimani i metodom atenuirane totalne refleksije 700-4000 cm^{-1}. Promjene na ATR-IR nije bilo moguće detektirati zbog ograničenog režima snimanja. Korelirane su stoga površine na valnim brojevima 1075 cm^{-1}, 602 cm^{-1} te 468 cm^{-1} s omjerom Si/Al testiranih klinoptilolitnih materijala. U obzir su uzete vrpce koje govore o Si-O-Si, Si-O-Al, Al/Si-O, O-Si-O, O-Al-O istezanjima ili savijanjima vezama prijavljenim u literaturi za klinoptilolit i aluminosilikate [92,93]. Dobivene jake korelacije omjera Si/Al s površinom vrpci pri valnim duljinama 1075 cm^{-1}, 602 cm^{-1} i 468 cm^{-1} idu u prilog razvoju metoda baziranim na ovoj metodologiji za brze testove kontrole kvalitete klinoptilolitnih materijala s obzirom na to da su zeoliti podijeljeni s obzirom na omjer Si/Al kao zeoliti s niskim , srednjim i visokim udjelom silicija što je važan parametar u određivanju specifične aplikacije. U ovom je doktoratu utvrđeno za prirodne zeolite klinoptilolite TMAZ, PMA i PMAO2 kako je površina na 608 cm^{-1} veća što je veći udio silicija.To je u skladu i izmjerenim većim udjelom silicija. S obzirom na to da je veza

Si-O ona s više energije od veze Al-O, to je i površina zeolita analogno dedukcijom iz izmjere veća. Isto tako u modelnoj otopini crijeva je veća dealuminacija što za posljedicu ima povišenje površine na 1075 cm^{-1} zbog većeg udjela silicija, a time i Si-O-Si asimetričnog istezanja. Kako su PMA i PMAO2 zeoliti dobiveni dvostrukom tribomehaničkom aktivacijom možemo zaključiti da se intenzivnijom mikronizacijom materijala povećava udio silicija na površini klinoptilolita. Ova je opservacija potvrđena metodama BET i XPS . Budući da se zeolit A odlično otapa u kiselom mediju [94] na aluminatne ione i ortosilicijevu kiselinu, a ima omjer Si/Al oko 1,1 očekivali smo kako će se i testirani klinoptilolitni materijali isto tako otapati u kiselini, ali u manjoj mjeri. Rezultati XPS analize pokazali su, naime, u za TMAZ, PMA i PMAO2 omjer Si/Al iznosio je redom 3,91, 2,59 te 3,93. Kod modelne otopine želuca došlo je do veće dealuminacije i oslobađanja Al^{3+}iona u otopinu, dok je struktura sadržavala veći udio silikatne strukture. U modelnoj otopini želuca omjer Si/Al iznosio je redom za TMAZ, PMA i PMAO2 5,97, 5,94 i 4,44.

Dinamičkim raspršenjem svjetlosti određena je veličina čestica testiranih zeolita. Pokazano je da stupanj tribomehaničke aktivacije korelira s veličinom čestica te su dvostruko aktivirani PMA i PMAO2 manji od TMAZ-a koji je jednom tribomehanički obrađen. Bitno je to za biološku funkciju ovih materijala jer čestice koje su manje od 1000 nm mogu ući u M stanice epitela crijeva te vjerojatno i u Peyerove plohe gdje potiču proliferaciju i diferencijaciju imunosnih stanica, odnosno aktiviraju imunološke procese [22]. U ovom radu međutim, nije istražen učinak ovih materijala na imunološke parametre životinja. Fokus je stavljen na procese detoksikacije adsorpcijom i ionskom izmjenom, te su praćena i svojstva koja osim promjena sastava površine utječu i na naboj. Primjerice, amfoternost klinoptilolita dokazana je njegovim zeta potencijalom koji predstavlja “efektivni” naboj zeolita. Ako pogledamo njegovo ponašanje u vodi na slici 23., pri pH 3-11 vidi se da je potencijal klinoptilolitnih materijala relativno konstantan. Pri pH>7 ponaša se međutim kao kiselina jer dolazi do deprotonacije silanolnih skupina. Time naboj na površini postaje negativno nabijen. Pri pH<7 silanolne skupine se protoniraju, ali dolazi do veće destrukcije kristalne rešetke što je popraćeno trošenjem oksonijevih iona. Isto tako se zeta potencijal olovnog iona u većoj mjeri preklapa sa zeta potencijalom samog klinoptilolita. Uz dodatak niklovog iona, zeta potencijal se mijenjao u kontaktu s klinoptilolitom. Metodom preklapanja i mijenjanja potencijala moglo bi se zaključiti da

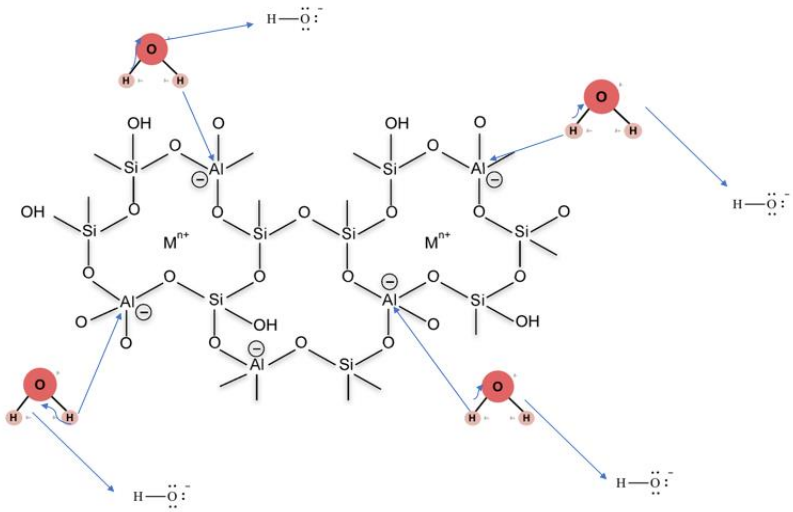
li se radi o ionskoj izmjeni ili adsorpciji iona na klinoptilolit. U slučaju olova radi se stoga većim dijelom o ionskoj izmjeni dok je kod nikla to adsorpcija. Na oba su ova metala naime, svi testirani materijali pokazali afinitet u uvjetima *in vitro*. Isto tako svi zeoliti pokazali su afinitet prema olovu (II), niklu (II), kromu (III) dok je arsen(III) specifično vezan za klinoptilolitne strukture. Kadmij (II) se specifično vezao samo za dvostruko aktivirane klinoptilolitne materijale. To je vjerojatno posljedica interakcije električnog polja koje stvara klinoptilolitni materijal s električnim poljem iona i specifičan je za svaki ion, a uključuje kombinaciju ionske izmjene i adsorpcije na površinu testiranih materijala.

Iz empirijskih formula klinoptilolitnih materijala može se vidjeti da svi klinoptilolitni materijali u modelnoj otopini želuca i crijeva sadrže željezo. Isto ne vrijedi za zeolit A. Takvo bi željezo moglo izazvati kemijsku reakciju s vodikovim peroksidom u Fentonovoj reakciji, što je vjerojatni mehanizam djelovanja klinoptilolita prethodno opisan u literaturi na tumorske stanične linije in vitro koje sadrže veliku količinu vodikovog peroksida [22]. Naime dokazano je konfokalnom mikroskopijom da zeolitne nanočestice mogu ući u tumorske stanice kao što su to primjerice Hela tumorske stanice i u njima inducirati oksidativni stres [95]. Nadalje, promjene uočene na površini testiranih zeolitnih materijala pri pH probavnog trakta mogle bi opisati opservirani učinak na detoksikaciju aluminija in vivo ali i objasniti razloge zbog kojih aluminij iz samih materijala ne ulazi u krvotok. Mjerenjem pH vrijednosti zeolita vidjelo se naime, kako svi djeluju lužnato jer povećavaju pH vrijednosti modelne otopine želuca, crijeva i ultra-čiste vode. Posljedica je to zamjena oksonijevih iona ionima alkalijskih i zemnoalkalijskih metala u strukturi zeolita, ali i posljedica protoniranja aluminijevih AlO_4 i SiO_4 tetraedara. Na slici 40. predložen je mehanizam otapanja zeolita u kiselom mediju.



Slika 40. Predloženi prikaz napada oksonijevih iona na zeolitnu strukturu . Slika prikazuje zeolitnu strukturu i oksonijeve ione. Plavom ravnom strjelicom označeni su napadi oksonijevih iona na aluminijeve ione, a kao posljedica su pomaci elektrona označeni plavom iskrivljenom strjelicom. Preuzeto i adaptirano prema [1].

Otapanje zeolita u vodi možemo nadalje prikazati slikom 41.



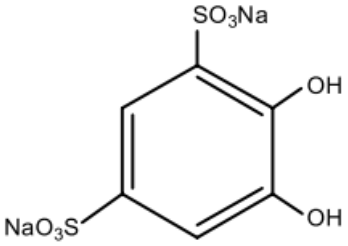
Slika 41. Otapanje zeolita u vodi i posljedično otpuštanje hidroksidnih iona. Slika prikazuje zeolitnu strukturu, molekule vode i hidroksidne ione. Plave ravne strjelice označavaju napad na aluminijeve ione i oslobađanje hidroksidnih iona, a plava iskrivljena strjelica pomak elektrona. Preuzeto i adaptirano prema [1].

U literaturi je opisano i otapanje zeolita klinoptilolita u lužnatom mediju , pri kojem je mehanizam otapanja aluminija i silicija opisan s površine s obzirom na to da se deprotoniraju -OH skupine na površini aluminija i silicija i nastaje nestabilna negativno nabijena struktura koja se razgrađuje na aluminat ion i ortosilicijevu kiselinu [15]. Promjena površine testiranih zeolitnih materijala analizirana je i skenirajućom elektronskom mikroskopijom spregnutom s elektronskom disperzijskom spektroskopijom. Ovom smo metodom dobili uvid u izgled i sastav površine centrifugiranih klinoptilolitnih materijala u ultra-čistoj vodi. Značajno je da su klinoptilolitni materijali otapanjem stvarali oligomere što se vidjelo i na slikanim preparatima u kojima se moglo pratiti formiranje oligomerne silike (na slikama 33-36, paneli D klinoptilolitnih materijala – vidi se samo Si-signal). Oligomerna silika ima koeficijent vezivanja za aluminij log K_{eff} = 11,7 [96] za razliku od monomerne ortosilicijeve kiseline koja ima log K_{eff}= 4,7 pri pH=7,2 [97]. Time bismo mogli i

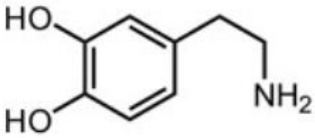
objasniti paradoks da usprkos tomu što klinoptilolitni materijali otpuštaju aluminij s površine u kiselom pH, istovremeno ga i povlače zbog formiranja oligomerne silike te tako izlučuju fecesom iz organizma. Utjecaj oligomerne silike na aluminij opisan je i u literaturi [98]. U ovom smo setu eksperimenata utvrdili i kako klinoptilolitni materijali sadrže polimorfnu skupinu čestica otapanjem u vodi, čiji je sastav heterogen. Upravo zbog toga mogle su se snimiti strukture različitog izgleda i različitog omjera Si/Al. Naime, uspoređujući omjer Si/Al pri otapanju klinoptilolitnih materijala u ultra-čiste vode vodi i u modelnoj otopini crijeva koji imaju blizak pH, utvrđeno je da centrifugiranjem najprije sedimentiraju čestice s većim udjelom aluminija, dok čestice bogate silicijevim atomima ostaju u otopini. Površinski sastav klinoptilolitnih materijala potvrđen je i uz pomoć XPS.

ICP-MS analiza plazme testiranih životinja također je potvrdila da klinoptilolitni materijali ne otpuštaju aluminij u krvotok, ali niti u eritrocite jer je razina aluminija u jetrima u tretmanu klinoptilolitnim materijalima bila jednaka kontrolnoj skupini. Naime, niže koncentracije aluminija nakupljaju se u eritrocitima dok više ostaju u plazmi. Za razliku od klinoptilolitnih materijala Zeolit A otpuštao je aluminij u plazmu te se stoga ne preporuča za oralnu primjenu. Iz rezultata istraživanja može se vidjeti kako aluminijevi ioni, nakupljeni u jetri mogu biti uklonjeni i uz pomoć suplementacije intoksiciranih životinja ortosilicijevom kiselinom, s obzirom na to da oligomerna silika u drugom obliku ne prolazi crijevnu barijeru. U prethodno objavljenom radu nađeno je da klinoptilolitna suspenzija povećava urinarnu ekskreciju nekih metala poput aluminija, antimona, arsena, bizmuta, kadmija, olova, žive nikla i kositra [16]. Isto tako, nije dokazano statistički značajno povišenje razine aluminosilikata u bubregu, što ukazuje na to da ne dolazi do nakupljanja čestica u bubregu već se iste izlučuju urinom, vjerojatno kao hidroksialuminosilikatni kompleksi (HAS) što je proučavala grupa prof. Exleya [64]. Zanimljivo je da s razinom smanjenja aluminija u intoksiciranih životinja dolazi i do smanjenja endogenog selena iz još nepoznatih razloga. Budući da ista metoda može mjeriti statistički značajne razlike selena u jetri, za pretpostaviti je da se prijavljeno povišenje antioksidativnih aktivnosti ne pripisuje otpuštanju selena od strane klinoptilolita već je za to odgovorna vjerojatno ortosilicijeva kiselina. Ona bi stvarala komplekse s kateholaminima (dopamin, adrenalin i noradrenalin) kako je prikazano u kompleksu s derivatom katehola tironom [99]. Naime, poznato je da kateholamini mogu uzrokovati oksidativni stres

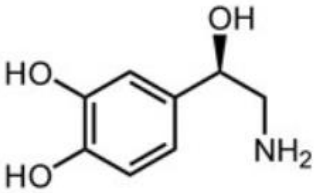
[100,101] ali i stvaranje njihovih neurotoksina DOPEGAL i DAPAL koji utječu na neurodegeneracije, [102] koje bi ortosilicijeva kiselina također mogla vezati, a sudjeluju u neurodegeneracijama poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. To ukazuje na neke nove mete u signalizaciji neuredegenerativnih oboljenja i mogućnosti sinteze novih lijekova na bazi silicija.



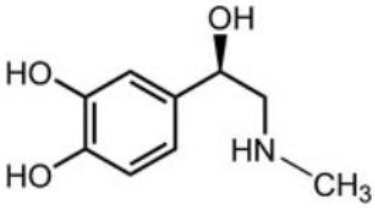
Tiron-derivat katehola



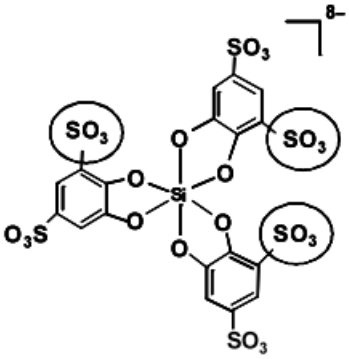
dopamin

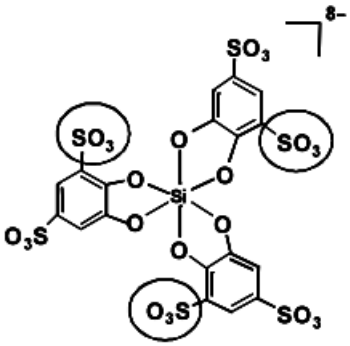


noradrenalin



adrenalin





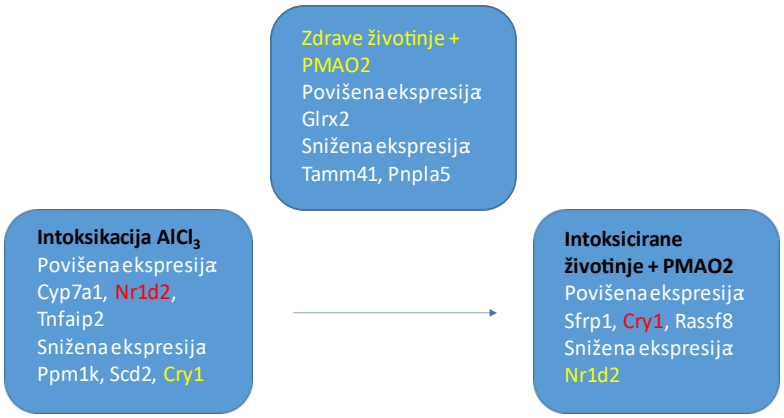
Slika 42. Strukture tirona, dopamina, noradrenalina, adrenalina i kompleksa ortosilicijeve kiseline i derivata katehola-tirona. Preuzeto od [99].

Rezultati analize detoksikacije u uvjetima *in vitro* pokazuju da svi testirani klinoptilolitni materijali imaju jaki kapacitet za vezanje olovljevog (II) iona u modelnoj otopini želuca i crijeva, dok samo zeolit A uspješno uklanja druge katione iz otopine. Jedino je TMAZ u modelnoj otopini crijeva vezao kadmijeve (II) ione, Arsenovi (III) ioni specifično su se vezali za klinoptilolitne strukture u modelnoj otopini crijeva, dok su se kromovi (III) ioni vezali za strukture svih zeolita u modelnoj otopini crijeva. Živa (II) ion se vezao samo za zeolit A u modelnoj otopini crijeva. Kako u zeolitnoj strukturi mogu biti prisutni kationi alkalijskih i zemnoalkalijskih metala ionskom izmjenom ili adsorpcijom na strukturu ovisno o tipu kationa moguće je da dolazi do vezanja i ionske izmjene toksičnih metala, dok se kalijevi, natrijevi, magnezijevi i kalcijevi ioni mogu otpustiti iz zeolitne strukture [103]. To je najvjerojatnije posljedica difuzije vode u strukturu zeolita i ravnoteže metal/otopina i metal/ionska rešetka metala. Također treba napomenuti da je moguće kako se odvija precipitacija hidroksida ovih metala pri višim pH vrijednostima, kao i formiranje kompleksa sa silikatnim specijama.

In vivo eksperiment na štakorima pokazao je kako ne dolazi do nakupljanja aluminija od strane klinoptilolitnih materijala u plazmi životinja hranjenih klinoptilolitnim materijalima. No kod životinja intoksiciranih aluminijevim kloridom nakupljao se aluminij u kostima i jetri te ovaj zeolit nije pogodan za oralnu primjenu *in vivo*. Suplementacijom klinoptilolitnim materijalima intoksiciranih životinja došlo je do detoksikacije aluminija u jetri i kostima. Isti efekt uočen je i sa suplementacijom koloidnom silikom te su vjerojatno u opservirani proces detoksikacije uključene silika specije koje se oslobađaju iz klinoptilolitnih materijala. Tako je i u literaturi već prethodno pretpostavljeno kako topljive forme silicija mogu detoksicirati organizam od aluminija formirajući hidroksialuminosilikate. U ovom smo radu u uvjetima analize in vivo kako je došlo i do smanjenja razine aluminija u zdravih životinja koje nisu intoksicirane aluminij kloridom, nakon tretmana s koloidnom silikom i klinoptilolitnim materijalima u plazmi i kostima životinja [103]. Molekularni mehanizmi opserviranih učinaka detoksikacije aluminija in vivo istraženi su uz pomoć transkriptomske analize. Transkriptomske analize mogu, naime, pokazati promjenu u aktivnosti onih gena koji potom pokreću biološke procese detoksikacije. Izolacija mRNA specifično iz jetre štakora zadovoljila je u ovom radu uvjete za daljnju analizu uz pomoć DNA mikročipa. U svrhu analize odabrane su negativna kontrola (zdrave netretirane životinje), pozitivna kontrola (životinje intoksicirane aluminijevim kloridom), životinje

intoksicirane aluminijevim kloridom bez ili sa suplementacije klinoptilolitnim materijalom s najvećom aktivnom površinom, PMAO2. Analizom dobivenih rezultata u programu Genespring odabrani su geni kandidati za koje smatramo kako imaju ulogu u procesima intoksikacije aluminijevim kloridom i detoksikacije u jetra primjenom PMAO2 zeolita. Poznato je naime kako aluminij uzrokuje oksidativni stres u jetra što može dovesti do upalne reakcije, promjena u ekspresiji gena uslijed promjene statusa DNA, pa čak i do tumorskih procesa.

Analiza rezultata pokazala je moguće gene kandidate molekularnih mehanizama intoksikacije s $AlCl_3$ odnosno detoksikacije s PMAO2 čija je ekspresija bila promijenjena u jetra životinja intoksiciranih s $AlCl_3$ te intoksiciranih životinja koje su primale zeolit PMAO2 (Slika 43).



Slika 43. Geni kandidati molekularnih procesa intoksikacije s $AlCl_3$, detoksikacije primjenom PMAO2 zeolita u istih životinja. Prikazani su i geni medijatori učinka PMAO2 na jetra u zdravih životinja.

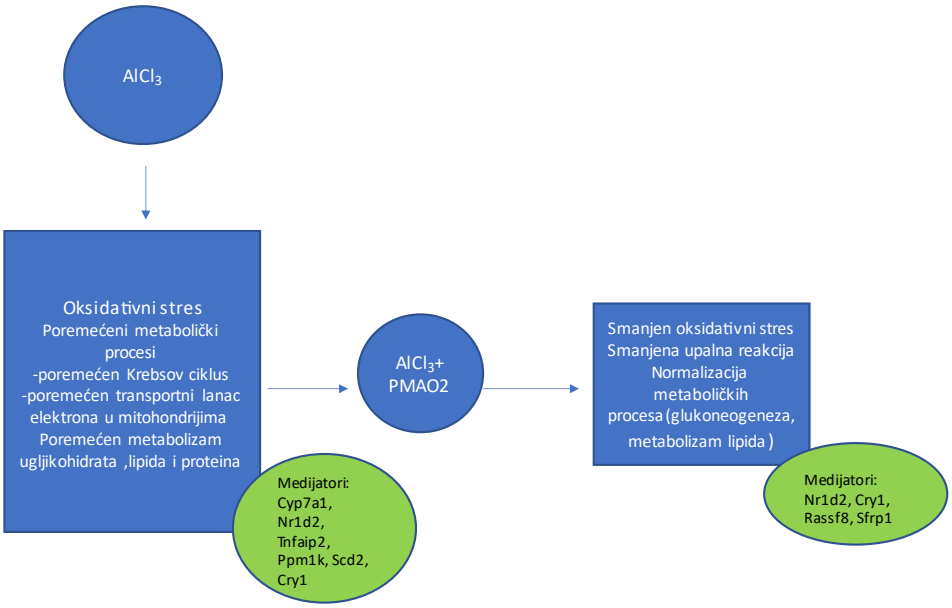
Iz literature je poznato da aluminij u humanim hepatocitima uzrokuje oksidativni stres. Budući da je poznato da je izostrukturan i izoelektronski jednak željezu, može

narušiti željezo-sumpor proteine prisutne u membrani mitohondrija. Hipoteza je stoga da se time otpušta željezo te dolazi do oksidativnog stresa u Fenthonovoj reakciji mitohondrija. Dakle, hipotetski dolazi do neravnoteže u oksidativnoj fosforilaciji i posljedično zaustavljanja α-ketoglutarata koji inhibira nastajanje ROS. Uklanjanje α-ketoglutarata u ciklusu limunske kiseline vodilo bi do nakupljanja sukcinata i stabilizacije HIF-1α te smanjene biosinteze L-karnitina. Time bi se spriječio ulazak masnih kiselina u mitohondrije što bi dovelo do nakupljanja masnih kiselina u citosolu hepatocita [104]. Budući su metabolizam lipida i glukoze povezani, ulazak ugljikohidrata u jetra doveo bi do nakupljanja glukoze te uspostave anaerobne oksidacije glukoze. Stabilizacija HIF-1α i anaerobna oksidacija, te nakupljanje glukoze u jetra uz nakupljanje lipida i reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS) posljedično bi u jetra uspostavilo upalno okruženje koje može promovirati i zloćudne promijene.

Ovaj je hipotetski scenarij u skladu s opserviranim povišenim razinama transkripata u jetra životinja intoksiciranih $AlCl_3$. Tako primjerice, povišeni Cyp7a1 sudjeluje u metabolizmu kolesterola i proizvodnji žučnih kiselina koji imaju ulogu u regulaciji lipida, kolesterola i ksenobiotika. Žučne kiseline održavajući homeostazu štite jetra od oštećenja i stvaranja „masne“ jetre. Povišena transkripcija Cyp7a1 može se opservirati i kod stanja visokih razina glukoze [105]. Nadalje, povišena ekspresija Tnfaip2 u vezi je s indukcijom imunosnih stanica preko TNF-α, a posljedica je to najvjerojatnije upalnih procesa jetre uslijed intoksikacije $AlCl_3$. Njegova ekspresija je povišena u tumorima i infekcijskim bolestima [106]. Povišena ekspresija Nr1d2 nadalje, regulirana je oksidativnim stresom i upalom. Nr1d2 regulira staničnu bioenergetiku preko mitohondrija i sudjeluje u obrani protiv povećanog oksidativnog stresa [107]. Razina transkripata Ppm1k i Scd2 snižena je u $AlCl_3$ intoksiciranih životinja, a njihova je uloga u biosintezi lipida: Ppm1k djeluje preko metabolizma glukoze i regulira razgranate aminokiselina, a Scd2 sudjeluje u proizvodnji mononezasićenih masnih kiselina koje su ciljana meta reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS) [108,109]. Smanjena ekspresija ovih gena moguće ukazuje na obranu stanice od još većeg oštećenja. Možda je najvažniji mehanizam intoksikacije, opservirana smanjena razina transkripcije Cry1, tj. poremećaj cirkadijarnog ciklusa i glukoneogenezom što se povezuje i s drugim patološkim stanjima, primjerice kardiovaskularnim bolestima i stvaranjem „masnih“ jetra. Indukcija pak Cry1 gena s PMAO2 u $AlCl_3$ intoksiciranih životinja pokreće obrambeni mehanizam stanice [110].

Primjena PMAO2 zeolita naime, povećala je naime jasno ekspresiju Cry1 i smanjila ekspresiju Nr1d2 što ukazuje na reverziju učinaka $AlCl_3$ u introksiciranih životinja. Nr1d1 je naime i transkript regulacije cirkadijarnog ritma, što ukazuje na regulaciju sustava homeostaze stanica jetra. Navedeni mehanizmi najvjerojatnije reguliraju glukoneogenezu i obnavljanje lipida u jetra. Povišene razine Sfrp1 ukazuju na regulaciju razina glukoze, što može biti u vezi sa regulacijom upalnih procesa (primjerice smanjenom infiltracijom makrofaga u jetra) [111] . Rassf1 transkript je također povišen u intoksiciranih životinja tretiranih s PMAO2, a s obzirom da se radi o aktivnosti gena koji je tumor supresor i regulator upalnih procesa preko NF-κB moguće je pretpostaviti ulogu u očuvanju integriteta jetre [112].

Zanimljivo je da u zdravih životinja, primjenom PMAO2 zeolita dolazi do aktivacije Glrx2, vjerojatno preko imunosnog sustava iz Peyerovih ploča probavnog sustava i indukcijom glutaredoksin transkripta koji ima antioksidativna svojstva, što se može povezati sa smanjenjem razine lipida u jetri [113]. U istih životinja, sniženi transkript Tamm41 koji sudjeluje u sintezi kardiolipina također ukazuje na smanjenje razine lipida u jetri, dok snižena razina Pnpla5 ukazuje na aktivaciju autofagosomalne biogeneze u razgradnji neutralnih lipida [114,115].



Slika 44. Predloženi mehanizam djelovanja $AlCl_3$ na jetru životinja, te protektivni mehanizmi djelovanja PMAO2 zeolita na jetru $AlCl_3$ intoksiciranih životinja. Prikazani su odabrani geni medijatori temeljem DNA mikročip analize.

Zaključno, primjena PMAO2 zeolita smanjila je oksidativni stresa i upalu čime se regulira poremećaj metabolita i proteina detoksikacijskim mehanizmom. Detoksikacija najvjerojatnije ide preko ortosilicijeve kiseline vezujući aluminij i vjerojatno uz pomoć aktivacije imunosnih stanica čije signaliziranje započinje u Peyerovim plohama, a djeluje na promjene u jetri. Nije moguće isključiti i ulogu kemotaksije preko imunosnih stanica u limfi. Kako klinoptilolit utječe na metabolizam lipida, proteina i glukoze normalizirajući metaboličke puteve u oštećenoj jetri mogli bi zaključiti da se ovaj preparat može koristiti u stanjima poput upala jetre, steatozi i tumorima jetre. Već je dokazano u literaturi da aluminij utječe na dislipidemiju [104], a klinoptilolit može poboljšati i lipidni status u ljudi s dislipidemijom [19], stoga je u ovom doktoratu objašnjen i molekularni transkriptomski mehanizam popravka lipidnog statusa. Budući da transkriptomika daje samo uvid u molekularne mehanizme, u sklopu ovog rada provedena je i osnovna proteomska analiza. Međutim, kako u predviđenim pokusima nisu nađene razlike između kontrolnih skupina i tretiranih grupa u preliminiranim metodom proteomike gel-elektroforeze u sprezi s masenom spektrometrijom promjena nije ostvarena. Daljnje globalne analize mogle bi dati detaljniji uvid u ospervirane biološke procese.

6. ZAKLJUČAK

- BET analizom određena je površina i veličina pora zeolitnih materijala te je utvrđeno kako su pore najveće kod zeolita A i najmanje kod PMAO2 zeolita, a omjer Si/Al istraženih klinoptilolitnih materijala TMAZ, PMA i PMAO2 razlikuje se s obzirom na metodu mikronizacije materijala te je najveći u korist silicija kod PMA zeolita, a najmanji kod zeolita A.

- Promjena pH suspenzije zeolita u vodi i modelnim otopinama želudca i crijeva korelira s omjerom Si/Al za zeolit A, TMAZ, PMA, PMAO2. Najveće povišenje pH događa se u modelnoj otopini želudca . Iznosi najviše za zeolit A, a najmanje za PMA zeolit s korelacijom od R^2=0,9799, dok je u modelnoj otopini crijeva najviši za zeolit A, a najmanji za PMA s koeficijentom korelacije R^2=0,9803. U vodi je korelacija nešto slabija, ali i dalje jaka (R^2= 0,929) te se u njoj zeoliti ponašaju kao i u otopini crijeva budući su pH vrijednosti približne.

- Površina zeolita A i klinoptilolitnih materijala nakon tretiranja u modelnim otopinama želuca i crijeva mijenja se na način da dolazi do oslobađanja ortosilicijeve kiseline i aluminijevih iona. Najviše se aluminijevih iona i ortosilicijeve kiseline oslobađa s površine zeolita A u obje modelne otopine, dok su rezultati za klinoptilolitne materijale približno jednaki u obje modelne otopine, s kojih se oslobađa ortosilicijeva kiselina i aluminijevi ioni. U modelnoj otopini želudca dolazi do oslobađanja redom za zeolit A, TMAZ, PMA, i PMAO2: 66,15,12,15 mmol/L aluminijevih iona, dok je maksimalno oslobođena ortosilicijeva kiselina redom za zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2: 71,16,14 i 16 mmol/L. U modelnoj otopini crijeva za zeolit A, TMAZ, MA, PMAO2 su vrijednosti za aluminijeve ione: 62,14,12 i 14 mmol/L, a ortosilicijevu kiselinu: 66,15,12,3 i 15 mmol/L. Treba naglasiti da je to pretpostavka za maksimalno otpuštene količine u modelnim otopinama.

- Metoda infracrvene spektroskopije tehnike KBr pastilom pokazala se pogodna za brzu kvalitativnu analizu omjera Si/Al površine klinoptilolitnih materijala.

- Veličina čestica testiranih zeolitnih materijala bila je mikrometarske skale ispod 1000 nm što ukazuje na mogućnost lokalnog ulaska u Peyerove plohe crijevnih stjenki i imunostimulaciju.

- Zeta potencijal zeolita A značajno se razlikuje od približno istih vrijednosti zeta potencijala klinoptilolitnih materijala te se kreće od 10,5 mV do -48 mV u pH rasponu 5,5-10,5 u vodi , u prisustvu iona olova (II) je približno isti kao i u vodi, dok je u prisustvu iona Ni(II) vrlo varijabilan; od 10 mV do -20 mV. Za TMAZ, PMA i PMAO2 pokazano kako se mijenja od pH 3-11 u vodi te iznosi oko -30 mV, dok u prisutvu iona olova (II) je približno isti kao i u vodi, a u prisustvu iona nikla (II) raste prosječno na oko –5 mV za TMAZ, te -20 mV za PMA i PMAO2.

- Određen je kapacitet ionske izmjene/adsorpcije teških metala (olovo, živa, nikal, kadmij i krom) u uvjetima *in vitro* pri čemu je pokazano kako najjači kapacitet za vezanje ione olova (II) imaju redom zeolit A, PMA i PMAO2, dok klinoptilolitni materijal TMAZ ima najjači kapacitet za adsorpciju iona žive (II).

- Detoksikacijski potencijal klinoptilolitnih materijala TMAZ, PMA i PMAO2 potvrđen je za aluminij u uvjetima *in vivo* u plazmi i organima štakora koji su primali testirane zeolite i aluminijev klorid u subkroničnom režimu tijekom 42 dana. Svi klinoptiolitni materijali smanjili su koncentracije aluminija u plazmi štakora osim Zeolita A koji nije pogodan za in vivo aplikaciju s obzirom da otpušta aluminij u plazmu.

- DNA mikročip analiza pokazala je aktivaciju gena Sfrp1,Cry1, Rassf8 i supresiju gena Nr1d2 u tkivu jetre koji su uključeni u mehanizme detoksikacije jetre od aluminija u životinja podvrgnutim subkroničnom režimu aluminijevog klorida tijekom 42 dana uz suplementaciju s PMAO2.

7. LITERATURA

[1] Moshoeshoe M. et al., A Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites, Am J Mater Sci, 2017, 7(5): 196-221.

[2] Stocker K. et al., Characterization and Utilization of Natural Zeolites in Technical Applications, BHM , 2017, 162:142–147.

[3] Auerbach et al., Handbook of Zeolite Science and Technology, CRC Press, 2003, 1-1204.

[4] Brassell J.P. et al., Upscaling of Zeolite Synthesis from Coal Fly Ash Waste: Current Status and Future Outlook, IntechOpen, 2016.

[5] Abdullahi T. et al., A review on sustainable synthesis of zeolite from kaolinite resources via hydrothermal process, Adv Powder Technol , 2017, 28(8): 1827-1840.

[6] Perego et. al., Zeolites and related mesoporous materials for multi-talented environmental solutions, Micropor Mesopor Mat , 2012, 166:37-49.

[7] Roque-Malherbe R., Adsorption of gases on Cuban natural zeolites, J Chem Soc, 1984, 102: 1361-1367.

[8] Čejka Jiří et al., Zeolites in Catalysis: Properties and Applications, 2017, Royal Society of Chemistry.

[9] Mansouri N. et al., Porosity, characterization and structural properties of natural zeolite - clinoptilolite - as a sorbent, Environ Prot Eng , 2013, 39 (1): 139-152.

[10] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Scientific Opinion on the safety and efficacy of clinoptilolite of sedimentary origin for all animal species. EFSA Journal 2013;11(1):3039.

[11] Armbruster T., Clinoptilolite-heulandite: applications and basic reasearch, Stud Surf Sci Catal, 2001, 135: 13-27.

[12] http://www.iza-online.org/natural/Datasheets/Clinoptilolite/clinoptilolite.htm

[13] Blanchard G. et al., , Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolites, Water Res, 1984, 18 (2) 1501-1507.

[14] Palubinskaite D. and Kantautas A., Influence of tribomechanical milling and activation of primary mixtures on the synthesis of calcium silicate hydrates, Mater Sci-Poland, 2006,24(2/1): 396-403.

[15] Cotton A., Dissolution kinetics of clinoptilolite and heulandite in alkaline conditions, Bio Sci Horiz 2008, 1(1): 38–43.

[16] Flowers J. et al., Clinical evidence supporting the use of an activated clinoptilolite suspension as an agent to increase urinary excretion of toxic heavy metals, Nutr Diet Suppl 2009, 1: 11-18.

[17] Pathak P.N. et Choppin G.R., Complexation studies of Co^{2+}ion with orthosilicic acid, J Radional Nucl Chem, 2005, 26: 175-182.

[18] Grce M. et Pavelić, K., Antiviral properties of clinoptilolite, Micropor Mesopor Mat, 2005, 79: 165-169.

[19] Cutovic et al., Clinoptilolite for Treatment of Dyslipidemia: Preliminary Efficacy Study, J Alter Complement Med, 2017, 23(9): 738-74.

[20] Ivković S. et al., Dietary supplementation with tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system, Adv Ther, 2004, 21(2):135-47.

[21] Pavelić K. et al., Natural zeolite clinoptilolite: New adjuvant in anticancer therapy, J Mol Med (Berl), 2001, 78(12): 708-20.

[22] Kraljević Pavelić S. et al., Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo, Front Pharmacol, 2018, 9 (1350): 1-15.

[23] Yanan Wu Y. et al, Effects of Clinoptilolite on Growth Performance and Antioxidant Status in Broilers, Biol Trace Elem Res, 2013, 155(2): 228–235.

[24] Manfred Lamprecht et al., Effects of zeolite supplementation on parameters of intestinal barrier integrity, inflammation, redoxbiology and performance in aerobically trained subjects, J Int Soc Sports Nutr, 2015: 1-11.

[25] Federico A. et al., A pilot study on the ability of clinoptilolite to absorb ethanol in vivo in healthy drinkers: effect of gender, J Physiol Farmacol, 2015, 66(3): 441-67.

[26] C. Díaz-Nava et al., Water defluoridation by Mexican heulandite-clinoptilolite, 2002, Sep Sci Technol 37(13):3109-3128.

[27] Montinero M. et al., Dietary zeolite supplementation reduces oxidative damage and plaque generation in the brain of an Alzheimer's disease mouse model, Life Sci, 2013, 92:17-19.

[28] Rodriguez-Fuentes G. et al., Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite, Zeolites, 1997, 19(5-6): 441-448.

[29] Sarybejoglu K. et al., Effects of clinoptilolite treatment on oxidative stress after partial hepatectomy in rats, Asian J Surg 2011, 34(4):153-7.

[30] Papaianou D.S. et al., A field study on the effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on health status and performance of sows/gilts and their litters, Res Vet Sci, 2002, 72(1): 51-9.

[31] Henstock J.R. et al.,Silicon: the evolution of its use in biomaterials, Acta Biomater, 2014, 11(1): 17-26.

[32] Birchall J.D. ,The essentiality of silicon in biology, Chem Soc Rev, 1995, 24: 351-357.

[33] Chen S. al., Fabrication of novel collagen-silica hybrid membranes with tailored biodegradation and strong cell contact guidance ability, J Mater Chem, 2012, 48: 21885-21892.

[34] Nielsen H.F. , Update on the possible nutritional importance of silicon, J Trace Ele M Bio, 2014, 28(4): 379-382.

[35] Reffit D.M. et al., Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentation in human osteoblast-like cells in vitro, Bone, 2003, 32(2): 127-135.

[36] Jugdaohsingh R. Et al., The silicon supplement `Monomethylsilanethriol` is safe and increases the body pool silicon in healthy Pre-menopausal women, Nutr Metab (Lond), 2013, 10(1): 37: 1-8.

[37] Reffit D.M., Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion, J Inorg Biochem, 1999, 76(2):141-7.

[38] Zhou J. et al., Orthosilicic acid, Si(OH)4, stimulates osteoblast differentiation in vitro by upregulating miR-146a to antagonize NF-κB activation, Acta Biomater, 2016, 15(39): 192-202.

[39] Munjas Jurkić L. et al., Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy, Nutr Metab, 2013, 10(2):1-12.

[40] Ravin Jugdaohsingh et al., The silicon supplement 'Monomethylsilanetriol' is safe and increases the body pool of silicon in healthy Pre-menopausal women, 2013, Nutr Metab (Lond) 10(37): 1-8.

[41] Mates J.M., Antioxidant enzymes and human diseases, Clin Biochem, 1999, 32(8): 595-603.

[42] Covarrubias L., et al., Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?, Dev Biol, 2008, 320(1):1-11.

[43] Adwas A. et al., Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body, JABB, 2019, 6(1): 43-47.

[44] Godoy P. et al., Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME, Arch Toxicol, 2013, 87(8): 1315-1530.

[45] Dufour J.F. et Clavien P-A., Signaling pathwys in Liver Diseases, Jean Francois Dufour, Pierre-Alain Clavien, 2010, Springer Nature Switzerland.

[46] Frevert U. et al., Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver, PloS Biol, 2005, 3(6): 1042.

[47] Latief U. et Riaz A., Herbal remedies for liver fibrosis: A review on the mode of action of fifty herbs, J Tradit Complement Med, 2018, 8(3):352-360.

[48] Giacometti J. et al., Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammmatory, anticancerogenic, antinecrotic activity in carbontethrachloride intoxicated mouse, J Funct Food, 2016, 23: 177-187.

[49] Li Sha et al., Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases, Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:1-21.

[50] Ahmad Khan K. et al., Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance, Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2017, 16(3): 245-256.

[51] Patil Y. et al., Biochemistry of metal absorption in Human Body:Reference to check Impact of Nano Particles on Human Being, Int J Sci Res, 2013, 3(4): 1-5.

[52] Bowen HJ. Trace Elements in Biochemistry. 2 nd ed. London: Academic Press; 1966. p. 55-7.

[53] Gunnar F. et al., Handbook on the toxicology of metals, 3rd edition, Elsevier: 2007.

[54] H.W.Roesky et Atwood D.A., Group 13 Chemistry II Biological Aspects of Aluminium, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002.

[55] R.J. Sorenson et al., Aluminum in the Enviroment and Human Health, Evorn Health Perspect, 1974, 8: 3-95.

[56] Exley C., Human exposure to aluminium, Environ. Sci.: Processes Impacts, 2013, 15 (10):1807-1816.

[57] Parkinson et al., Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: the aluminium intoxication syndrome during regular haemodialysis, J Clin Pathol 1981, 34(11) :1285-1294.

[58] Fernandez-Martin J.L. et al., Prevention of aluminium exposure through dialysis fluids. Analysis of changes in the last 8 years, Nefrol Dial Transplant, 1998, 13(3): 78-81.

[59] Driscoll C.T. and Schecher W.D., The chemistry of aluminium in the enviroment, Environ Geochem Health, 1990, 12(1-2):28-49.

[60] Bharathi , Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration, Indian J Med Res, 2008, 128(4):545-56.

[61] Mujika J.I. et al., Aluminium in Biological Enviroments: A computattional Approach, Compuct Struct Biotechnol J, 2014, 9(15): 1-13.

[62] Excley C., The pro-oxidant activity of aluminium, Free Radic Biol Med, 2004, 36(3): 380 – 387.

[63] Dubravka Čvorišćec et Ivana Čapelak, Štrausova Medicinska biokemija, Medicinska naklada, 2000.

[64] Exley C., Reflections upon and recent insight into the mechanism of formation of hydroxyaluminosilicates and the therapeutic potential of silicic acid, Coord Chem Rev , 2012, 256 (1-2), 82-88.

[65] Jones K. et al., Urinary Excretion of Aluminium and Silicon in Secondary Progressive Multiple Sclerosis, EbioMedicine, 2017, 26:60-67.

[66] Xu F. et al., Aluminum chloride caused liver dysfunction and mitochondrial energy metabolism disorder in rat, J Inorg Biochem, 2017, 174:55-62.

[67] Zhu Y. et al., Suppressive effect of accumulated aluminum trichloride on the hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in rats, Food ChemToxicol, 2013, 5:210-4.

[68] Lagalante A.F., Atomic Absorbtion Spectroscopy: A tutorial Review, Appl Spectrosc Rev, 2007, 34(3):173-189.

[69] Mihaylova V. et al., Optimization of sample preparation and ICP-MS analysis for determination of 60 elements for characterization of the plant ionome, 2012, 1441-1445.

[70] Cubbada F., Chapter 19- Inductively coupled plasma mass spectrometry, 2007, Elsevier, 697-751.

[71] Pröfrock D. et Prange A., Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends, Appl Spectrosc, 2012, 66(8): 843-68.

[72] Allabashi R. et al., ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving, J Nanopart Res, 2008, 11(8): 2003-2011.

[73] Singh A. et Kumar N., A Review of DNA Microarray Technology, Int J C Res Rev, 5(22):1-5.

[74] Miller M.B. and Tang Y-W., Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology, Clin Microbiol Rev, 2020, 22(4):611–633

[75] Bednář M., DNA microarray technology and application, Med Sci Monit, 2000; 6(4): 796-800

[76] Vidal E.E., Influence of nitrogen source on fermentation and higher alcohol production by an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae: The Isoleucine case., 2016, GRIN Verlag | Open Publishing Gmb.

[77] Rasooly A. et E. Herold K.E., Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies, Foodborne Pathog Dis, 2008 , 5(4): 531–550.

[78] Miller M. et Yi-Wei Tang Y-W., Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology, Clin Microbiol Rev, 2009, 2(4): 611–633.

[79] Bumgarner R., Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future, Curr Protoc Mol Biol, 2013, Unit 22.1, 1-17.

[80] S. Kraljević Pavelić ett N. Šaban, Uloga proteomike u otkrivanju novih protutumorskih lijekova, Medicina 2009, 45(3): 211-217.

[81] Mylvaganam S.E. et al., Structural Proteomics: Methods in Deriving Protein Structural Information and Issues in Data Management, Biotechniques, 2002: 42-6.

[82] Haider S. and Pal R., Integrated Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data, Curr Genomics, 2013, 14(2): 91-100.

[83] Chevalier F., Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics, Proteome Sci, 2010, 8(23):1-10.

[84] Baggerman G. et al., Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review,Comb Chem High Throughput Screen, 2005, 8(8): 669-677.

[85] Zhou B., Computational Analysis of LC-MS/MS Data for Metabolite Identification, Master Thesis.

[86] Ersoy B. et Elik M.S.C. Electrokinetic properties of clinoptilolite with mono- and multivalent electrolytes, Micropor Mesopor Mat, 2002, 55:305–312.

[87] O.I. Ikechukwu et al.Aluminium toxicosis:a review of toxic actions and effects, Interdiscp Toxicol 2019; 12(2) : 47-50.

[88] Porter J.B. and Huehns E.R., The toxic effects of desferrioxamine, Baillieres Clin Haematol, 1989, 2(2): 459-74.

[89] Tsuda T. et al., Effects of Mineral Fibers on the Expression of Genes Whose Product May Play a Role in Fiber Pathogenesis, Environ Health Persp 5 (Supll 5), 1997, 1173-1178.

[90] Andrew S.A. et al., Genomic and proteomic profiling of response to toxic metals in human lung cells, Environ Health Persp ,2003, 111(6): 825-838.

[91] P.P. Simeonova P.P. et al., Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells: role of reactive oxygen species, 1997, J Immunol, 159: 3921-3928.

[92] Pechar F. et D. Rykl D., Infrared spectra of natural zeolites of the stilbite group, 1980, Chem Zvesti, 35(2): 189-202.

[93] Mozgawa W. et al., FT-IR studies of zeolites from different structural groups, 2011, CHEMIK, 65(7): 667-674.

[94] Hartman R.L. et Fogler H.C., Understanding the dissolution of zeolites, Langmuir, 2007, 23(10): 5477-5484.

[95] H. Derakhshankhah et al. , Biomedical Applications of Zeolitic Nanoparticles with an Emphasis on Medical Intervations, 2020, Int J Nanomedicine,15:363-386.

[96] Taylor P.D. et al., Soluble silica with high affinity for aluminum under physiological and natural conditions. J Am Chem Soc 1997;119:8852–6.

[97] Farmer VC et Lumsdon DG. An assessment of complex formation between aluminium and silicic acid in acidic solutions. Geochim Cosmochim Acta 1994;58:3331–4.

[98] R. Judaosingh et al., Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans, Am J Clin Nutr, 2000, 17(4): 944-9.

[99] Bai S. et al., Complexation of Silicic Acid with Tiron in Aqueous Solution Under near Natural Condition, J Solution Chem, 2011, 40(2): 348-356.

[100] Begieneman M.P.V., Dopamine induces lipid accumulation, NADPH oxidase-related oxidative stress, and a proinflammatory status of the plasma membrane in H9c2 cells, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 11(5): 1097-1117.

[101] Radaković M. et al., Nitroso-Oxidative Stress, Acute Phase Response, and Cytogenetic Damage in Wistar Rats Treated with Adrenaline, Oxid Med Cell Longev, 2018, 1-11.

[102] W.J.Burke et al., Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases, Neurotoxicology, 2004, 25 (1-2): 101-15.

[103] Kraljević Pavelić S. et al., Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo, Microporous Mesoporous Mat, 2017, 249: 146-156.

[104] Mailloux R.J. et al., Hepatic response to aluminum toxicity: Dyslipidemia and liver diseases, Exsp Cell Res, 2011, 317(16): 2231-2238.

[105] Tiangang Li T. et al., Glucose stimulates cholesterol 7 -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes,J Lipid Res, 2010, 51: 832-842.

[106] FeingoldK.R. et al., Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia, J Clin Invest, 1989, 83(4): 1116–1121.

[107] Sengupta S. Et al., The circadian gene Rev-erbα improves cellular bioenergetics and provides preconditioning for protection against oxidative stress, Free Radic Biol Med, 2016, 93: 177–189.

[108] White J.H. et al., The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP Citrate Lyase, Cell Metab, 2018, 27:1281-1293.

[109] Miyazaki M. , Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development, Proc Natl Acad Sci US , 2005;102(35):12501-6.

[110] Miriam Toledo et al., Autophagy regulates the liver clock and glucose metabolism by degrading CRY1, Cell Metab, 2018, 28(2): 268–281.

[111] Davaadorj M. et al., Loss of Secreted Frizzled-Related Protein-1 expression is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma, EJSO, 2016:1-7.

[112] Volodko N. et al., RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation, 2017, 43(2): 340-340.

[113] Wohua Z. et Weiming H., Glutaredoxin 2 (GRX2) deficiency exacerbates high fat diet (HFD)-induced insulin resistance, inflammation and mitochondrial dysfunction in brain injury: A mechanism involving GSK-3β, 2019, 118: 2-9.

[114] Blunson N.J. et Cockroft C., CDP-Diacylglycerol Synthases (CDS): Gateway to Phosphatidylinositol and Cardiolipin Synthesis, Front Cell Dev Biol, 2020, 07, 1-21.

[115] Dupont N. et al., Neutral Lipid Stores and Lipase PNPLA5 Contribute to Autophagosome Biogenesis, Curr Biol, 2014, 24(6): 609-620.

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Darko Gumbarević

Datum rođenja: 10.11.1982.

Mjesto rođenja: Rijeka

Adresa: Remetnjak 14, 51219 Čavle

Mobitel: 099 409 2932

E-mail: dgumbarevic@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

Prirodoslovna i grafička škola Rijeka (2018.-2021.)

- nastavnik kemije

Prva riječka hrvatska gimnazija (2019.-2021.)

- nastavnik kemije

Odjel za biotehnologiju (2012.-2018.)

- znanstveni novak u suradničkom zvanju asistent

Dina Petrokemija d.d. , proizvodnja, terminali i servisi. (2008.-2012.)

- procesni inženjer na postrojenju Polietilen

OBRAZOVANJE I POSTIGNUĆA

Prirodoslovno matematički fakultet (2001.-2008.)

-diplomirani inženjer kemije

Medalja Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh u studiju kemije

Medicinska škola u Rijeci (1997.-2001.)

-farmaceutski tehničar

Najbolji maturant generacije, najbolji učenik škole, sudjelovanje na općinskim, županijskim i državnim natjecanjima iz kemije i farmaceutske grupe predmeta.

USAVRŠAVANJE

Masena spektrometrija

A) “Osnove masene spektrometrije”, Centar za viskopropusne tehnologije

B) “Mass spectrometry Seminar-Today and Tomorrow” AlphaChrom d.o.o.

Transkriptomska analiza

A) “Microarray Gex-training"- Agilent Technologies

B) “Genespring” bioinformatički program-Agilent Technologies

Atomic Layer Deposition

ALS: Osnove i primjena : Odjel za fiziku, Centar za mikro i nanoznanosti i tehnologije, Rijeka

Biological Cloks: Mechanism and Application, Sveučilište u Rijeci

PREZENTACIJE

Poster prezentacija na konferenciji “Cesar 2015 ”, Šibenik, 23.07.-26.07.

INFORMATIČKA PISMENOST

Word, Excel, Power Point, Outlook, Genespring bioinformatički program, Statistica program, MedCalc.

Publicirani radovi:

1. Kraljević Pavelić, Sandra; Micek, Vedran; Filošević, Ana; Gumbarević, Darko; Žurga, Paula; Bulog, Aleksandar; Orct, Tatjana; Yamamoto, Yasuaki; Preočanin, Tajana; Plavec, Janez et al., Novel, oxygenated clinoptilolite

material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo // *Microporous and mesoporous materials,* **249** (2017), 146-156.

2. Kraljević Pavelić, Sandra; Simović Medica, Jasmina; Gumbarević, Darko; Filošević, Ana; Pržulj, Nataša; Pavelić, Krešimir, Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo // *Frontiers in Pharmacology,* **9** (2018), 1350, 15 .

3. Gradišnik, Vera; Gumbarević, Darko, The Blue Light Defects Activation in A-Si:H Pin Photodiode as a Biosensor // *Key Engineering Materials,* **843** (2020), 64-69.

9. PRILOZI

a) Popis tablica:

Tablica 1. prikazuje metale podijeljene s obzirom na njihov efekt na ljudski organizam

Tablica 2. Prikazuje raspored životinja po skupinama.

Tablica 3. Priprema fragmentacijskog miksa.

Tablica 4. Izmjere površina krutina zeolita TMAZ, PMA i PMAO2 bez i uz tretman modelnim otopinama želuca i crijeva na tri karakteristične valne duljine tipične za klinoptilolitne materijale ~1063 cm-1, 608 cm-1 i 467 cm-1 u usporedbi s rezultatima omjera Si/Al na površini zeolitnih materijla dobivenih XPS analaizom.

Tablica 5. Analiza veličine čestica zeolita Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2 određena metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Rezultati su prikazani u nm ± standardna devijacija.

Tablica 6. Rezultati elementne analize XPS za površinu Zeolita A kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

Tablica 7. Rezultati elementne analize XPS za površinu TMAZ kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

Tablica 8. Rezultati elementne analize XPS za površinu PMA kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (ukupno 2 g materijala) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

Tablica 9. Rezultati elementne analize XPS za površinu PMAO2 kao krutine (panel A), u modelnoj otopini crijeva (panel B), i modelnoj otopini želuca (panel C). Temeljem podataka o masenom udjelu (w) i mase (2 g ukupno) izračunava se množina odnosno omjer broja silicija i aluminija (Si/Al) na površini zeolita.

Tablica 10. Omjer brojnosti silicija i aluminija na površini izmjerenih materijala, odnosno omjer Si/Al određen uz pomoć metode XPS možemo prikazati u tablici 8za krutine zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 bez i sa tretmanom u modelnim otopinama želuca i crijeva.

Tablica 11. Osnovne vrijednosti pH suspenzija zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u vodi i modelnim otopinama crijeva i želuca.

Tablica 12. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) ultra-čiste vode nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera Si/Al za svaki pojedini materijal.

Tablica 13. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) modelne otopine želuca nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera SiAl za svaki pojedini materijal.

Tablica 14. Ovisnost pH vrijednosti i razlika izmjerenih pH vrijednosti (Δ pH) modelne otopine crijeva nakon dodatka zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 uz prikaz omjera SiAl za svaki pojedini materijal.

Tablica 15. Predviđene mase otpuštenog aluminija (Al) i silicija (Si) sa površine testiranih zeolitnih materijala (izraženih u mg) u modelnim otopinama želuca i crijeva.

Tablica 16. Stehiometrijski izračunate mase $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ u modelnim otopinama crijeva i želuca uz dodatak zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2. Rezultati su prikazani u mg.

Tablica 17. Stehiometrijski izračunate koncentracije $Al(OH)_3$ i $Si(OH)_4$ u 200mL modelnih otopina zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2. Rezultati su prikazani u mmol/L.

Tablica 18. Brunauer–Emmett–Teller analiza zeolitnih materijala Zeolit A, TMAZ, PMA i PMAO2 izražena u m^2g^{-1}. Veličina pora izražena je u nm. Standardna devijacija metode <0.5%.

Tablica 19. GF-AAS elementna analiza koncentracija metala u modelnim otopinama želuca i crijeva uz dodatak 2g zeolita A, TMAZ, PMA ili PMAO2. Koncentracija metala određena je na početku pokusa neposredno po dodatku mutimetalnog standarda u suspenziju zeolita te nakon inkubacije. Statistički relevantni rezultati su

označeni zvjezdicom (*) ($p < 0.05$). Rezultati su prikazani kao postotak količine metala (%) ± relativna SD.

Tablica 20. Predloženi afinitet vezanja iona metala za pojedine zeolite temeljem podataka iz Tablice 19.

Tablica 21. Početne razine metala i minerala određene plazmi i organima životinja kao mjera fizioloških koncentracija metala i minerala na početku pokusa in vivo. Koncentracije izmjerenih elemenata u plazmi izražene su kao mg/l ili µg/l, a koncentracije izmjerenih elemenata u organima u mg/kg ili µg/kg.

Tablica 22. Smanjenje ili povišenje metala i nemetala u plazmi i organima primjenom Zeolita A, klinoptilolitnih materijala i koloidnog silicija. Strelicama gore i dolje označene su statistički značajne promjene u usporedbi s pozitivnom kontrolom ($p<0.05$). 0 – negativna kontrola; 1 – pozitivna kontrola ($AlCl_3$ intoksicirane životinje); 2 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + zeolit A; 3 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + TMAZ; 4 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + PMA; 5 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + PMAO2; 6 - $AlCl_3$ intoksicirane životinje + Ludox.

Tablica 23. Smanjenje ili povišenje metala i nemetala u plazmi i organima primjenom Zeolita A, klinoptilolitnih materijala i koloidnog silicija. Strelicama gore i dolje označene su statistički značajne promjene u usporedbi s negativnom kontrolom ($p<0.05$). 0 – negativna kontrola; 1 – pozitivna kontrola ($AlCl_3$ intoksicirane životinje); 2A - zdrave životinje + zeolit A; 3A - $AlCl_3$ zdrave životinje + TMAZ; 4A - zdrave životinje + PMA; 5A - zdrave životinje + PMAO2; 6A - zdrave životinje + Ludox.

Tablica 24. Popis diferencijalno eksprimiranih gena u štakorima intoksiciranim s $AlCl_3$ i hranjenih zeolitom PMAO2 (grupa 5) u odnosu na pozitivnu kontrolu (životinje intoksicirane $AlCl_3$, grupa 1)

Tablica 25. Popis diferencijalno eksprimiranih gena u zdravih, neintoksiciranih štakora hranjenih zeolitom PMAO2 (grupa 5A) u odnosu na negativnu kontrolu (zdrave netretirane životinje, grupa 0).

Tablica 26. Popis diferencijalno eksprimiranih gena $AlCl_3$ intoksiciranih štakora (grupa 1) u odnosu na negativnu kontrolu (zdrave netretirane životinje, grupa 0).

b) Popis slika:

Slika 1. Silikatni i aluminooksidni tetraedri kao jedinični građevni elementi kristala zeolita. Preuzeto iz [1]

Slika 2. Primjer sekundarnih građevnih blokova. Preuzeto iz [4].

Slika 3. Kompozitne građevne jedinice zeolita. Preuzeto iz [4].

Slika 4. Struktura zeolita A. Adaptirano prema [5]

Slika 5. Jedinična ćelija klinoptilolita. Preuzeto iz [12].

Slika 6. Struktura tribomehanički usitnjenog klinoptilolita . Slika je dobivena uz pomoć mikroskopa FE-SEM instrumenta (JSM-7800F, PRIME, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) u Centru za mikro i nano znanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci, zahvalnošću prof. Mladena Petravića

Slika 7. Adsorpcija na modificiranu površinu zeolita. Adaptirano prema [11].

Slika 8. Umrežavanje silikata i kolagena. Adaptirano prema [33].

Slika 9. Mehanizmi djelovanja polifenola protiv reaktivnih kisikovih vrsta. Preuzeto iz [43].

Slika 10. Citološka građa jetre. Adaptirano prema [46]. Slika opisuje stanice koje grade jetru te vene i arterije jetre.

Slika 11. Signalni put TNF-α u jetri i mehanizmi oštećenja jetre izazvani egzogenim uzročnicima. Preuzeto i adaptirano prema [50]. R-receptor, ConA-konkanavalin A, LPS-lipopolisaharid, MHV3-mišji hepatitis virus-3, CCl_4-tetrakloruglјik, RIPK (1,3)-receptor interagirajuća protein kinaza (1,3), FADD-Fas asocirana apoptotička domena, TRAD- TNF-receptorski apoptotički protein 1, TLR3/4- Toll -u sličan receptor, IKK-podjedinica inhibitora nuklearnog faktora kapa B-kinaze, TRAIL-TNF-receptorska superobitelj.

Slika 12. Topljivost aluminijevih specija(Alt predstavlja ukupni aluminij)u odnosu na pH u sustavu u ravnoteži s mikrokristaliničnim gibsitom (0.001 mM = 0.027 mg/L) [43].

Slika 13. Prikazuje prijenos aluminijevih spojeva preko membrane. 1) paracelularno (ioni aluminija), 2) transcelularno (niskomolekularni neutralni aluminijevi spojevi), 3) aktivni transport (visokomolekularni neutralni aluminijevi spojevi), 4) preko ionskih kanala (niskomolekularni nabijeni aluminijevi kompleksi) 5) adsorpcija ili receptorom posredovana endocitoza (nano i mikročestice aluminija). Preuzeto iz [46].

Slika 14. Prikazuje nukleaciju i rast hidroksialuminosilikata ovisno o pH vrijednosti. Preuzeto iz [50].

Slika 15. Promjene na jetri pri različitim dozama alumijevog klorida, CG-kontrolna grupa, LG-niska doza aluminija, MG-srednja doza aluminija, HG-visoka doza alumnija, a-infiltracija imunosnih stanica, b-nejasni rubovi stanica, c-fuzionirani hepatociti, d-poremećaj hepatičkog čvora, e-kariopiknoza, f-intrahepatička hemoragija. Preuzeto iz [59]

Slika 16. Shematski prikaz metode AAA-GF.

Slika 17. Određivanje zlatnih nanočestica ICP-MS-om, kao i dijelovi uređaja. Preuzeto i adaptirano prema [72].

Slika 18. Proces mikročip analize. Preuzeto i adaptirano prema [76].

Slika 19. MALDI/TOF spektrometar. Preuzeto i adaptirano prema Pharmaceutical Microbiology (pharmamicroresources.com)

Slika 20. Tandemska masena spektrometrija. Preuzeto i adaptirano prema [85].

Slika 21. Spektri dobiveni analizom testiranih zeolitnih materijala uz pomoć infracrvene spektroskopije (IR) tehnikom KBr pastile. Valne duljine ~1063 cm^{-1}, 608 cm^{-1} i 467 cm^{-1} su tipične za klinoptilolitne materijale. Prikazani su spektri čistih zeolitnih materijala PMA, PMAO2 i TMAZ odnosno istih zeolitnih materijala tretiranih modelnim otopinama želuca i crijeva. Panel A: Zeolit PMA (2xaktiviran) - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel B: Zeolit PMAO2 - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel C: Zeolit TMAZ - crno krutina, crveno modelna otopina crijeva i zeleno modelna otopina želudac. Panel D: Zeolit krutine PMA – crno, PMAO2 crveno i TMAZ zeleno.

Slika 22. Prikaz rezultata izračuna korelacije omjera Si/Al i površine IR spektra za odabrane valne brojeve tipične za klinoptilolitne materijale. Panel A: netretirani klinoptiloliti, površina na 608 cm^{-1}: Panel B: klinoptilolitni materijali tretirani u modelnoj otopini crijeva, površina na 1063 cm^{-1}. Panel C: klinoptilolitni materijali tretirani u modelnoj otopini želuca, površina na 469 cm^{-1}.

Slika 23. Analiza Zeolita A uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine Zeolita A. Panel B: Spektar dobiven snimanjem Zeolita A tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem Zeolita A tretiranog modelnom otopinom crijeva. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.

Slika 24. Analiza zeolita TMAZ uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine Zeolita A. Panel B: Spektar dobiven snimanjem Zeolita TMAZ tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem TMAZ tretiranog modelnom otopinom crijeva. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.

Slika 25. Analiza zeolita PMA uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine Zeolita A. Panel B: Spektar dobiven snimanjem PMA tretiranog modelnom otopinom želuca. Panel C: Spektar dobiven snimanjem PMA tretiranog modelnom otopinom crijevo. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.

Slika 26. Analiza zeolita PMAO2 uz pomoć metode infracrvene spektroskopije s atenuiranom totalnom refleksijom. Panel A: Spektar dobiven snimanjem krutine Zeolita A. Panel B: Spektar dobiven snimanjem PMAO2 tretiranog modelnom otopinom želudac. Panel C: Spektar dobiven snimanjem PMAO2 tretiranog modelnom otopinom crijevo. Nisu uočene razlike u spektrima pri različitim tretmanima.

Slika 27. Zeta potencijal (ζ) u mV zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u ovisnosti pH u vodi. Zeolit A pokazuje značajno različita fizikalno-kemijska svosjtva u odnosu na klinoptilolitne materijale.

Slika 28. Zeta potencijal (ζ) u mV zeolitnih materijala u ovisnosti pH uz dodatak iona Ni^{2+} i Pb^{2+}. Zeolit A - panel A; TMAZ – panel B, PMA – panel C, PMAO2 – panel D.

Slika 29. Promjena omjera Si/Al na površini analiziranih krutina zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 tretiranih u modelnim otopinama želuca i crijeva.

Slika 30. Prikazuje ovisnost promjene pH o Si/Al omjeru za testirane zeolite: Panel A: Ovisnost ΔpH i omjera Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini crijeva; Panel B: Ovisnost ΔpH i omjera Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini želuca.

Slika 31. Prikazuje ovisnost udjela promjene pH vrijednosti svakog zeolita o ovisnosti s omjerom Si/Al krutog zeolita za svaku modelnu otopinu i vodu. Panel A: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini želuca; Panel B: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u modelnoj otopini crijeva; Panel C: Ovisnost omjera ΔpH i inicijalnog pH o omjeru Si/Al za testirane zeolite u vodi.

Slika 32. Korelacija omjera Si/Al i udjela izmijenjenih iona Pb2+ u modelnoj otopini želuca.

Slika 33. Snimke zeolita A te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: Zeolit A iz dekantirani suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 0,9; za panel B 27,6; za panel C 28; Za panel D: 3.

Slika 34. Snimke zeolita TMAZ te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: Zeolit A iz dekantirani suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 7; Za panel B 100; Za panel C 63; za panel D samo Si signal.

Slika 35. Snimke zeolita PMA te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: Zeolit A iz dekantirani suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 4,7; Za panel B 93; Za panel C 114; za panel D samo Si signal.

Slika 36. Snimke zeolita PMAO2 te pripadajućih suspenzija dobivene uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) pri povećanju od 10000 x LED. Panel A: Zeolit A iz dekantirani suspenzije ultra-čiste vode; Panel B: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm; Panel C. Suspenzija nakon centrifugiranja pri 14000; Panel D: Suspenzija nakon centrifugiranja pri 140000 rpm. EDS analiza prosječnih omjera Si/Al opserviranih kristala: za panel A 5,8; Za panel B 75; Za panel C 103; za panel D samo Si signal.

Slika 37. Elektroferogram prvog seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa *in vivo*.

Slika 38. Elektroferogram drugog seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa *in vivo*.

Slika 39. Elektroferogram trećeg seta izoliranih molekula RNA. Analiza elektroferograma prikazana je tablično i donosi podatke za RIS broj s obzirom na redak elektroferograma i eksperimentalnu grupu iz pokusa *in vivo*.

Slika 40. Predloženi prikaz napada oksonijevih iona na zeolitnu strukturu . Slika prikazuje zeolitnu strukturu i oksonijeve ione. Plavom ravnom strjelicom označeni su napadi oksonijevih iona na aluminijeve ione, a kao posljedica su pomaci elektrona označeni plavom iskrivljenom strjelicom. Preuzeto i adaptirano prema [1].

Slika 41. Otapanje zeolita u vodi i posljedično otpuštanje hidroksidnih iona. Slika prikazuje zeolitnu strukturu, molekule vode i hidroksidne ione. Plave ravne strjelice označavaju napad na aluminijeve ione i oslobađanje hidroksidnih iona, a plava iskrivljena strjelica pomak elektrona. Preuzeto i adaptirano prema [1].

Slika 42. Strukture tirona, dopamina, noradrenalina, adrenalina i kompleksa ortosilicijeve kiseline i derivata katehola-tirona. Preuzeto od [99].

Slika 43. Geni kandidati molekularnih procesa intoksikacije s $AlCl_3$, detoksikacije primjenom PMAO2 zeolita u istih životinja. Prikazani su i geni medijatori učinka PMAO2 na jetra u zdravih životinja.

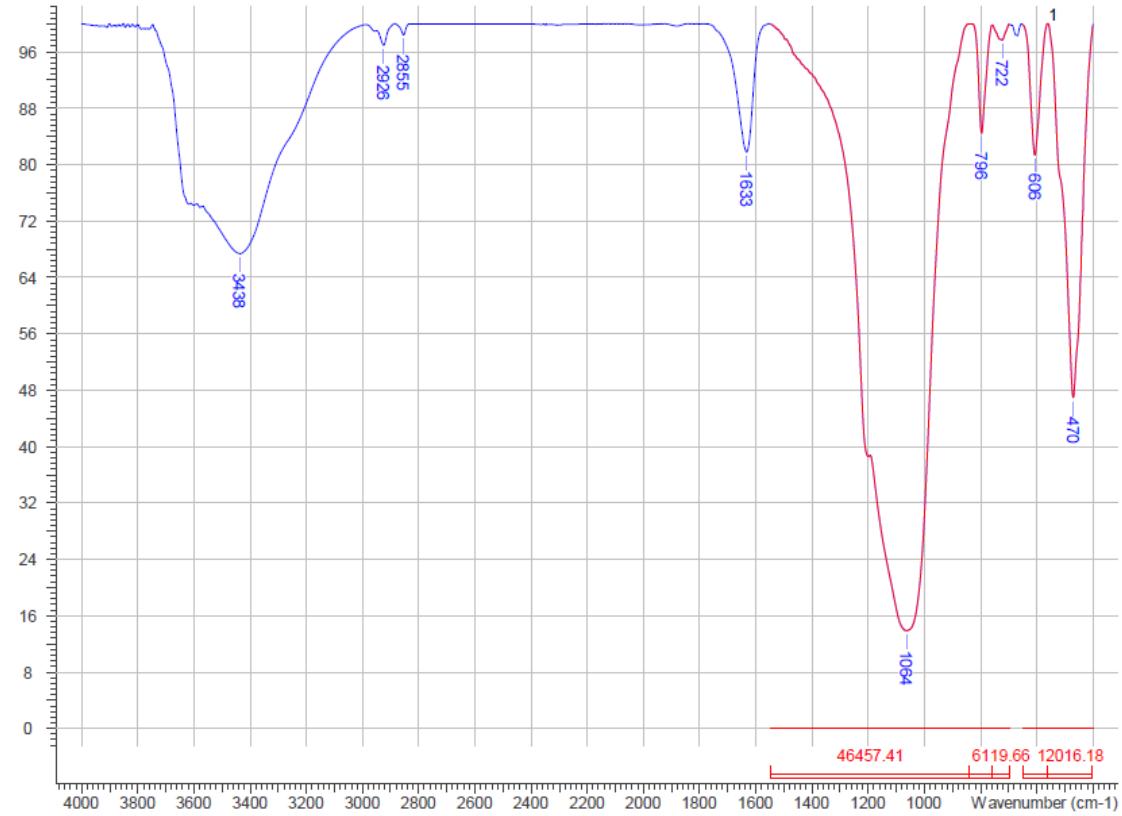
Slika 44. Predloženi mehanizam djelovanja $AlCl_3$ na jetra životinja, te protektivni mehanizmi djelovanja PMAO2 zeolita na jetra $AlCl_3$ intoksiciranih životinja. Prikazani su odabrani geni medijatori temeljem DNA mikročip analize.

Prilog 1 . Obrađeni IR spektri u programu ACD/Labs

TMAZ-KRUTINA

13 Jan 2021

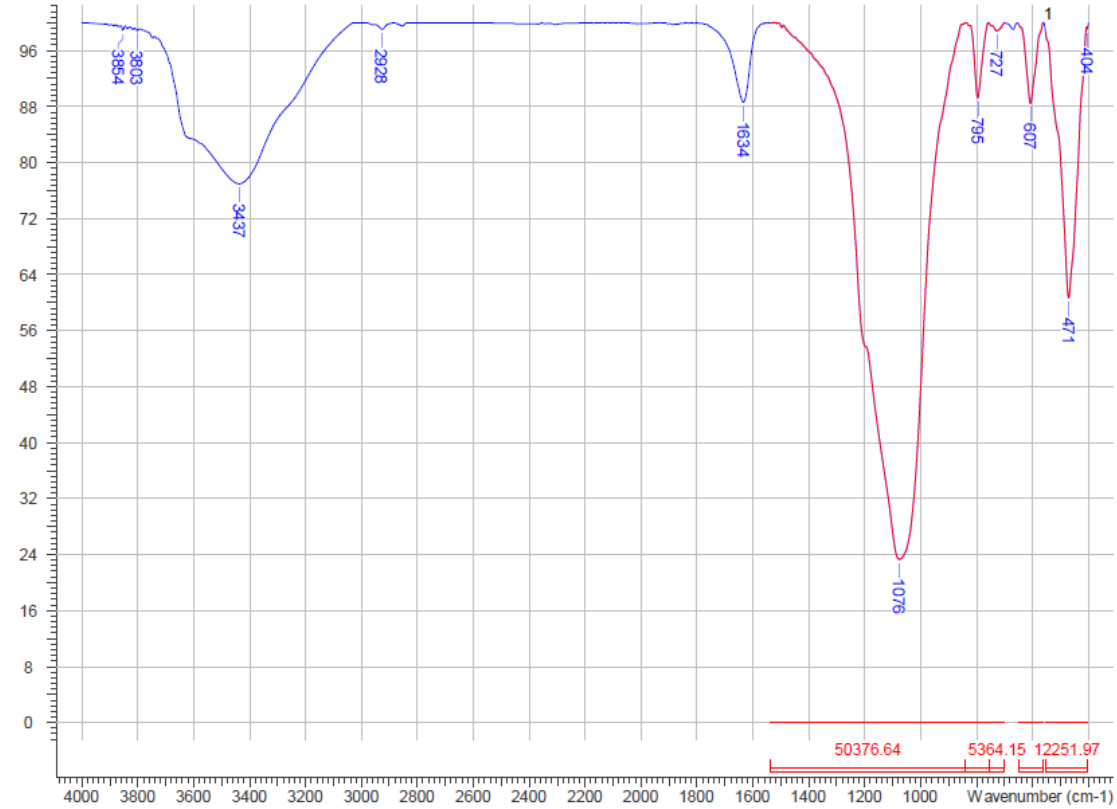
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\RW1.SP
Date Stamp	tue feb 10 18:27:04 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:27:04 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



TMAZ-KISELINA

13 Jan 2021

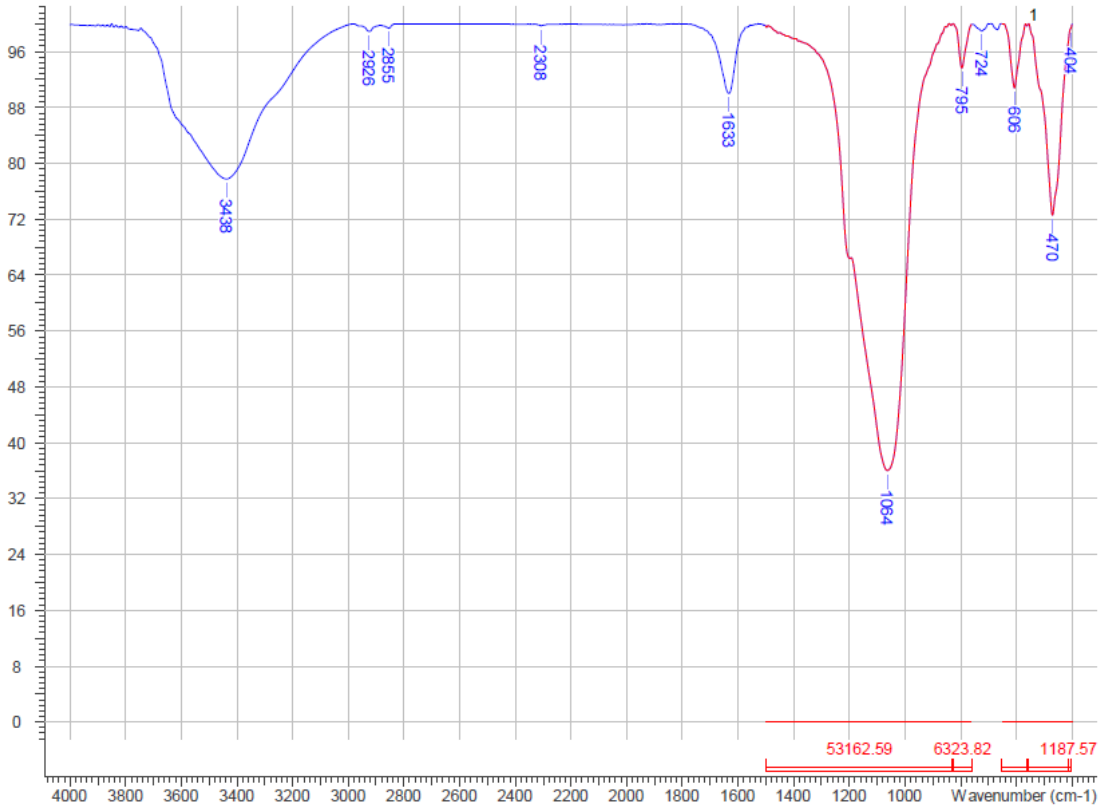
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\RW³.SP
Date Stamp	tue feb 10 18:52:29 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:52:29 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



TMAZ-CRIJEVO

13 Jan 2021

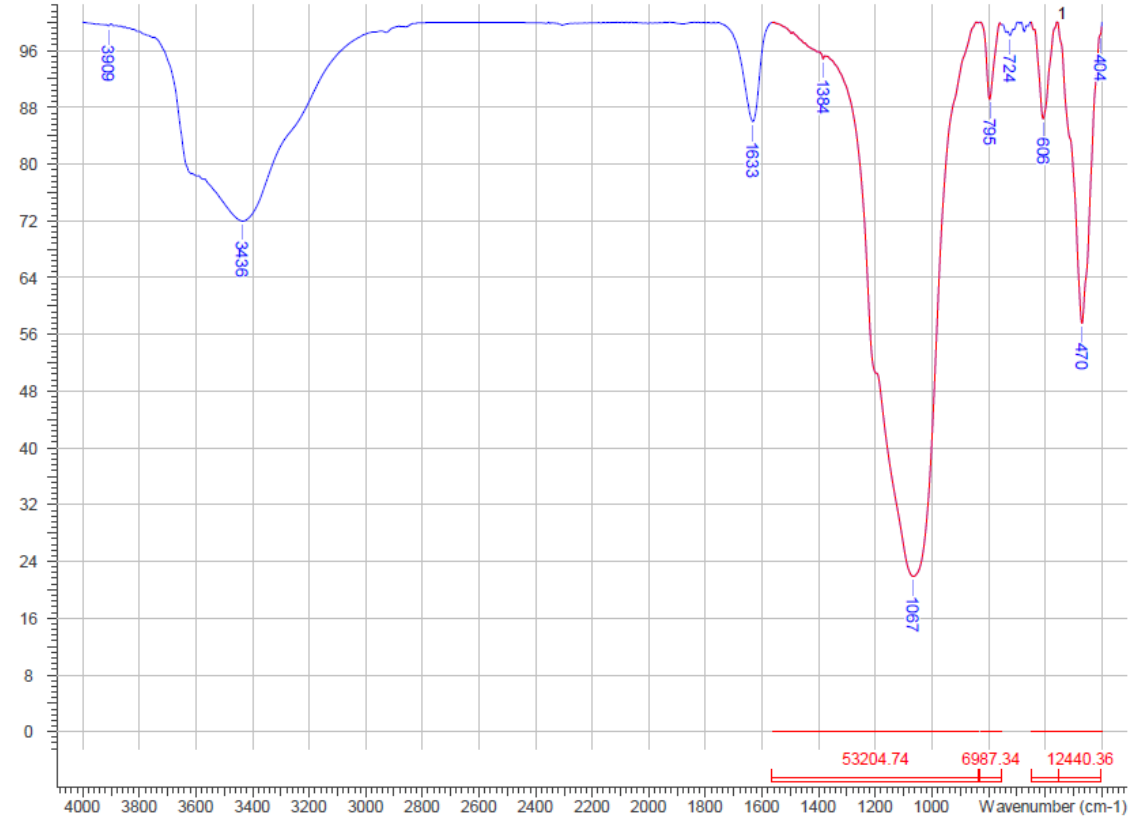
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\RWC.SP
Date Stamp	tue feb 10 19:03:23 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 19:03:23 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



PMA-KRUTINA

13 Jan 2021

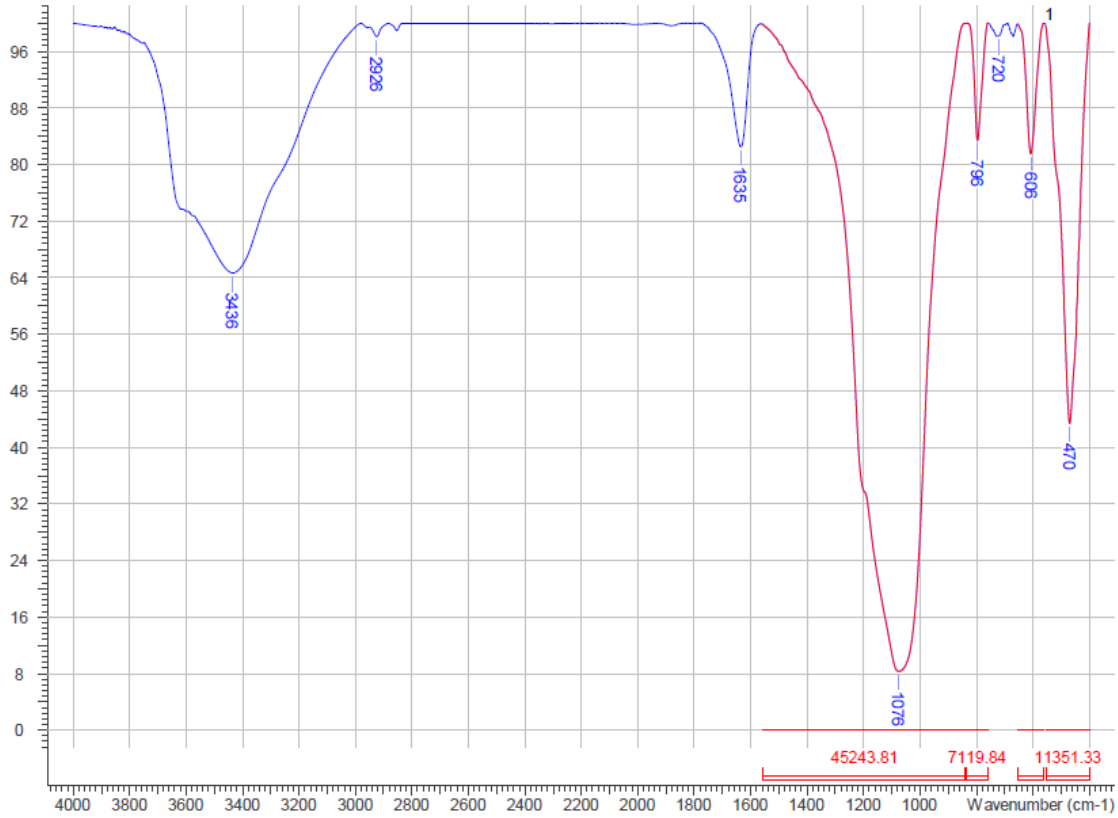
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\2X.SP
Date Stamp	tue feb 10 18:30:42 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:30:42 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



PMA-KISELINA

13 Jan 2021

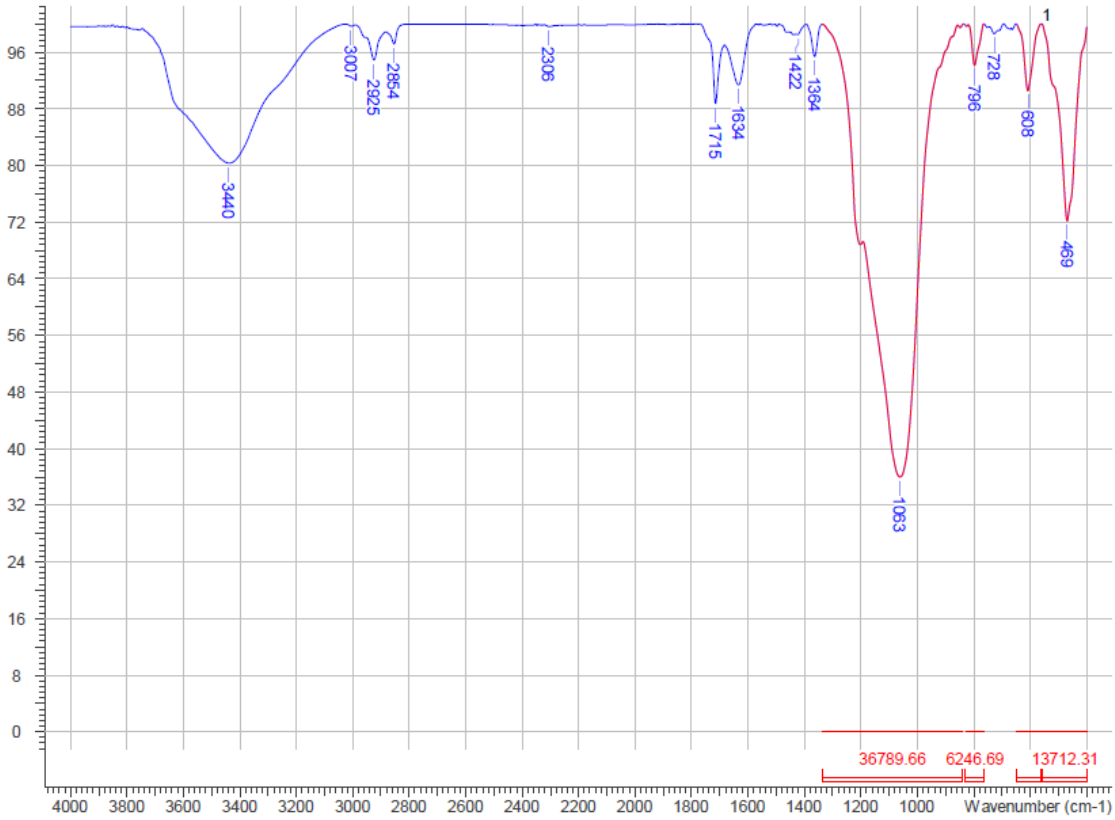
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\2X².SP
Date Stamp	tue feb 10 18:46:32 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:46:32 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



PMA-CRIJEVO

13 Jan 2021

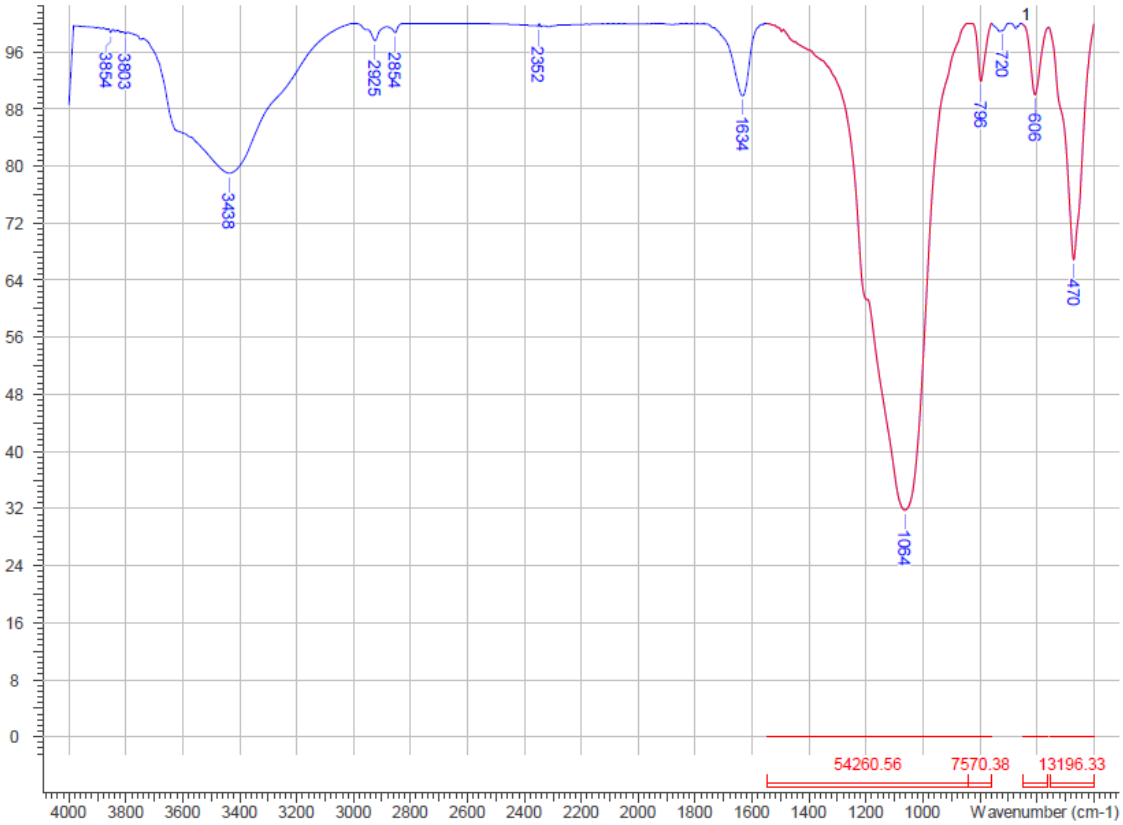
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\2XC.SP
Date Stamp	tue feb 10 19:08:17 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 19:08:17 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



PMAO2-KRUTINA

13 Jan 2021

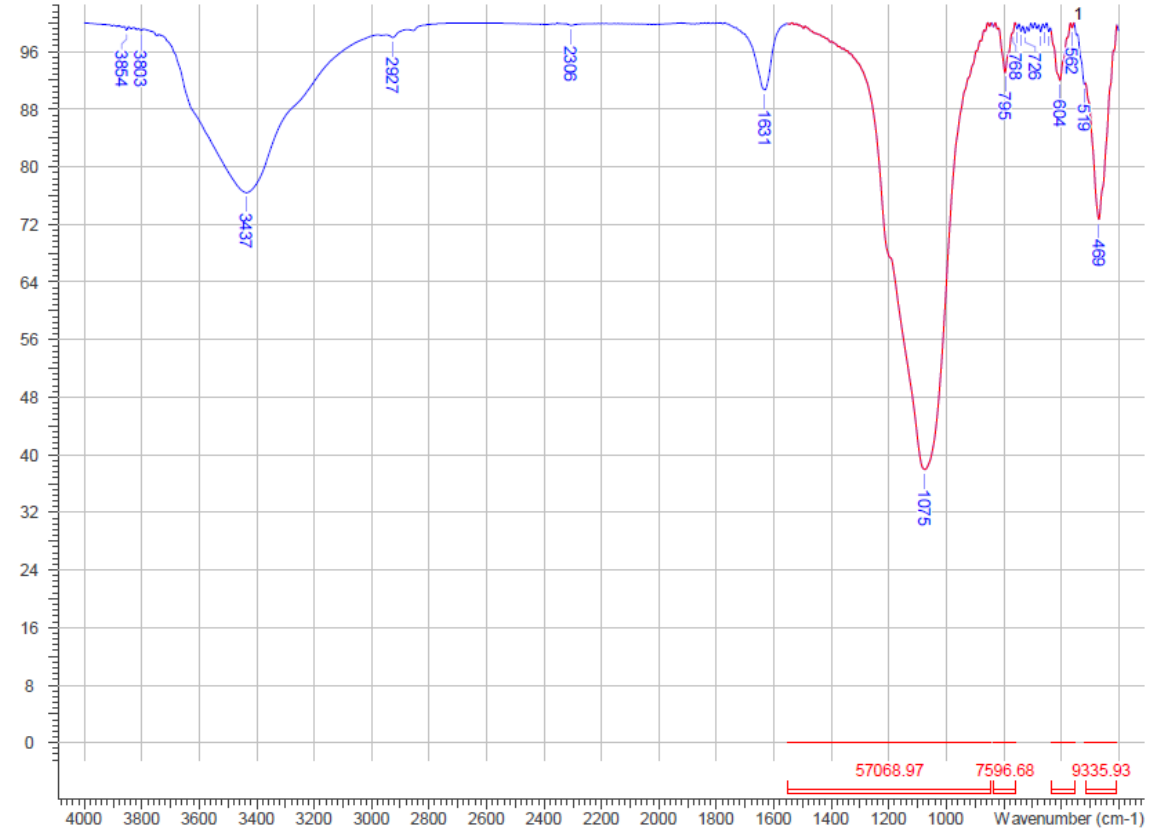
Comment	AF	***File Name***	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\NA.SP
Date Stamp	tue feb 10 18:34:21 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:34:21 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	***Spectral Region***	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	***Y Axis***	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	***Points Count***	3601
Data Spacing	1.0000		



PMAO2-KISELINA

13 Jan 2021

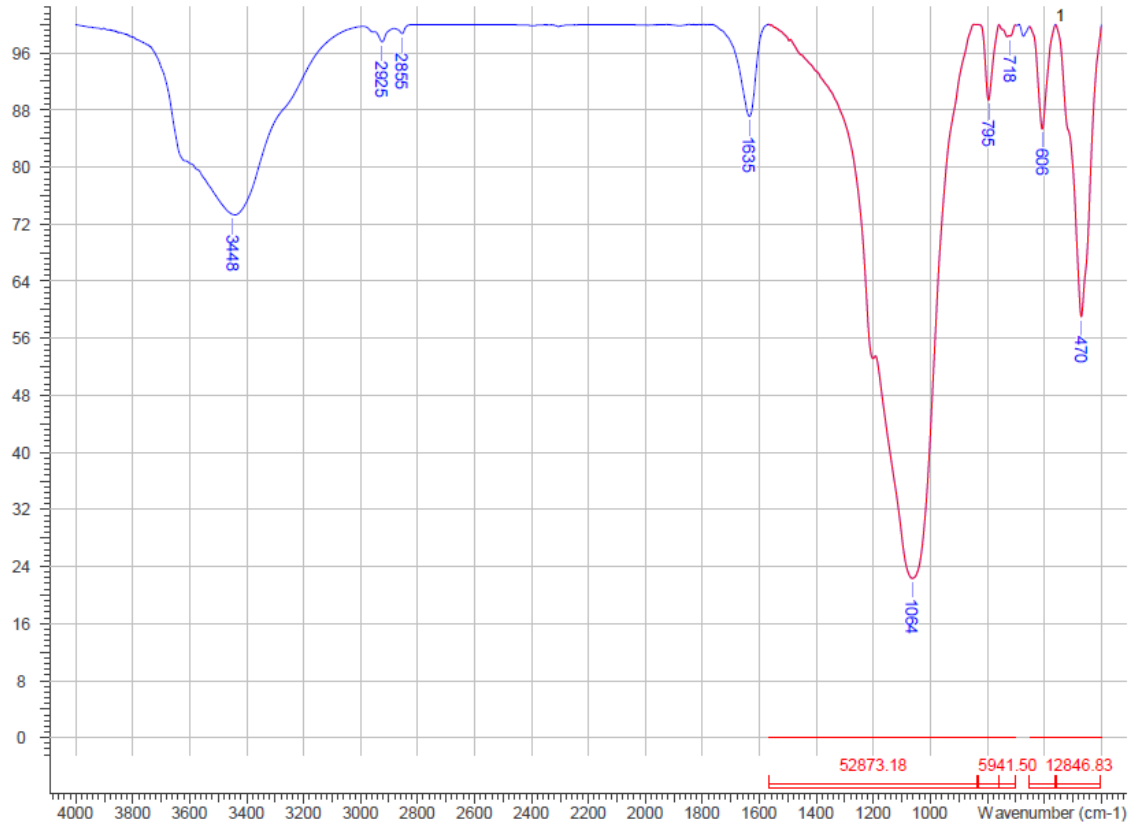
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\NAª.SP
Date Stamp	tue feb 10 19:17:30 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 19:17:30 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		



PMAO2-CRIJEVO

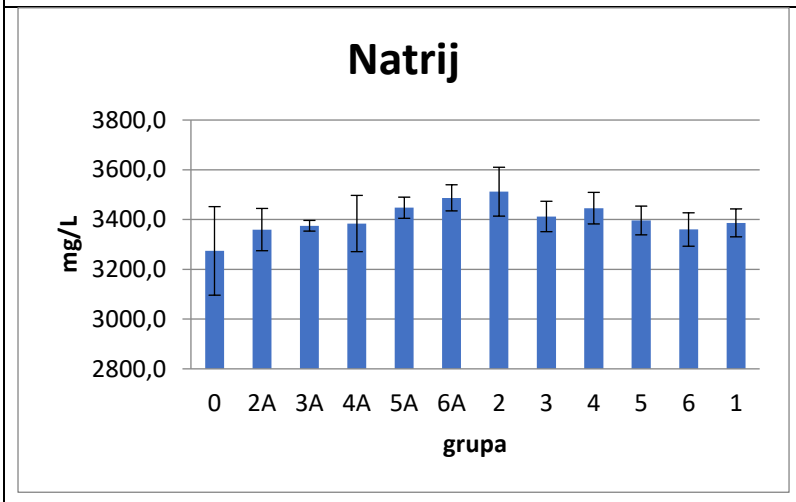
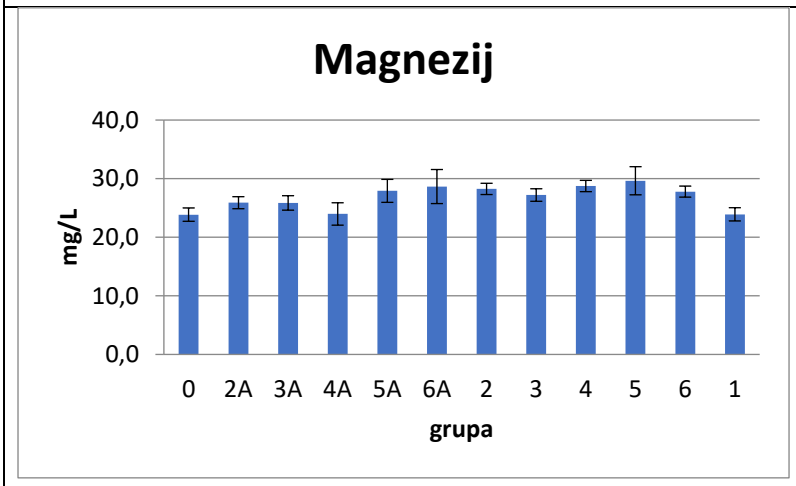
13 Jan 2021

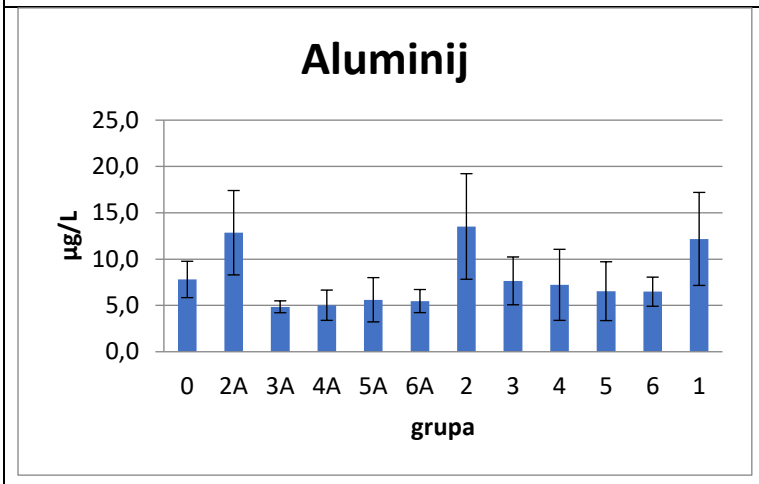
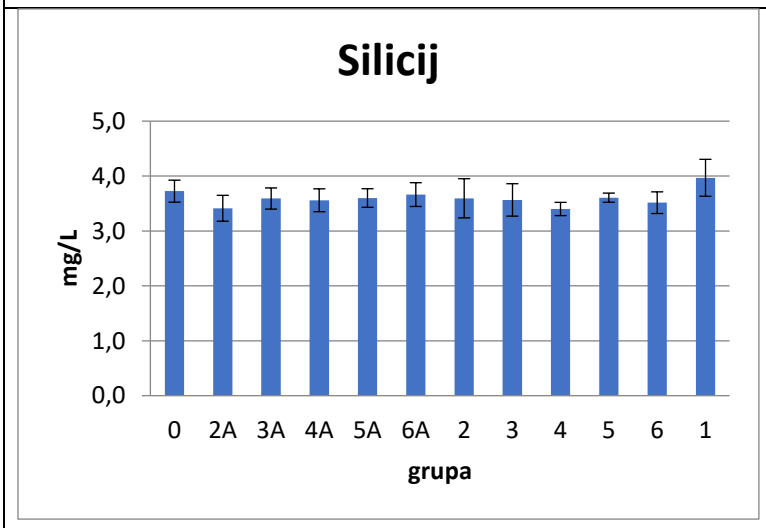
Comment	AF	*File Name*	C:\USERS\DGUMB\ONEDRIVE\DESKTOP\FTIR\NAC.SP
Date Stamp	tue feb 10 18:42:44 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Date	tue feb 10 18:42:44 2015 Central European Standard Time (GMT+1:00)		
Technique	Infrared	*Spectral Region*	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	*Y Axis*	%Transmittance
Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000	*Points Count*	3601
Data Spacing	1.0000		

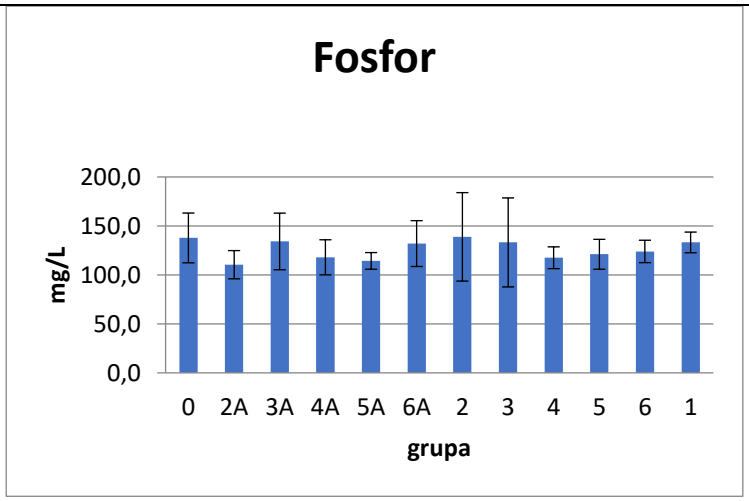
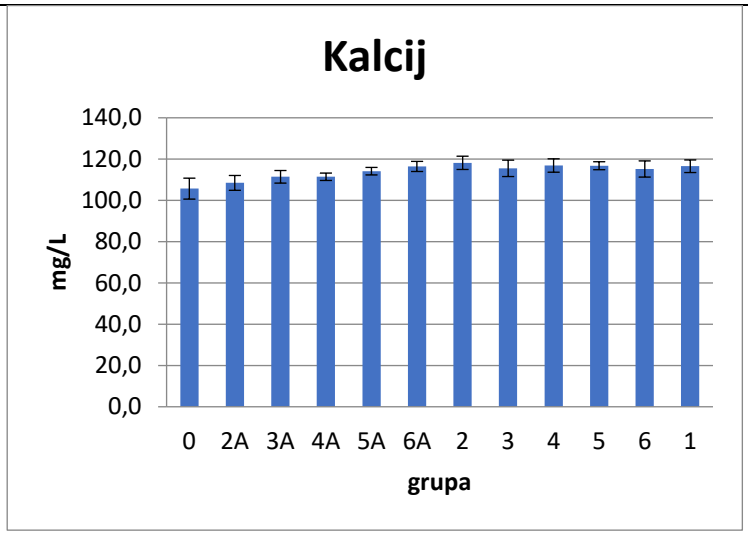


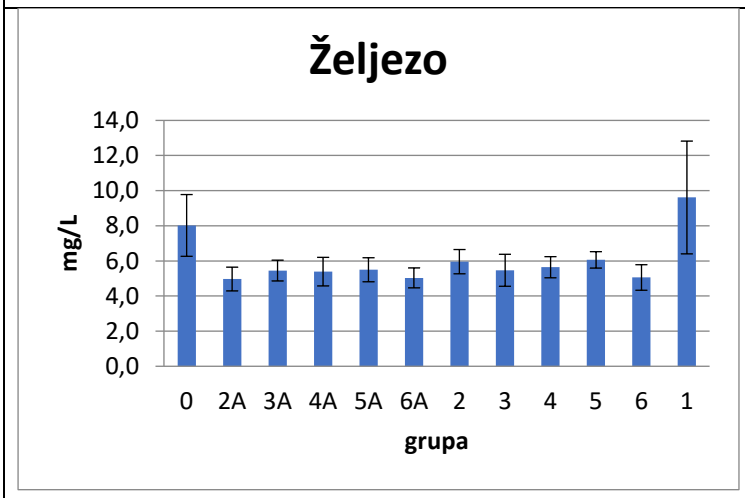
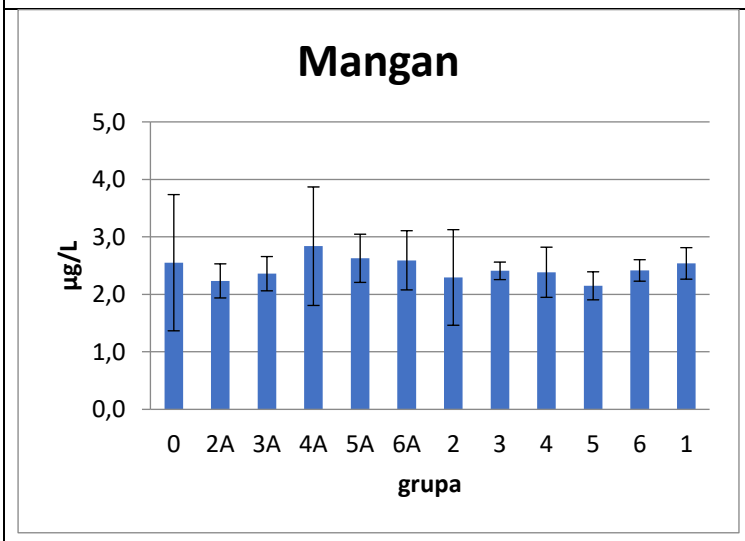
Prilog 2. Rezultati obrađeni u Statistica programu i MedCalc-u za plazmu i organe (koncentracije metala i minerala po grupama).

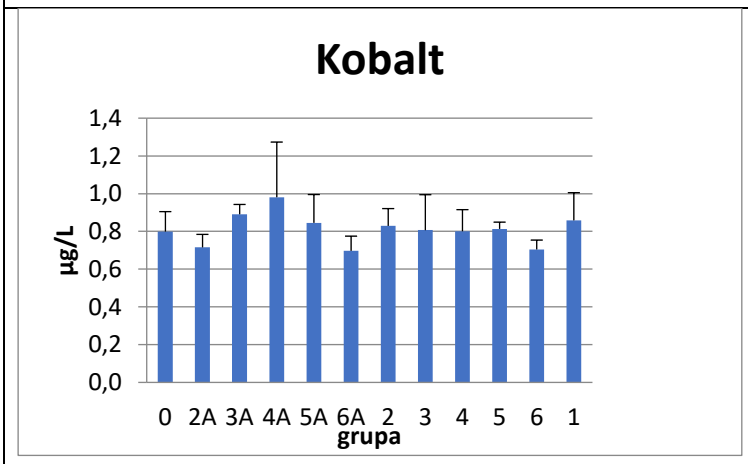
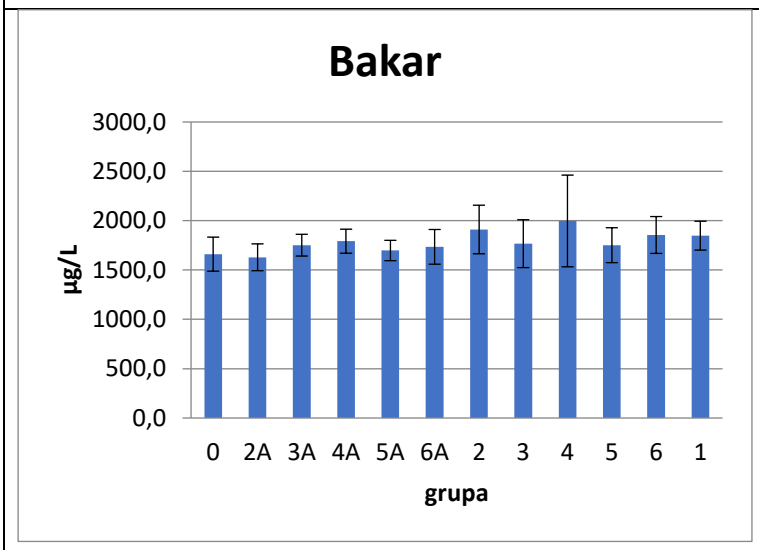
Plazma

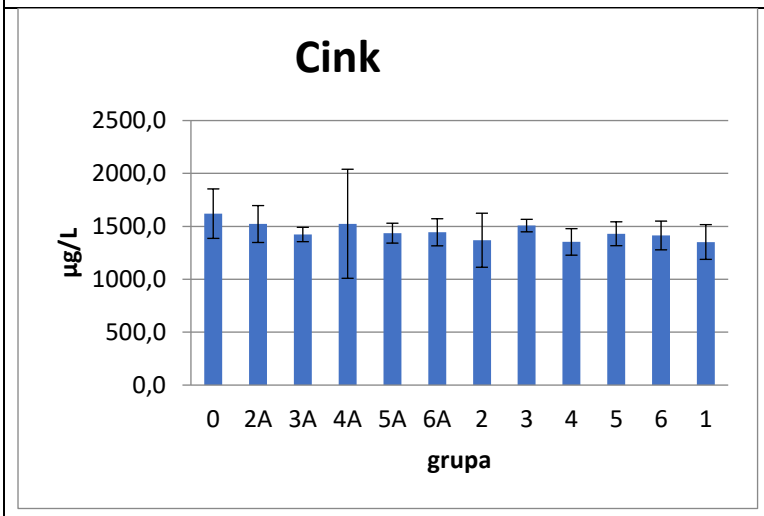
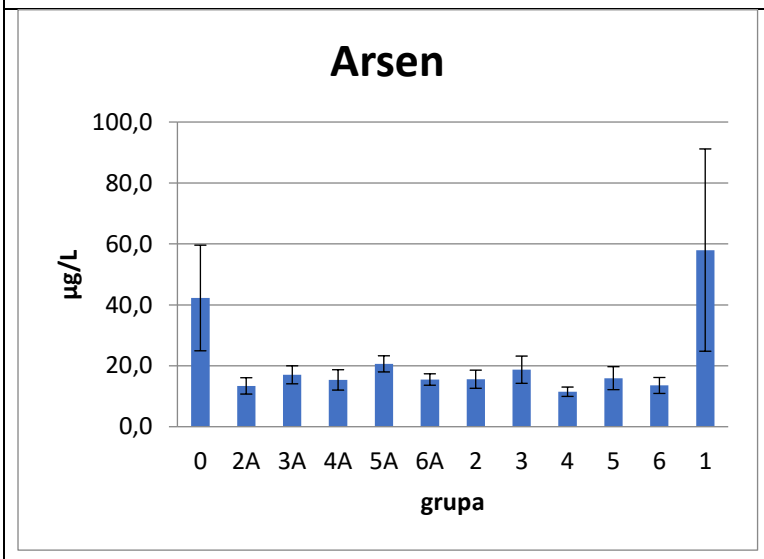
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0108 MT(p)=0,0234 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test= nema razlike Tukeys HSD post hoc=0-2,0-6A
	KW(p)=0 MT(p)=0 Post hoc analiza=0-2,0-4,0-5,4A-4,4A-5,1-2,1-5,1-4 Tukeys HSD post hoc=0-2,0-3,0-4,0-5,0-6,0-2A,0-3A,0-4A,0-5A,0-6A,2A-5,3A-5,4A-5A,4A-6A,4A-2,4A-3,4A-4,4A-5,4A-6,1-5A,1-6A,1-2,1-3,1-4,1-5

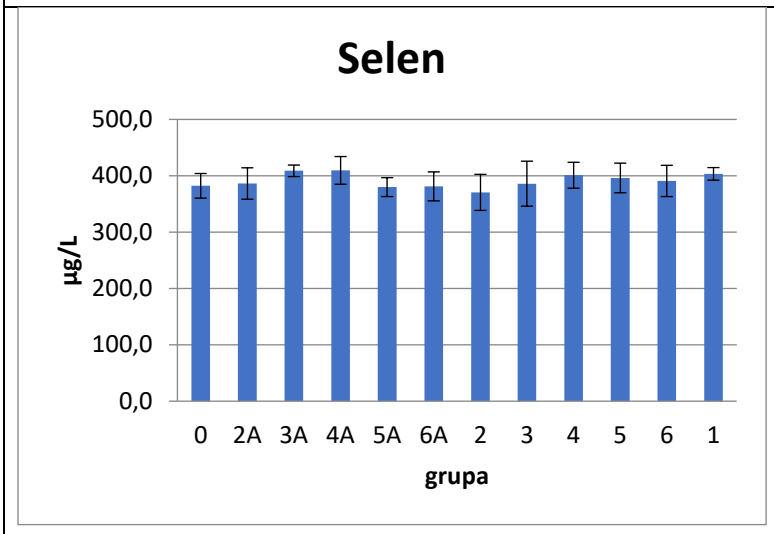
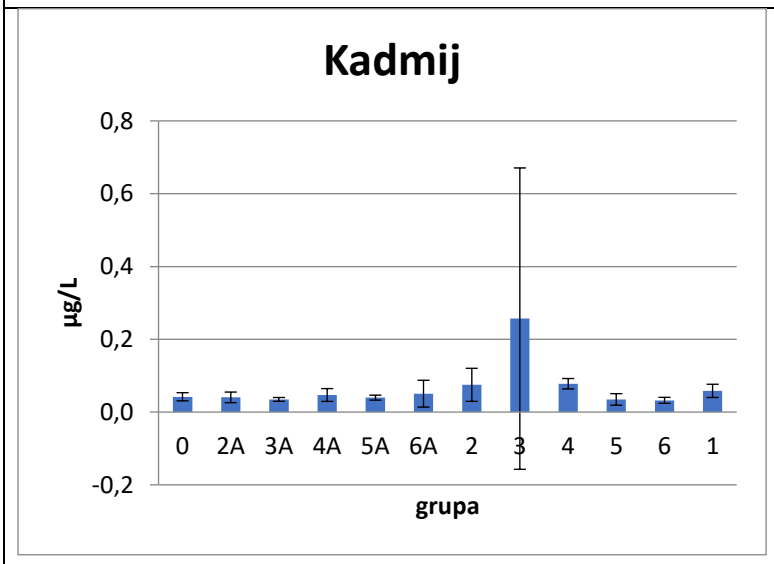
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0004 MT(p)=0,0002 Post hoc analiza=2-4A
	KW(p)=0,0467 MT(p)=0,1924 Post hoc analiza=1-4 Tukeys HSD post hoc=1-2A,1-4

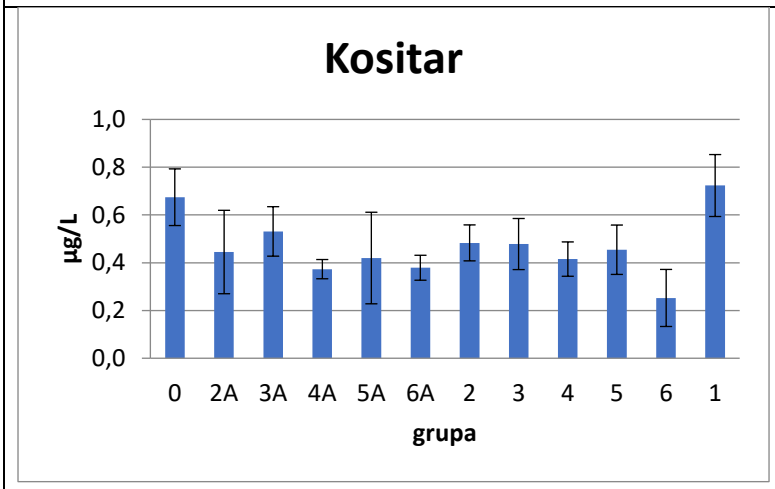
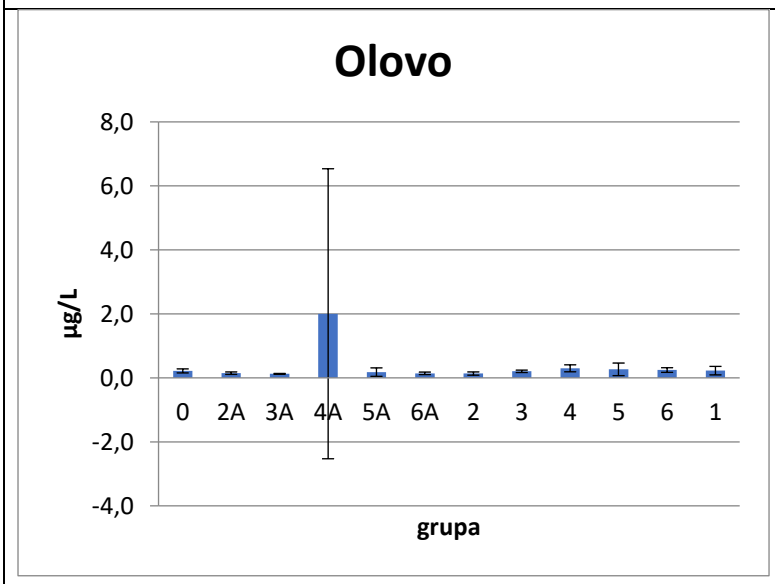
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,3047 MT(p)=0,2123
	KW(p)=0,0001 MT(p)=0,002 Post hoc analiza=0-2,0-4,0-5,0-6A,2-2A Tukeys HSD post hoc=0-1,0-2,0-3,0-4,0-5,0-6,2-4A,2A-1,2A-2,2A-3,2A-4,2A-5,2A-6A,2A-1

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0004 MT(p)=0,0057 Post hoc analiza=0-6A,1-2A,1-6A
	KW(p)=0,6037 MT(p)=0,7893

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0233 MT(p)=0,1006
	KW(p)=0,2091 MT(p)=0,245

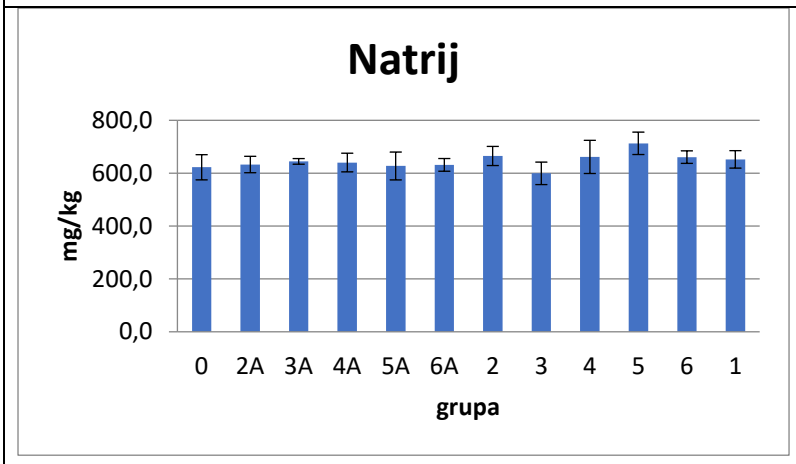
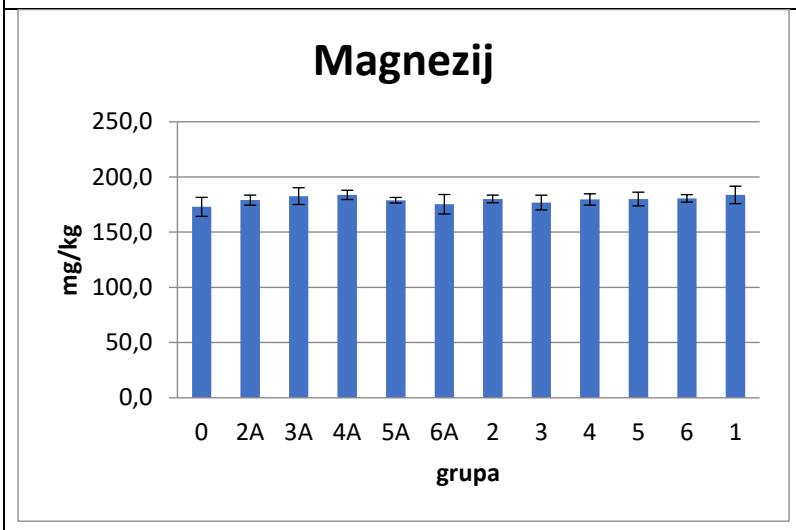
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,2732 MT(p)=0,2729
	KW(p)=0 MT(p)=0,0012 Post hoc analiza=0-2A,0-4,1-2A,1-4,1-2A

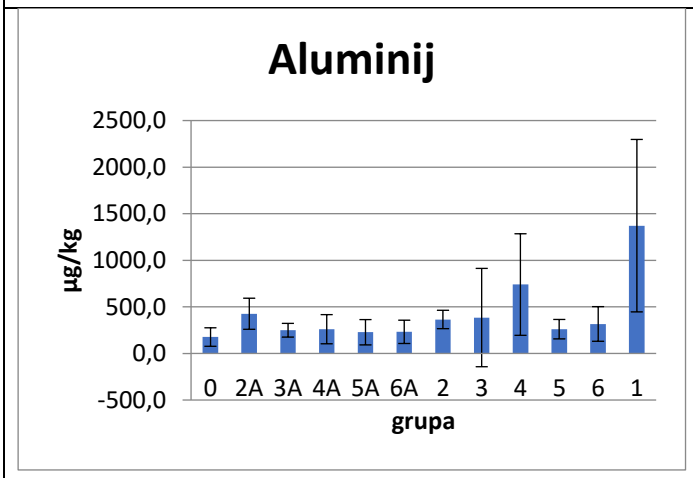
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1605 MT(p)=0,2089
	KW(p)=0,0073 MT(p)=0,017 Post hoc analiza= nema razlike MW-U test= nema razlike

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0001 MT(p)=0,0004 Post hoc analiza=0-6,1-4A,1-6A,1-6 Tukeys HSD post hoc=0-4,0-5A,0-6A,0-4,0-6,1-2A,3A-6,1-4A,1-2,1-3,1-4,1-5,1-6
	KW(p)=0,0147 MT(p)=0,0042 Post hoc analiza= nema razlike MW-U test=3A-4A

.

Jetra

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0441 MT(p)=0,1989 Post hoc analiza=3-5 Tukeys HSD post hoc test=0-5,3-5
	KW(p)=0,3382 MT(p)=0,2022

<table>
<tr><td>Ovisnost koncentracije o grupama</td><td>Statistički test</td></tr>
<tr><td> 
</td><td>KW(p)=0,0185

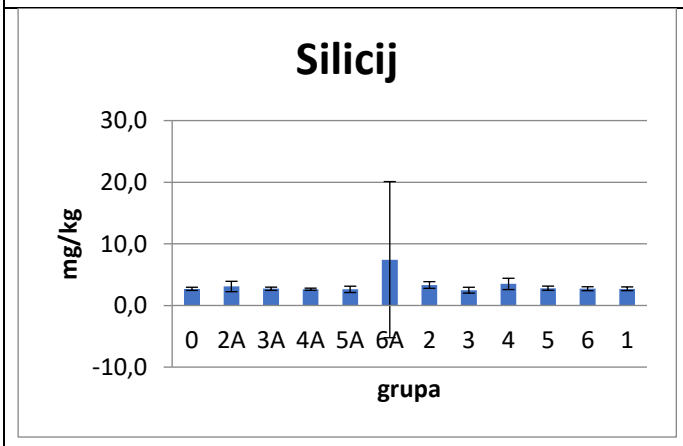
MT(p)=0,0758

Post hoc analiza=nema razlike

MW-U test=nema razlike

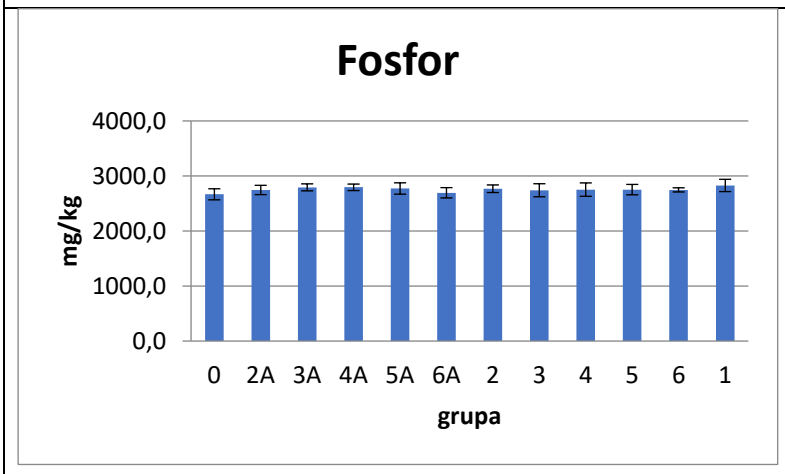
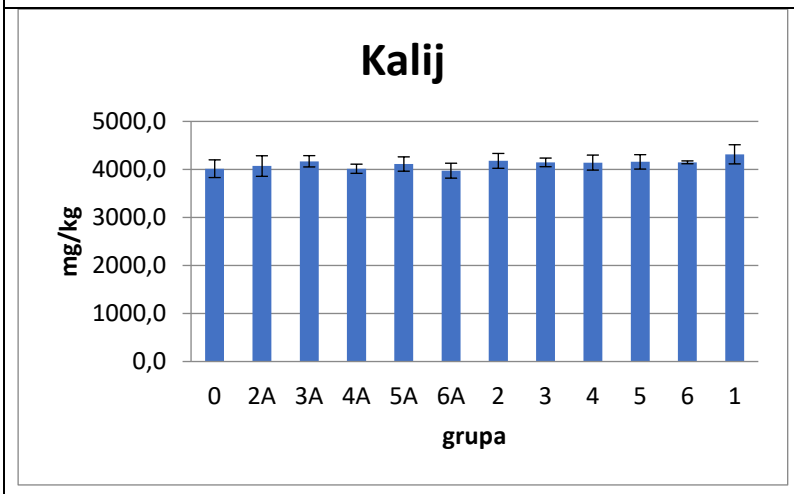
Test razlike proporcija: 0-1 grupa MedCalc, postoji statistički značajna razlika

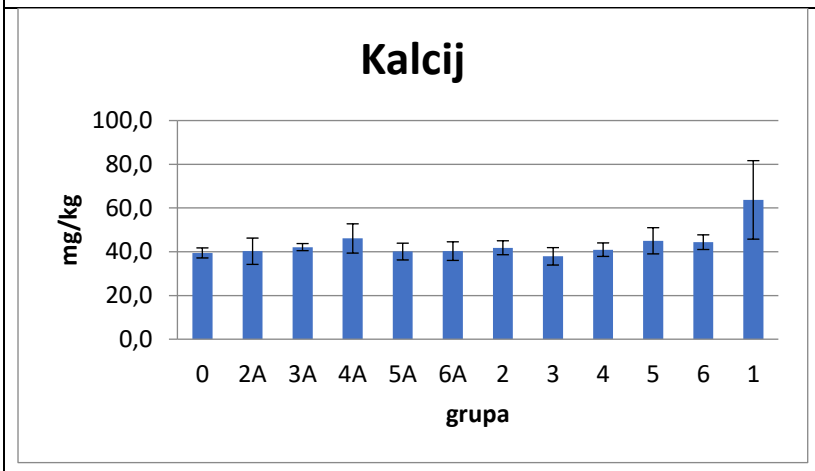
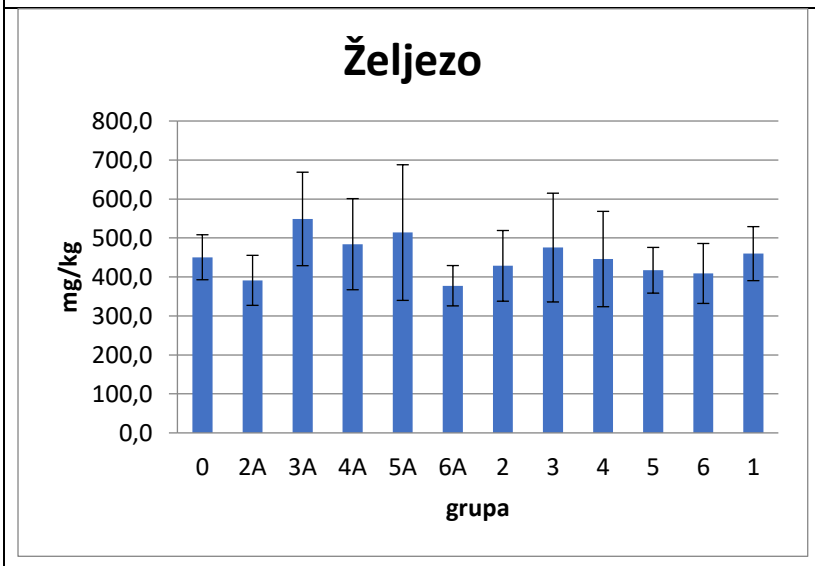
<table><tr><td>Difference</td><td>71.43 %</td></tr><tr><td>95% CI</td><td>15.0463% to 88.3832%</td></tr><tr><td>Chi-squared</td><td>5.612</td></tr><tr><td>DF</td><td>1</td></tr><tr><td>Significance level</td><td>P = 0.0178</td></tr></table>
Test razlike proporcija: 1-5 grupa MedCalc, postoji statistički značajna razlika

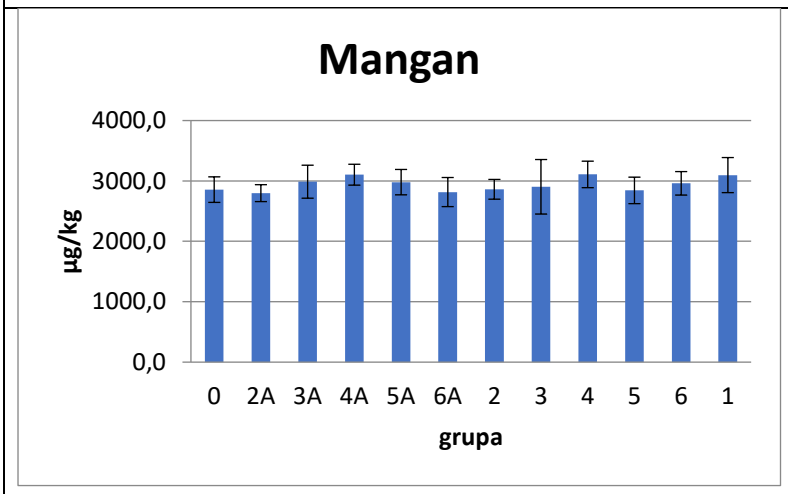
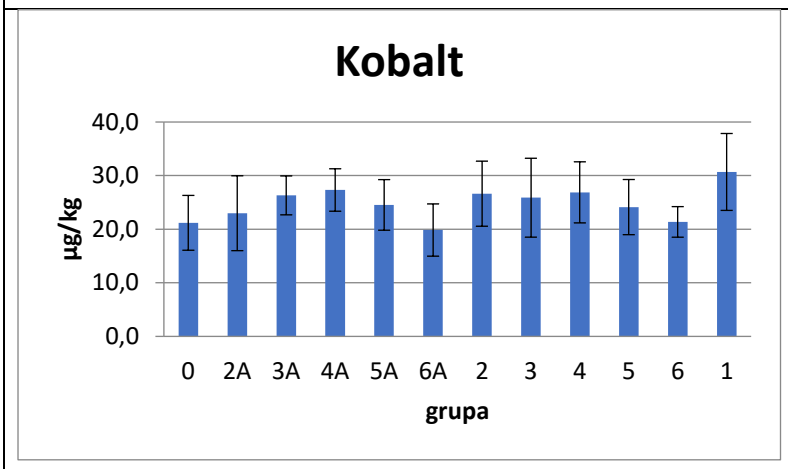
Test razlike proporcija:0-5A grupa MedCalc,ne postoji statistički značajna razlika</td></tr>
<tr><td> 
</td><td>KW(p)=0,1225

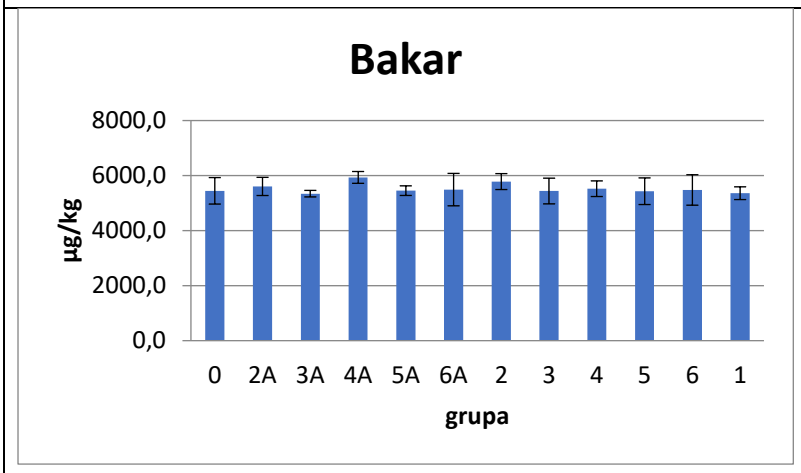
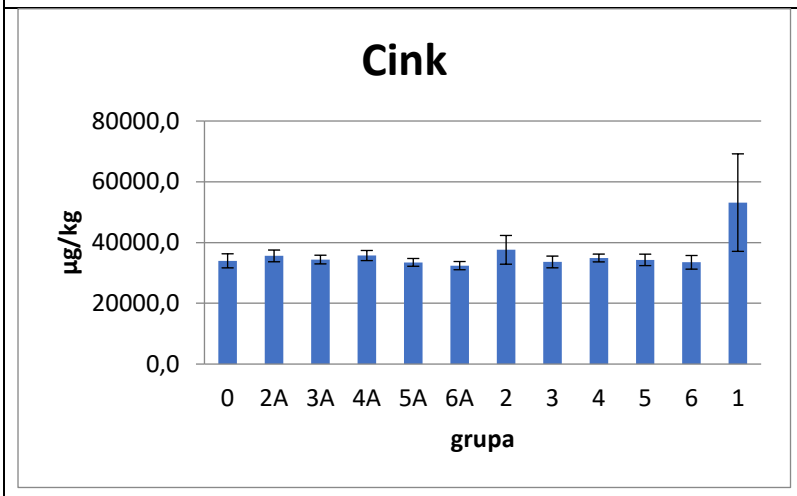
MT(p)=0,3799

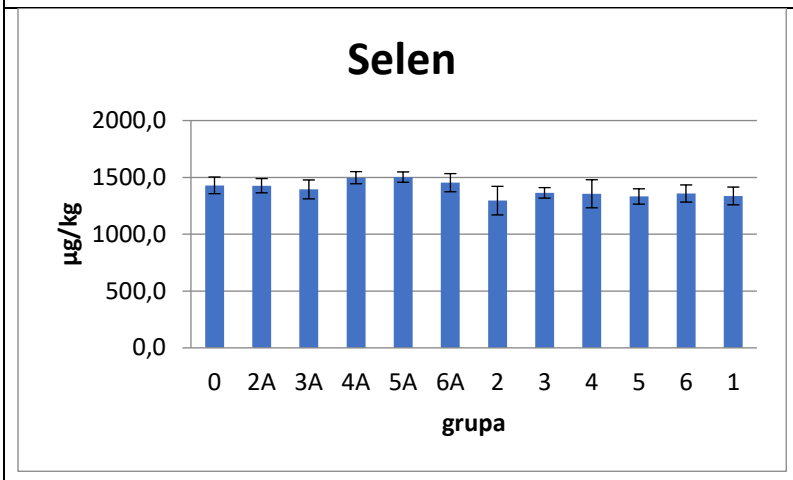
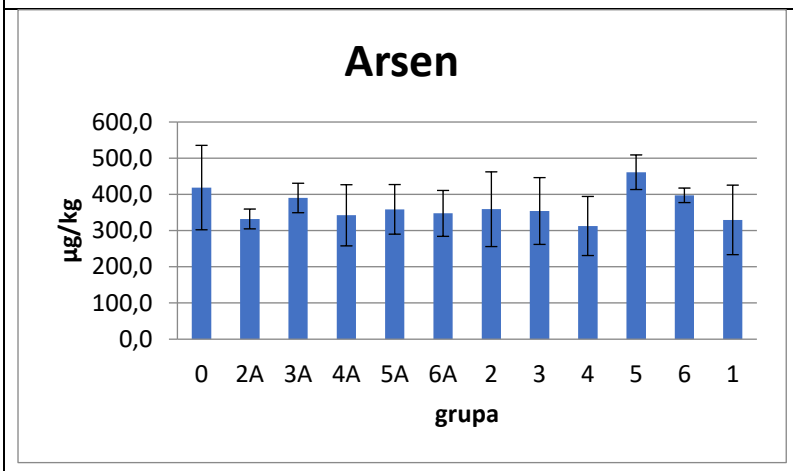
MW-U test=nema razlike</td></tr>
</table>

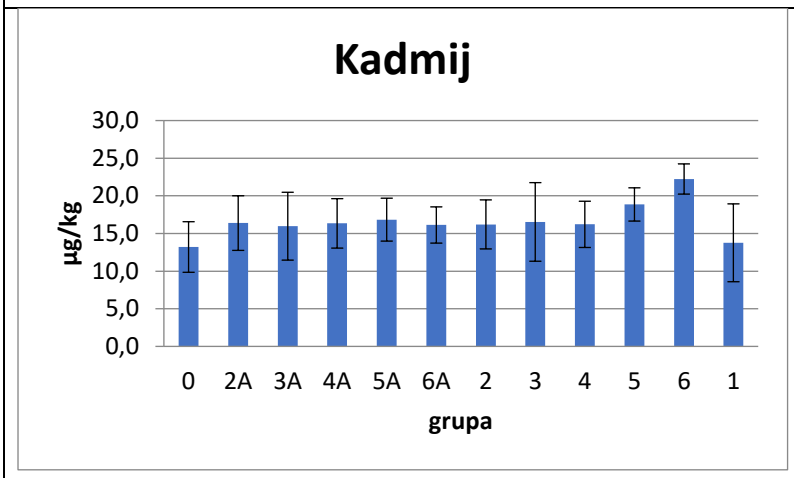
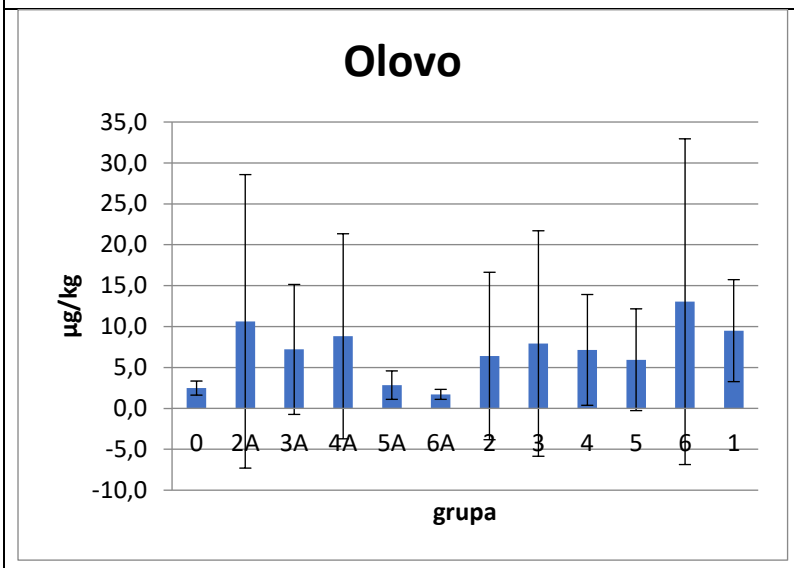
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,3594 MT(p)=0,4727
	KW(p)=0,0977 MT(p)=0,4168 Tukeys post hoc test=1-6A

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0666 MT(p)=0,34
	KW(p)=0,3336 MT(p)=0,3030

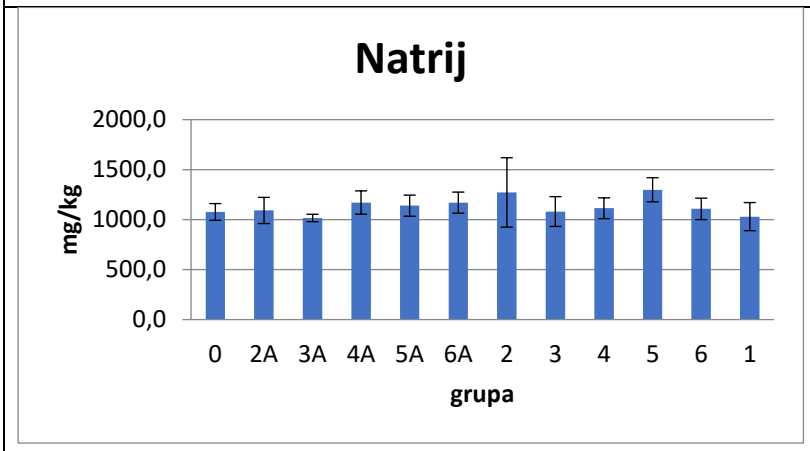
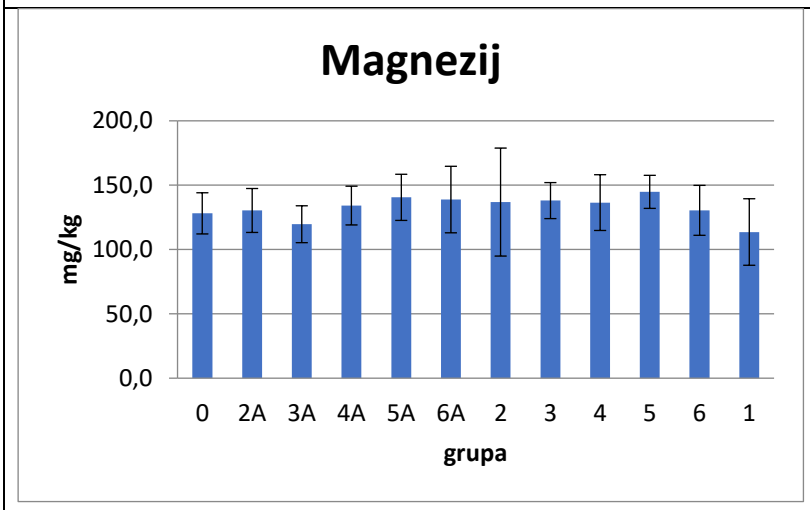
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1896 MT(p)=0,4613
	KW(p)=0,1083 MT(p)=0,4613

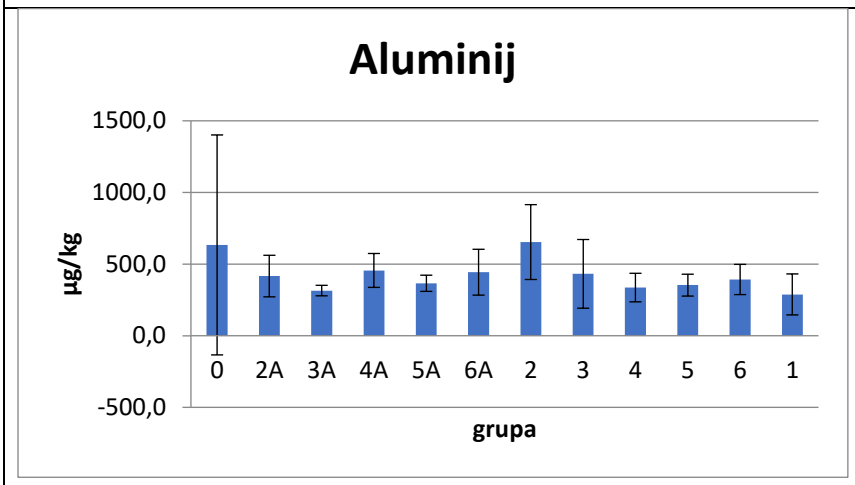
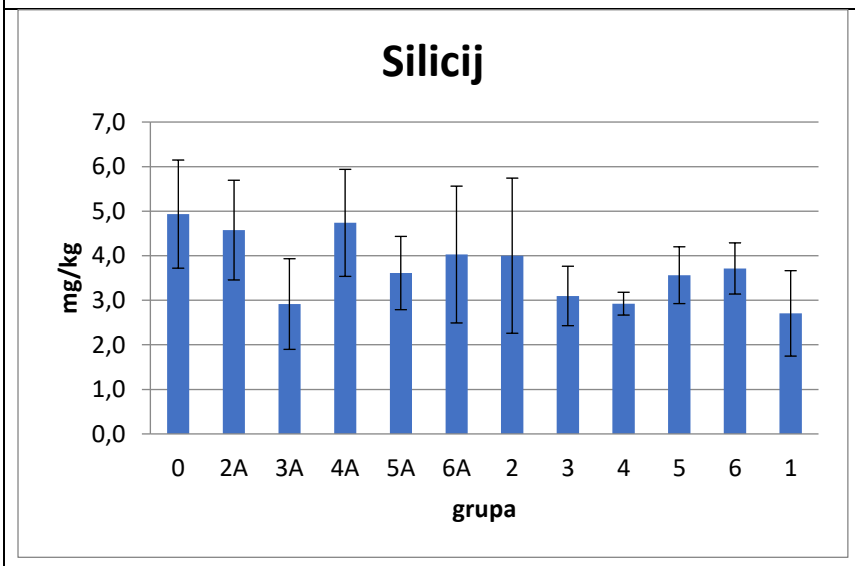
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1808 MT(p)=0,2813
	KW(p)=0,0431 MT(p)=0,1251 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=1-6A

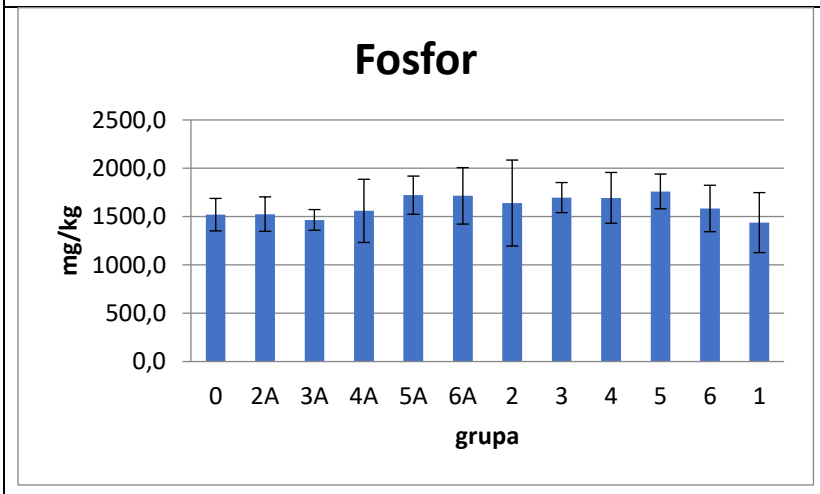
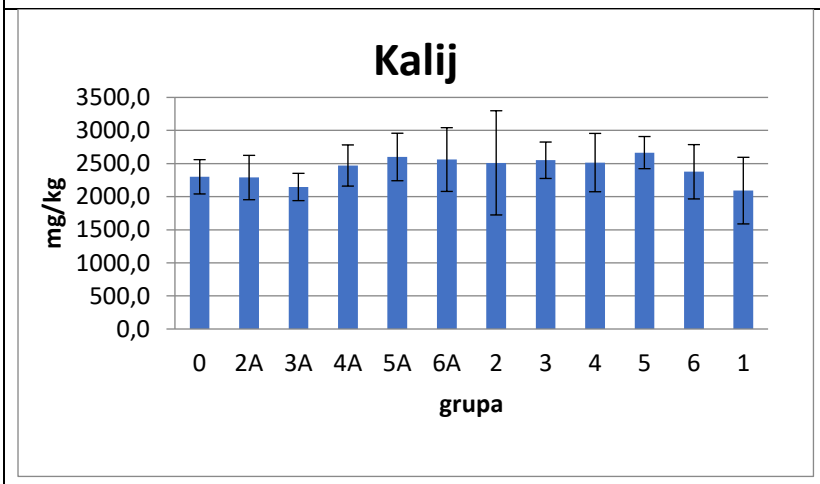
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0025 MT(p)=0,0013 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=5A-2,4A-2,5A-5,4A-5,5A-1,5A-6,4A-6,5A-3,4A-3,5A-4,4A-4 Tukeys HSD post hoc test=2-4A,4A-5,1-4A,2-5A,1-5A
	KW(p)=0,4104 MT(p)=0,0131 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=5-4,5-1,5-2A,5-6A

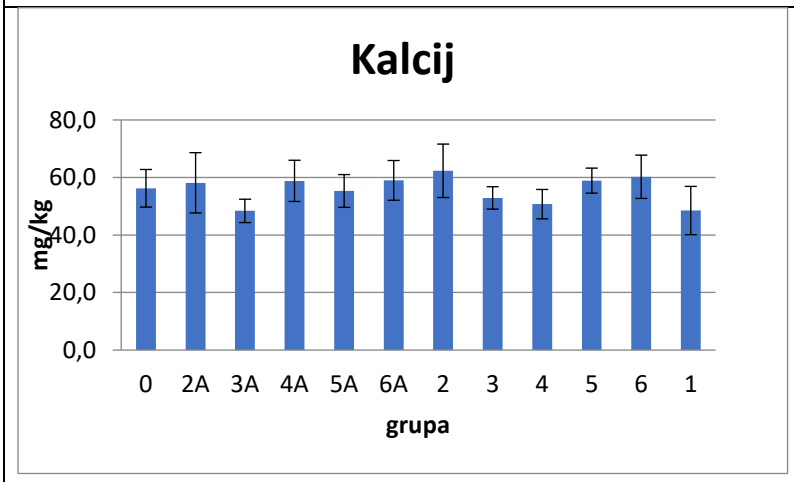
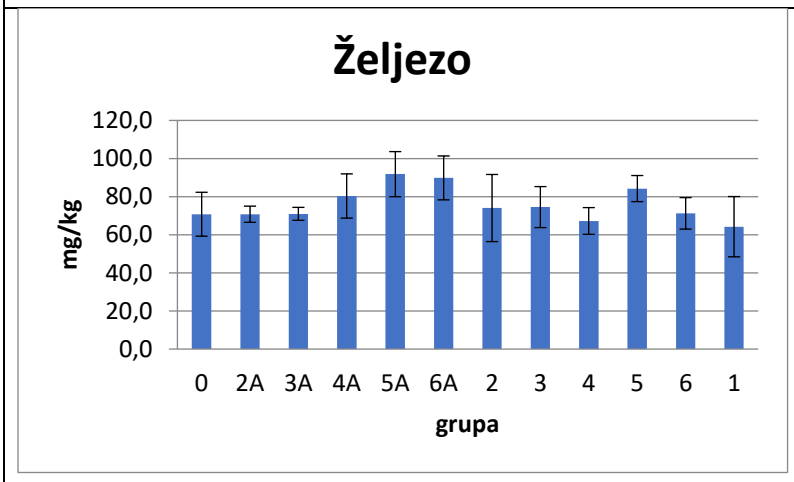
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1177 MT(p)=0,1626 Post hoc analiza=0-6
	KW(p)=0,1616 MT(p)=0,0189 Post hoc analiza=nema razlike

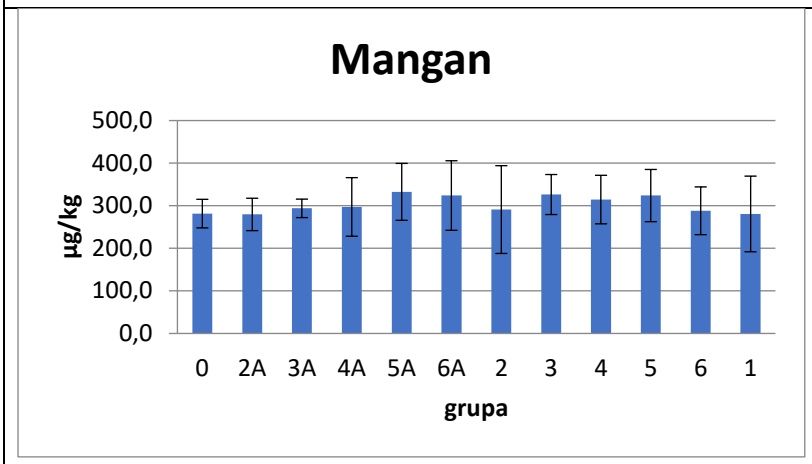
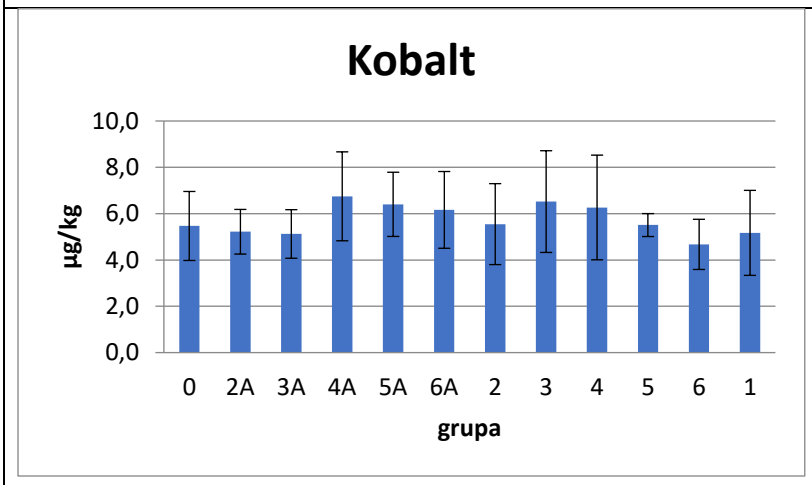
Jajnici

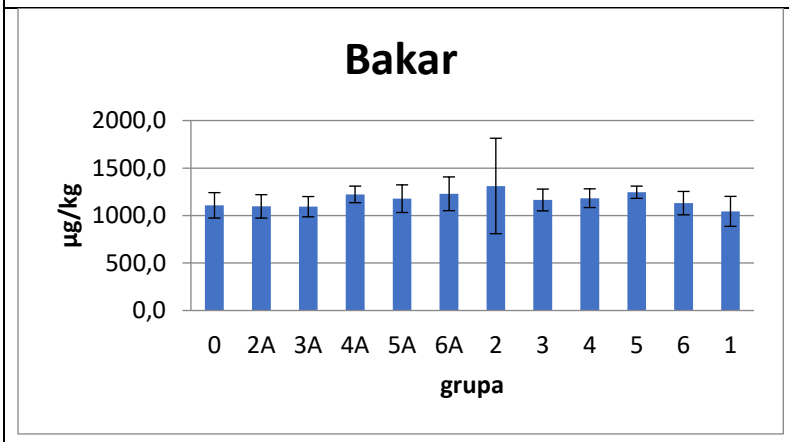
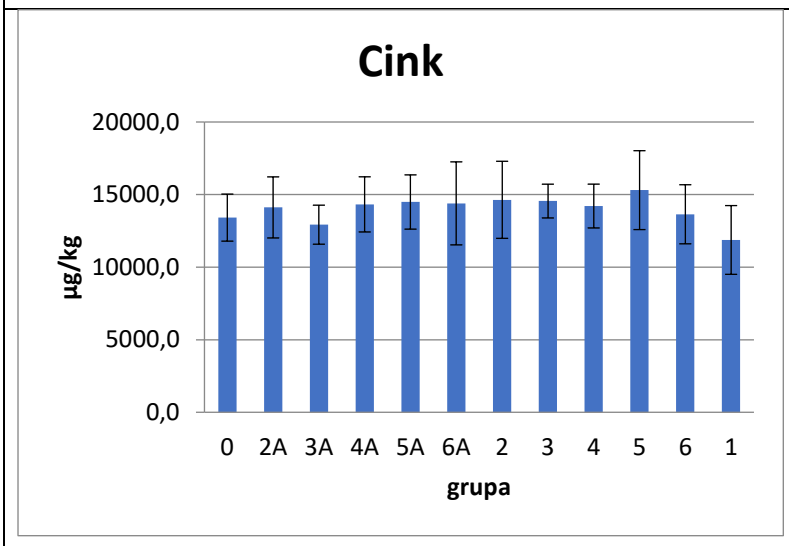
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1159 MT(p)=0,2089
	KW(p)=0,5533 MT(p)=0,4223

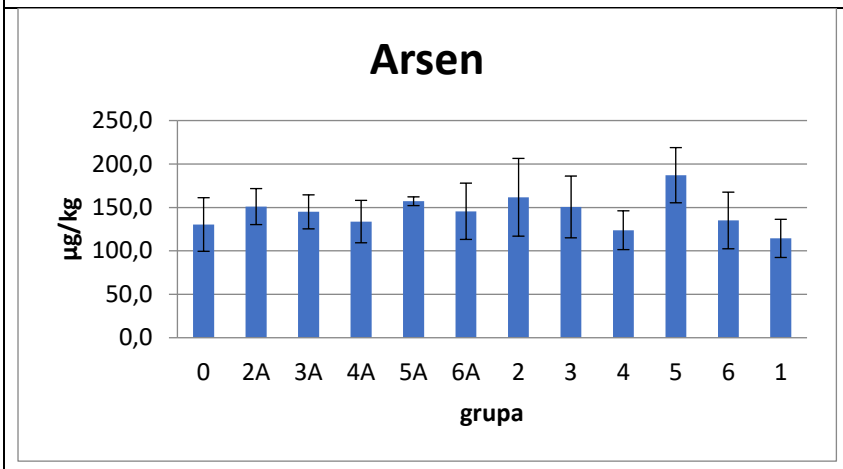
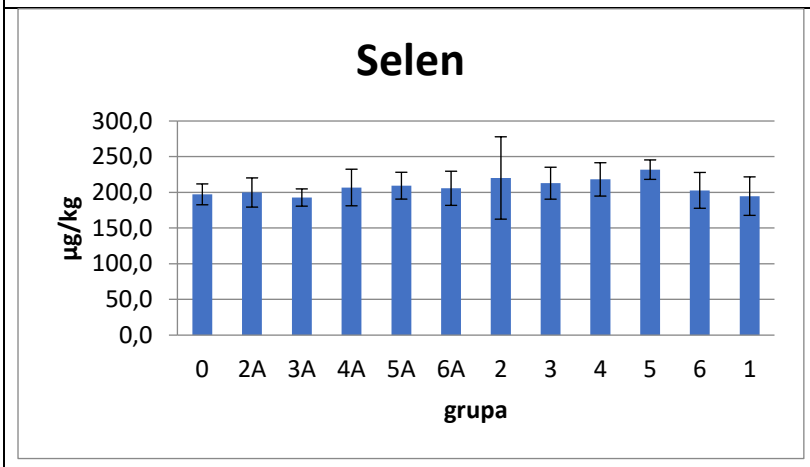
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1836 MT(p)=0,1518
	KW(p)=0,0164 MT(p)=0,1296 MW-U test=0-3A,0-1,0-4,0-3,4A-3A,4A-1,2A-1,4A-4,4A-3A Tukeys post hoc test=1-2

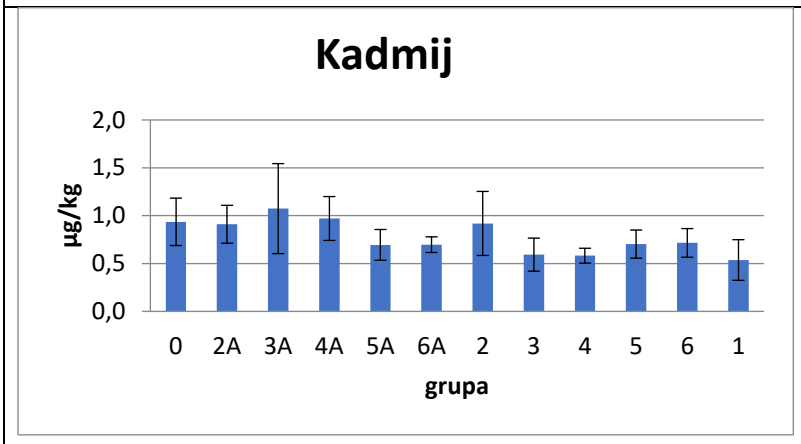
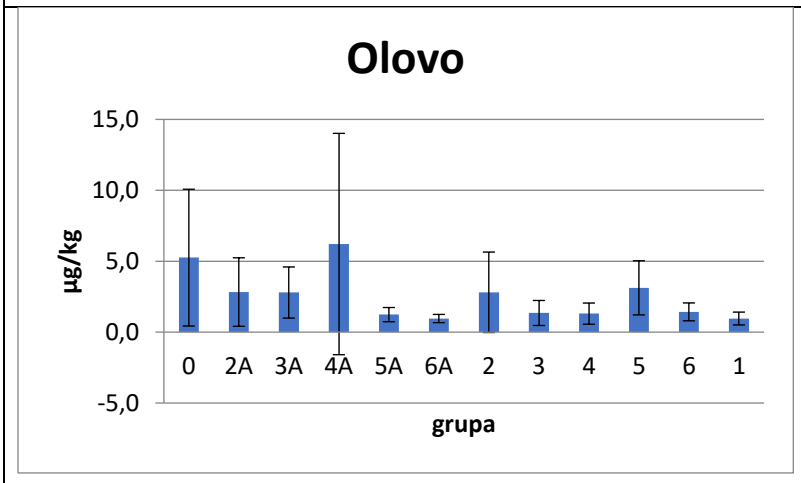
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,3969 MT(p)=0,3212
	KW(p)=0,3899 MT(p)=0,1893

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0436 MT(p)=0,1466 Post hoc analiza=nema razlike
	KW(p)=0,0074 MT(p)=0,0534 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=5A-4,6A-4,5A-1,6A-1,6A-6,5-4 Tukeys post hoc test=4-5A,1-5A,1-6A

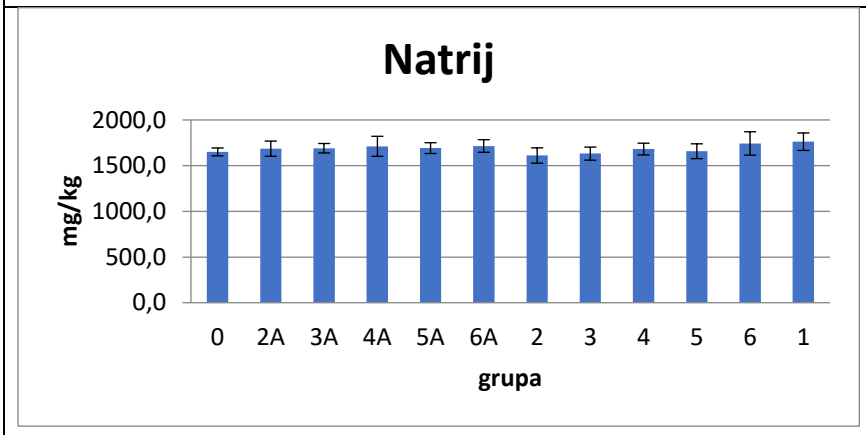
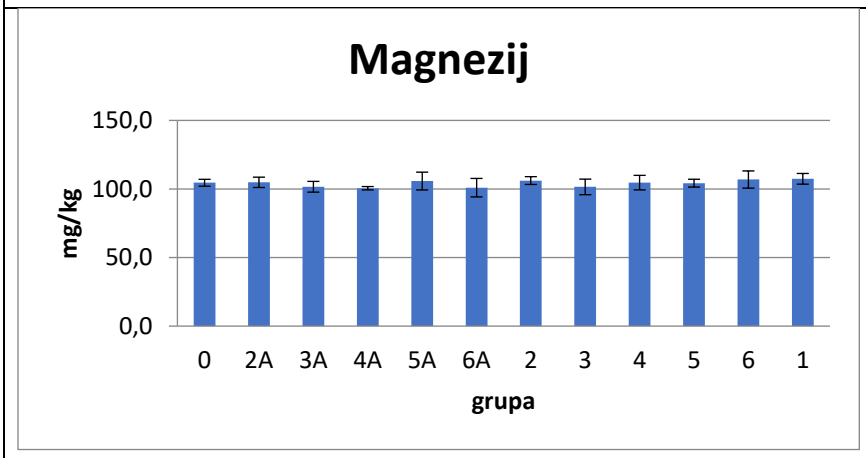
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,8663 MT(p)=0,8743
	KW(p)=0,5892 MT(p)=0,5137

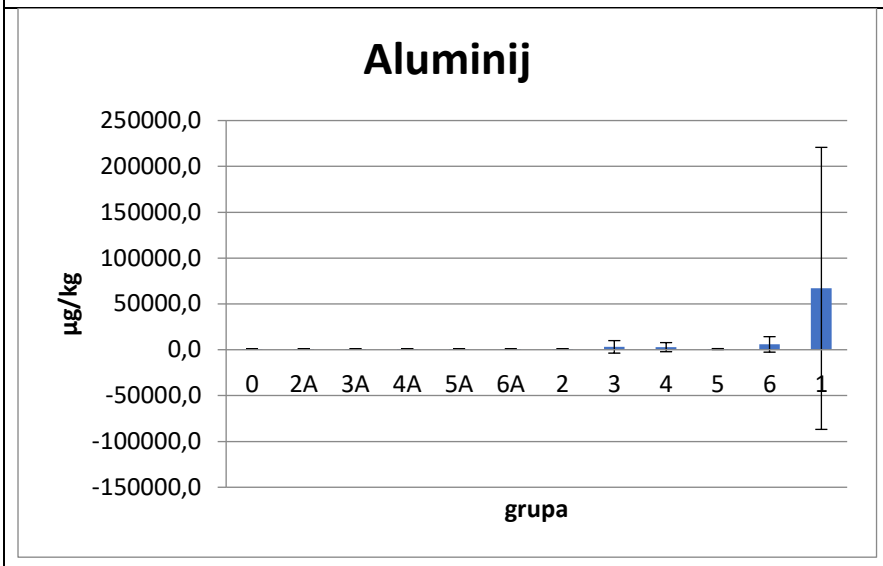
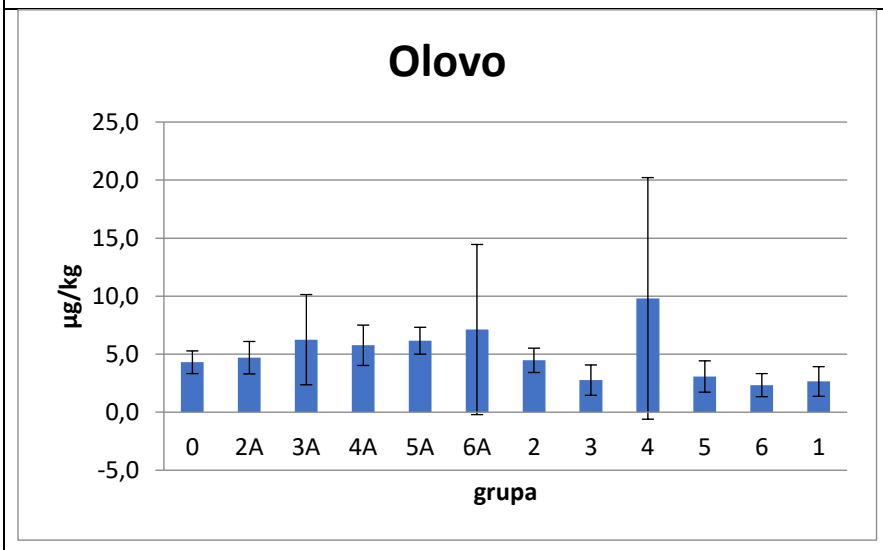
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,3928 MT(p)=0,4901
	KW(p)=0,5876 MT(p)=0,6536

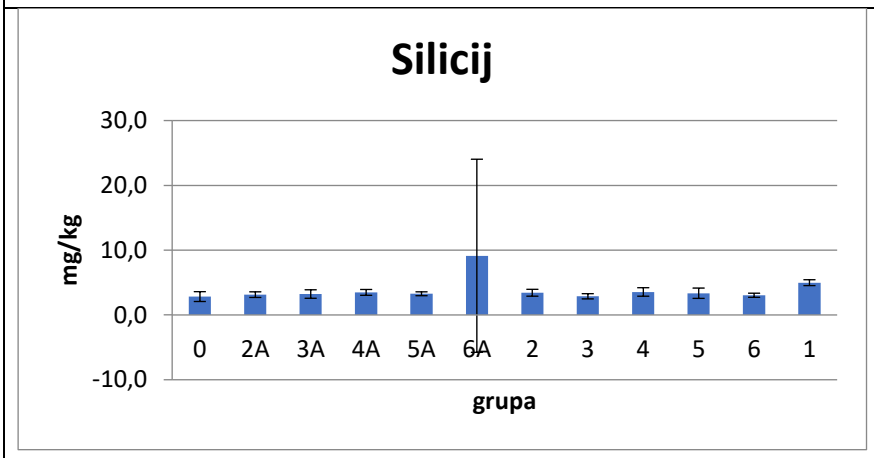
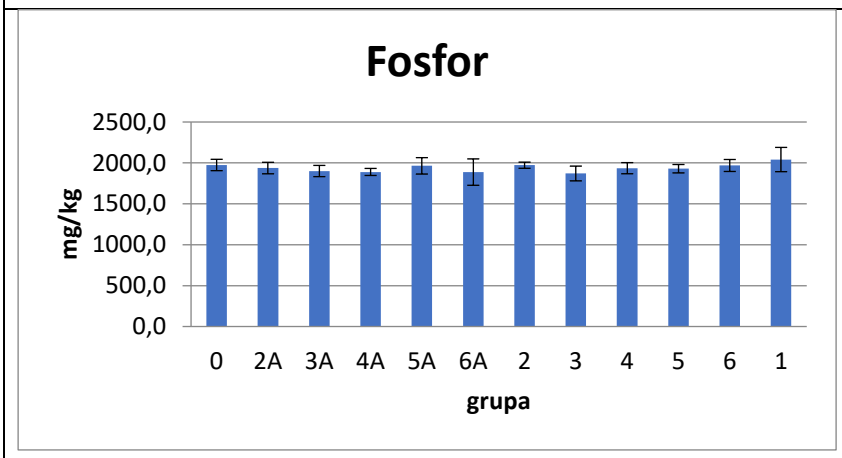
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0666 MT(p)=0,0411 Post hoc analiza=nema razlike Tukeys post hoc test=1-5,4-5
	KW(p)=0,0045 MT(p)=0,23

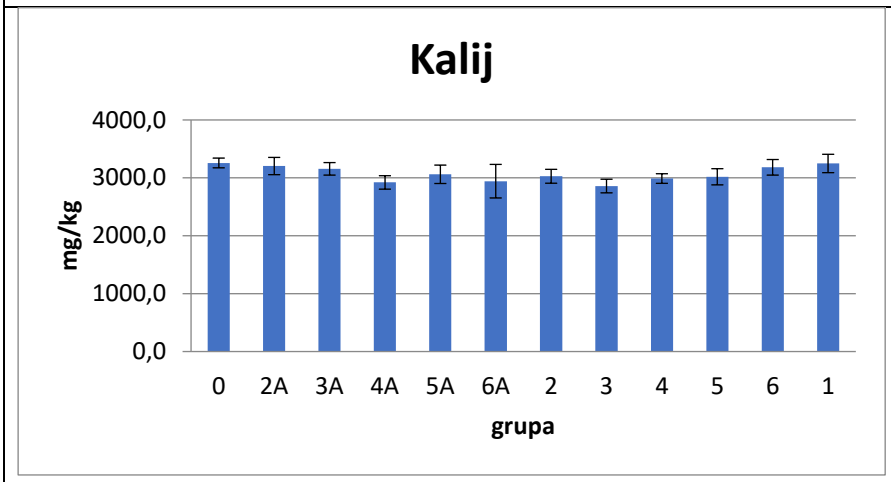
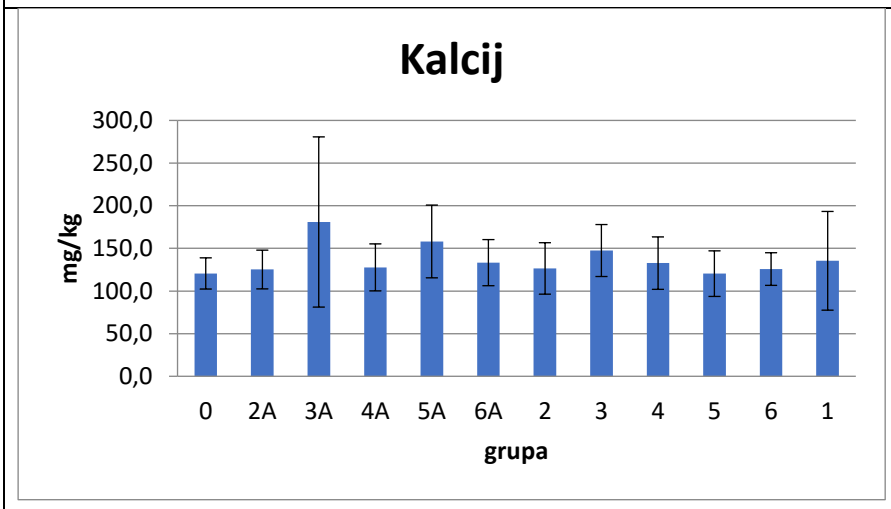
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0045 MT(p)=0,0302 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=1-3A,1-4A,3-4A,4A-4,0-1,0-3,0-4,6A-4A,6A-0
	KW(p)=0,0464 MT(p)=0,0689 Post hoc analiza=nema razlike

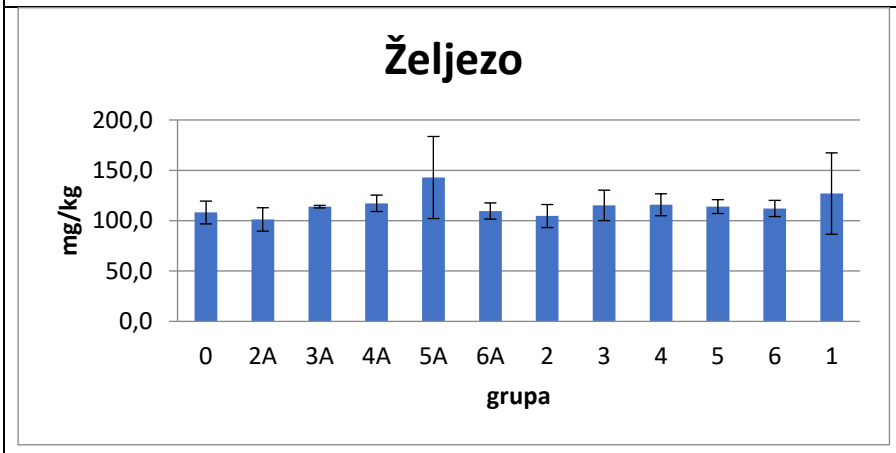
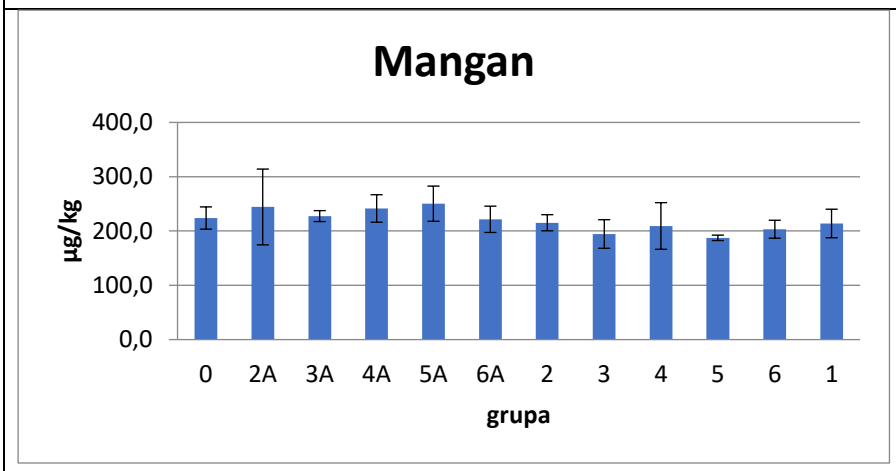
Pluća

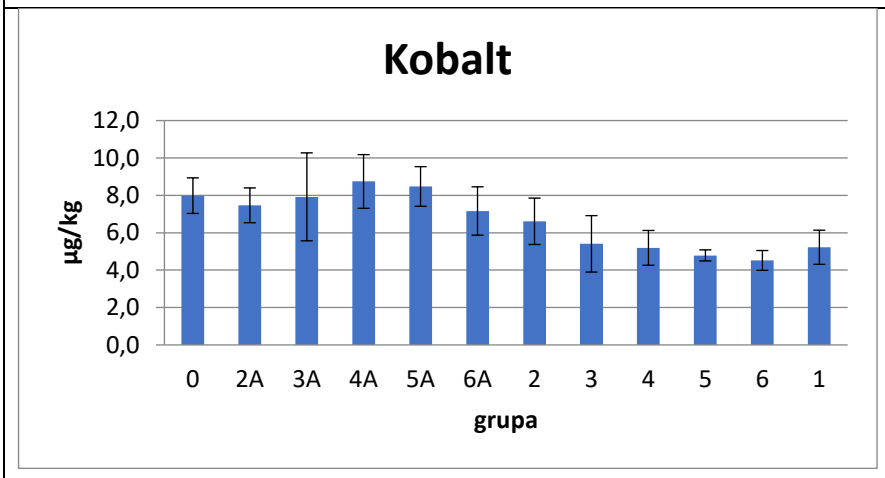
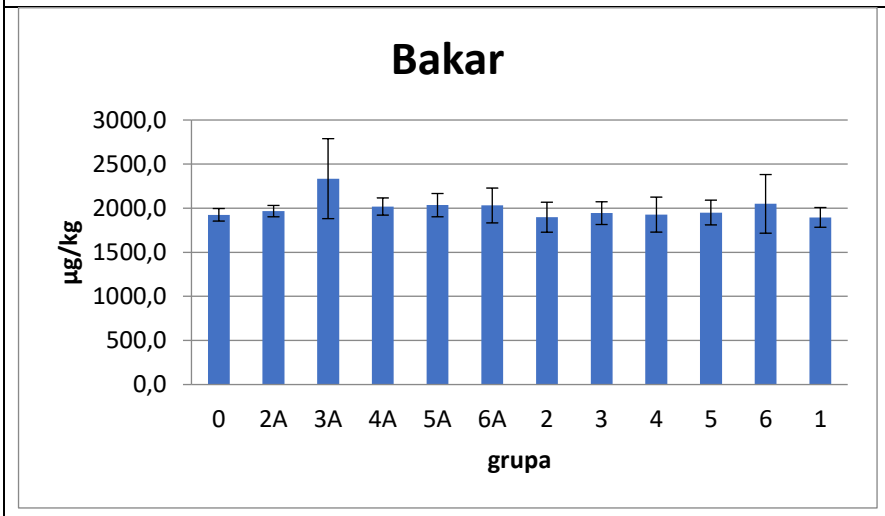
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,2961 MT(p)=0,6905
	KW(p)=0,1091 MT(p)=0,277

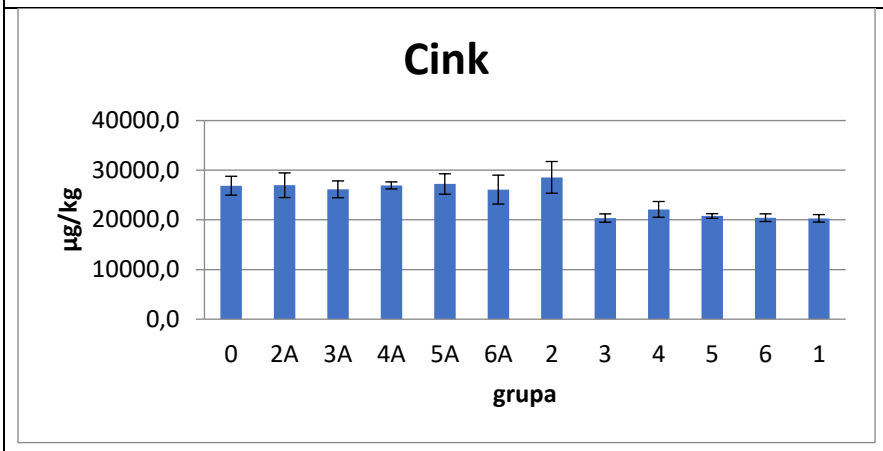
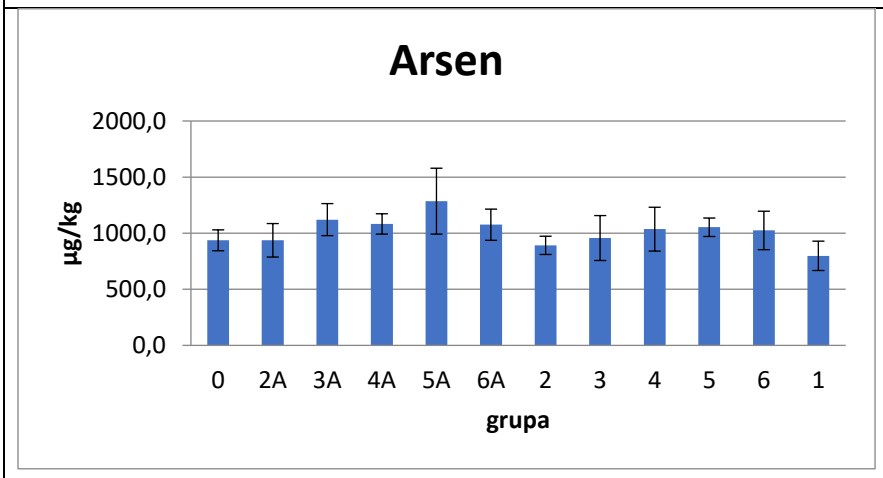
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,4006 MT(p)=0,4556
	KW(p)=0,0016 MT(p)=0,0037 Post hoc analiza=nema razlike MW-U=1-4,4-6

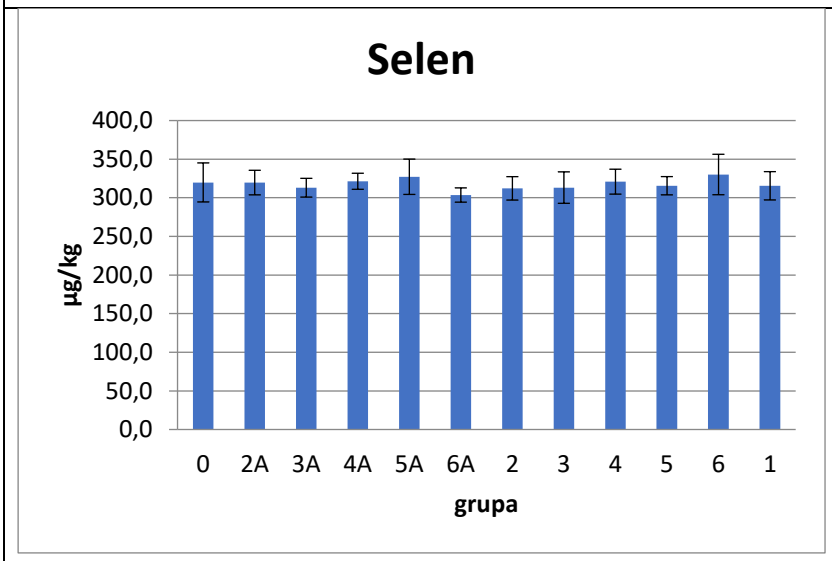
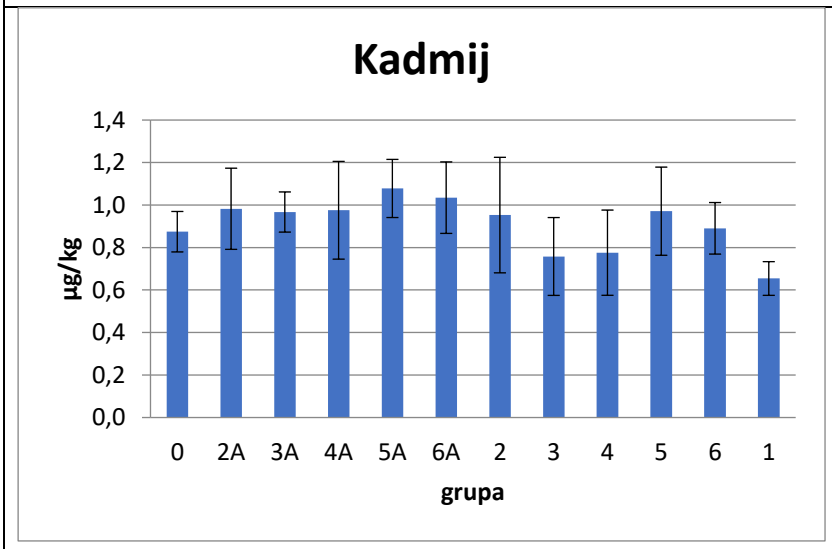
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0206 MT(p)=0,1831 Post hoc analiza=0-1,1-3
	KW(p)=0,1865 MT(p)=0,1343

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0001 MT(p)=0,0006 Post hoc analiza=0-4A,0-3,1-4A,1-3 Tukeys HSD post hoc test=0-4A,0-6A,0-3,3-2A,1-4A,1-6A
	KW(p)=0,768 MT(p)=0,6722

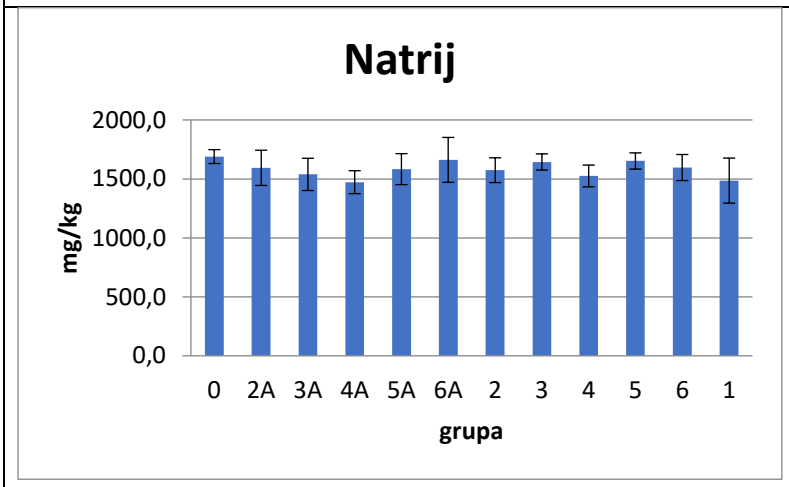
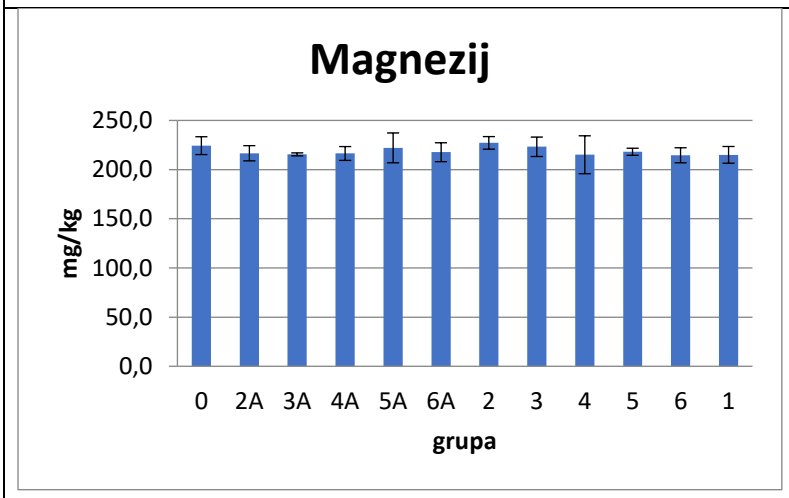
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,2463 MT(p)=0,5436
	KW(p)=0,0042 MT(p)=0,0082

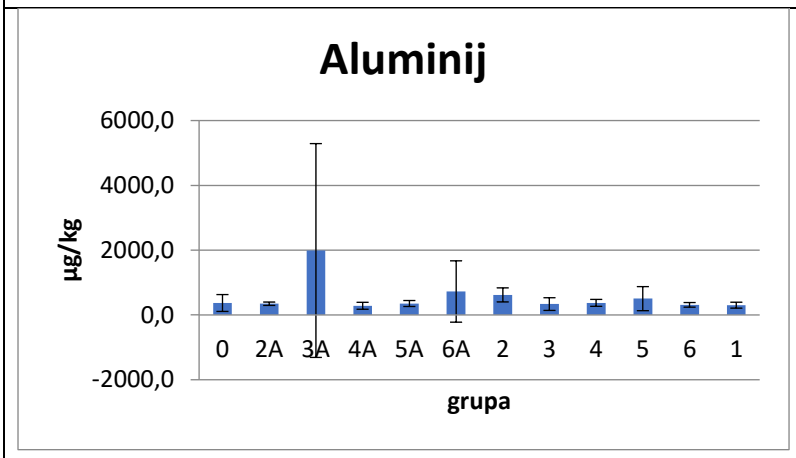
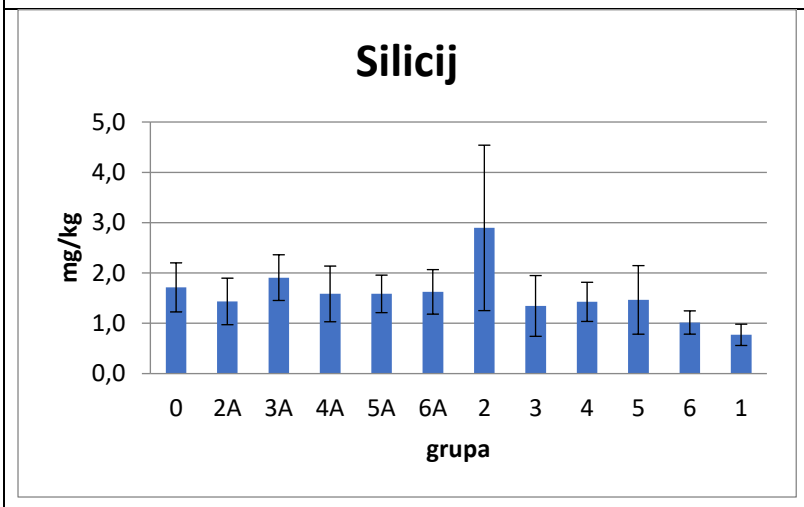
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0 MT(p)=0,0001 Post hoc analiza=4A-5,4A-6,5A-5,5A-6
	KW(p)=0,6693 MT(p)=0,5679

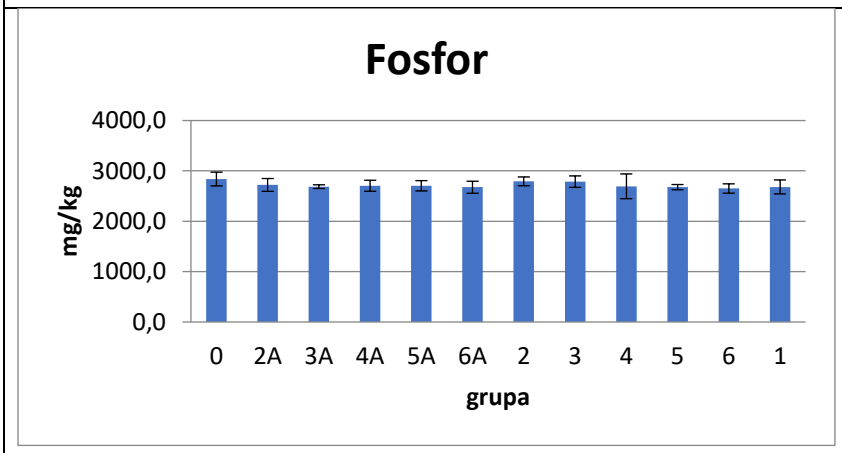
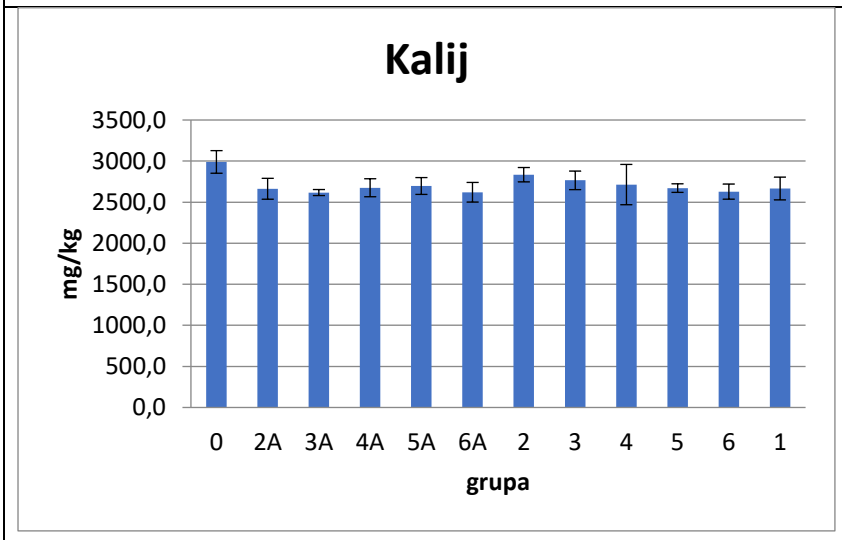
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0 MT(p)=0 Post hoc analiza=1-5A,2-3,1-2
	KW(p)=0,005 MT(p)=0,0225 Post hoc analiza=1-5A Tukeys post hoc test=0-5A,2A-5A,2-5A,3-5A,1-5A

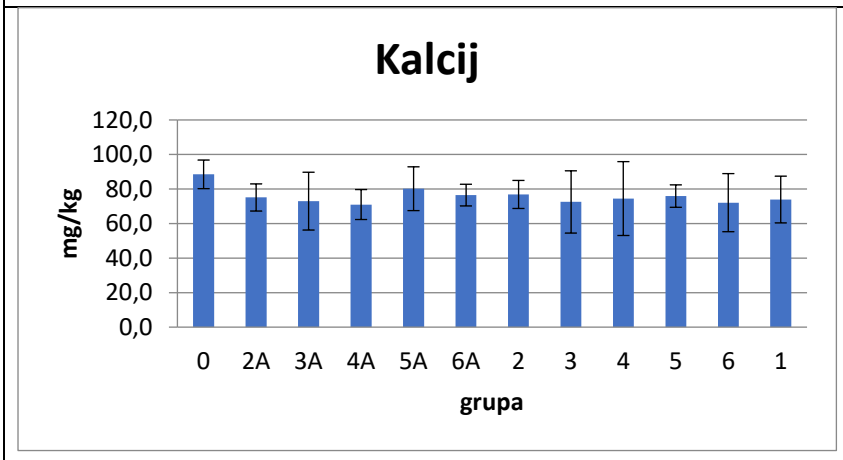
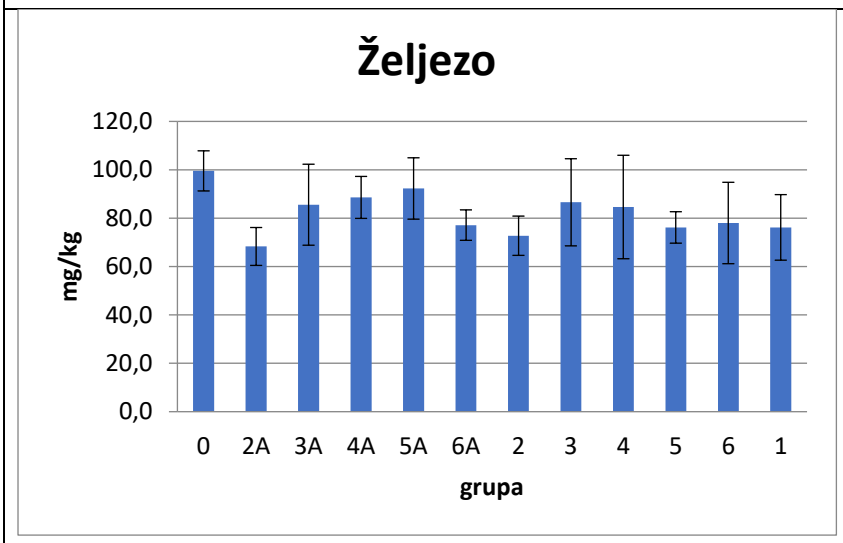
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,4626 MT(p)=0,8056
	KW(p)=0,0098 MT(p)=0,0289 Post hoc analiza=1-5A Tukeys HSD post hoc test=1-5A,1-6A

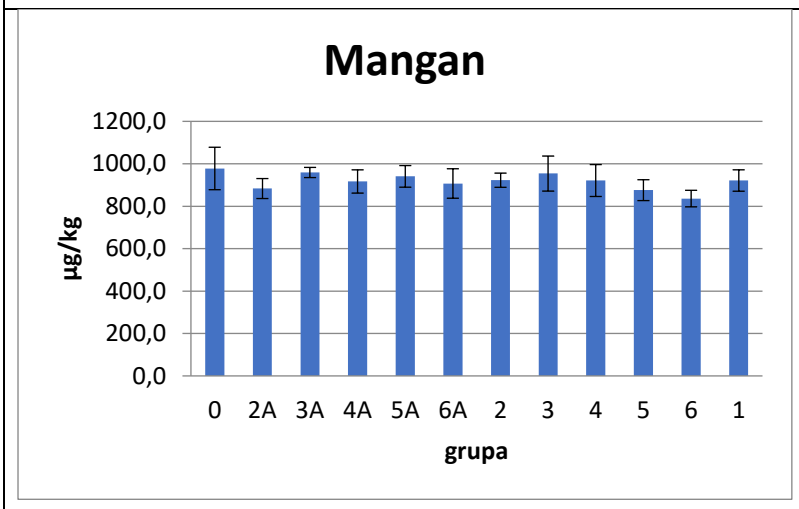
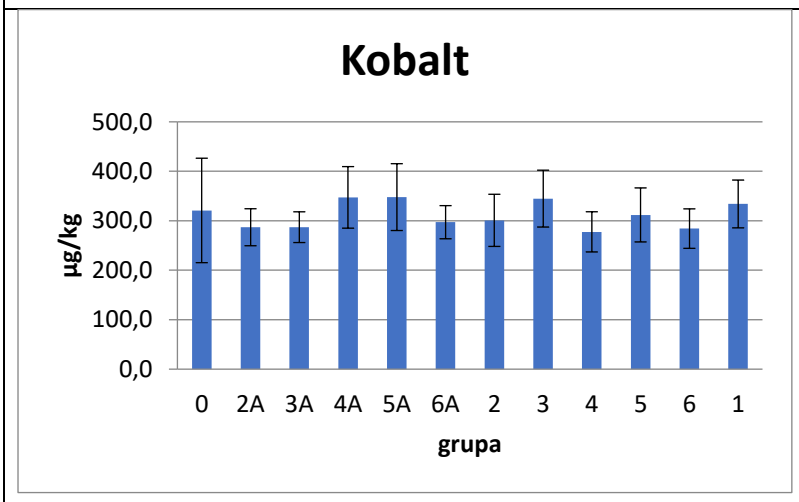
Bubrezi

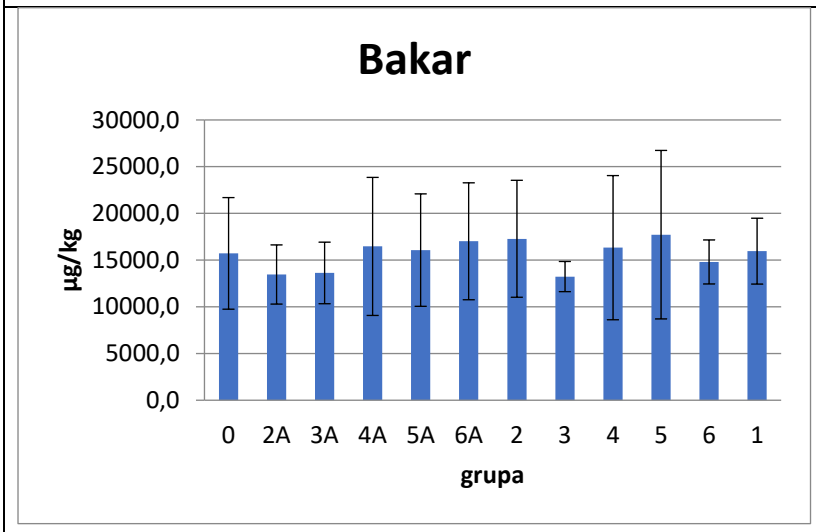
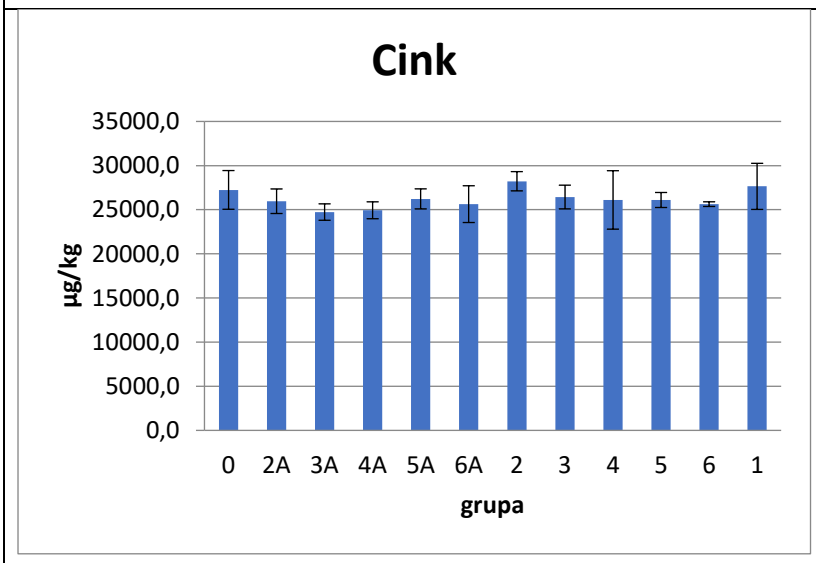
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0665 MT(p)=0,0356 Post hoc analiza=nema razlike
	KW(p)=0,3293 MT(p)=0,2813

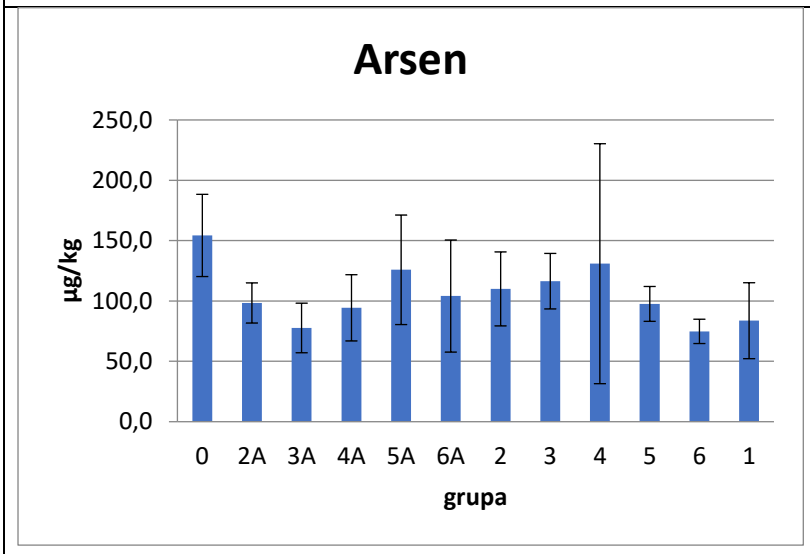
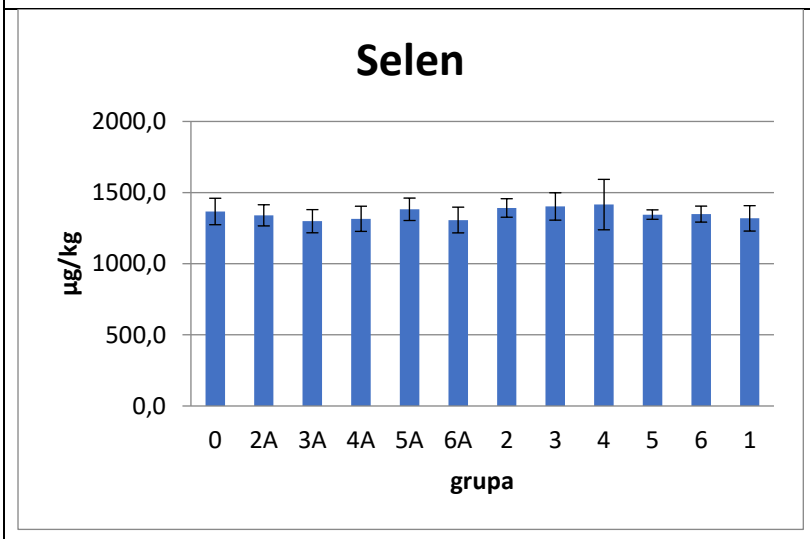
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,6926 MT(p)=0,8787 MW-U test=nema razlike
	KW(p)=0,0039 MT(p)=0,01 Post hoc analiza=1-2

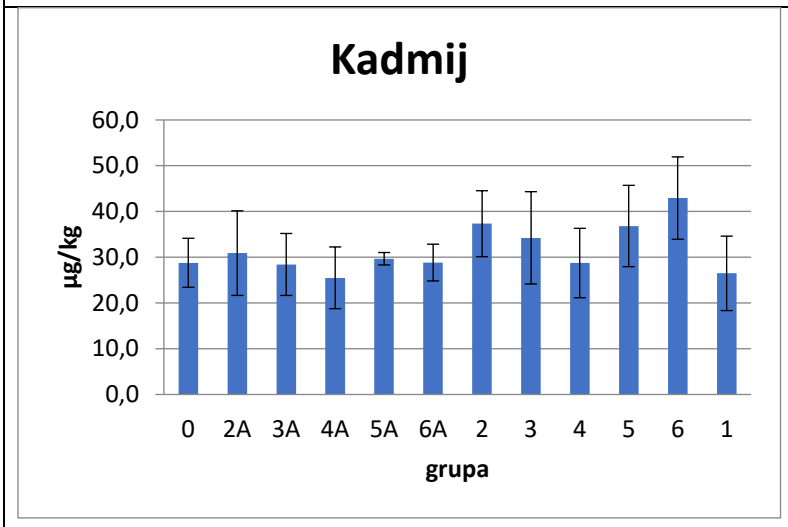
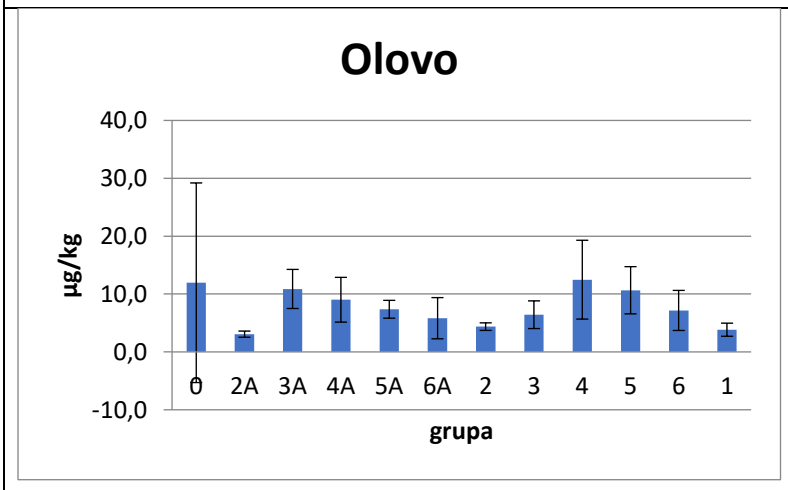
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1868 MT(p)=0,2089
	KW(p)=0,0661 MT(p)=0,2228

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,5362 MT(p)=0,4613
	KW(p)=0,0157 MT(p)=0,007 Post hoc analiza=0-2A

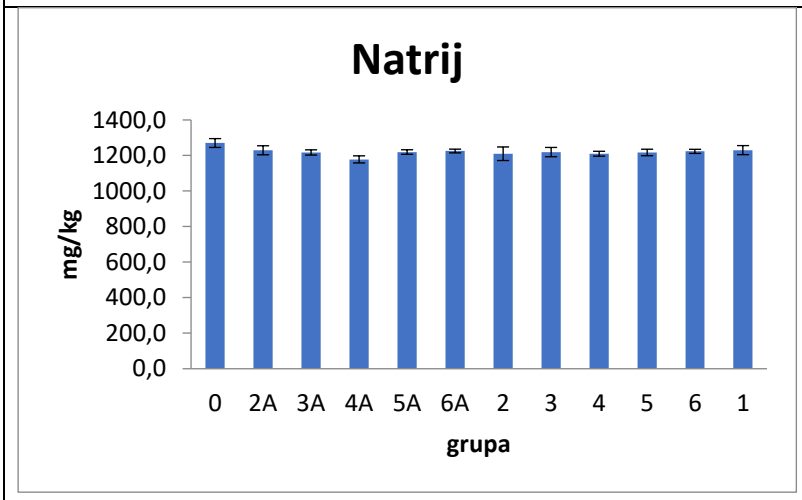
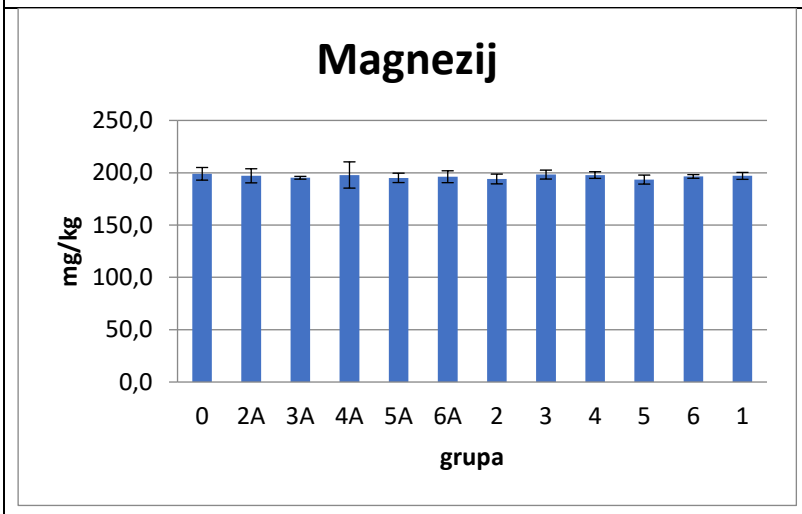
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0704 MT(p)=0,1893
	KW(p)=0,3817 MT(p)=0,1893

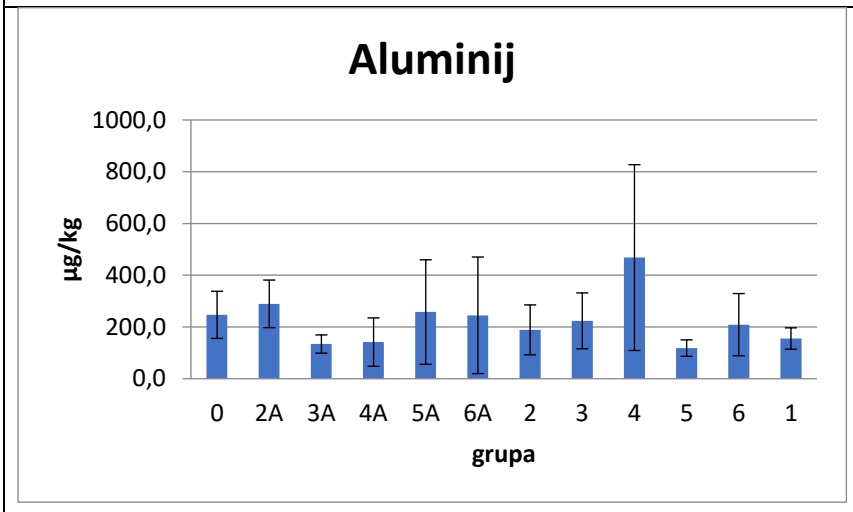
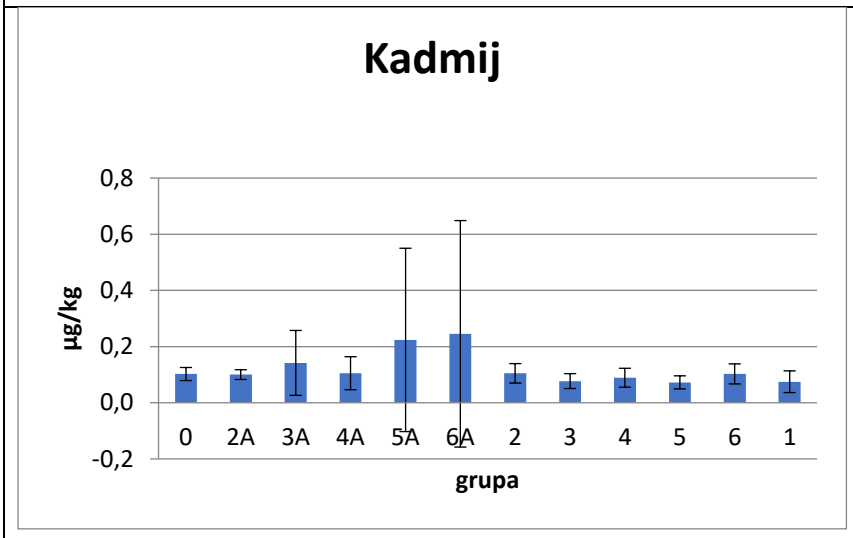
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,9926 MT(p)=0,987
	KW(p)=0,0876 MT(p)=0,0289 Post hoc analiza=nema razlike

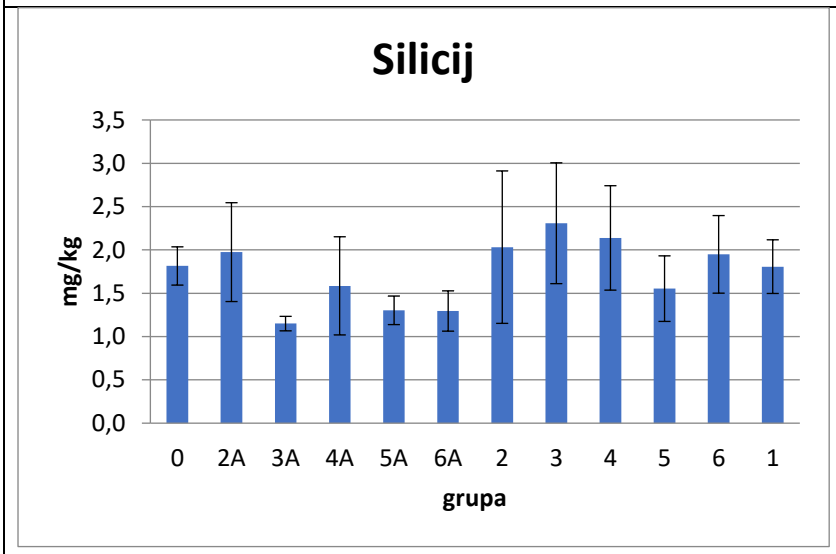
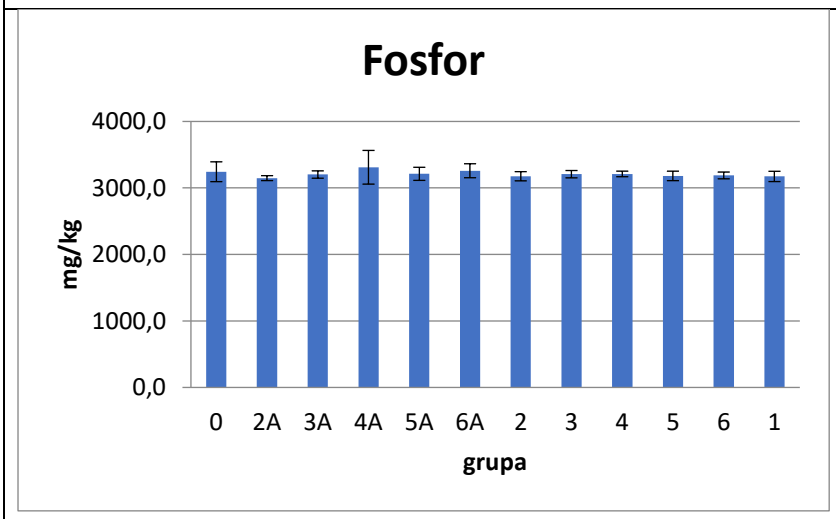
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0254 MT(p)=0,085 Post hoc analiza=0-6
	KW(p)=0,4989 MT(p)=0,45

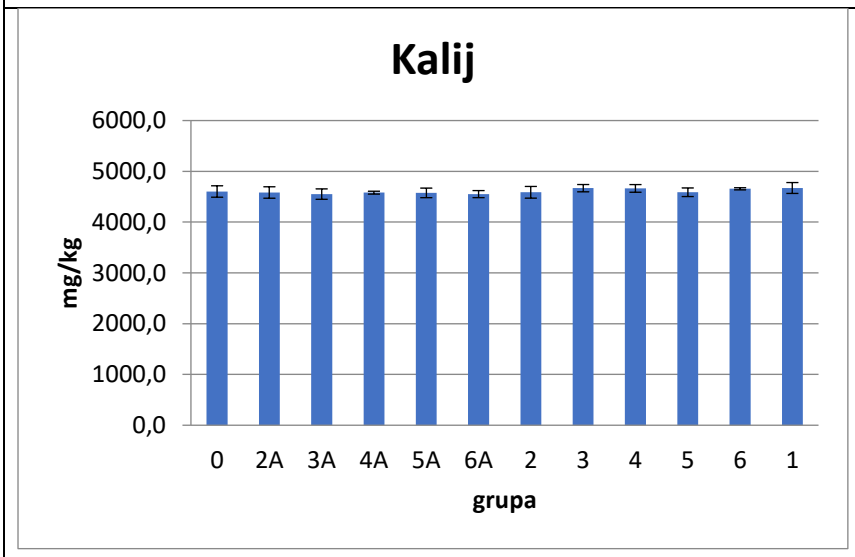
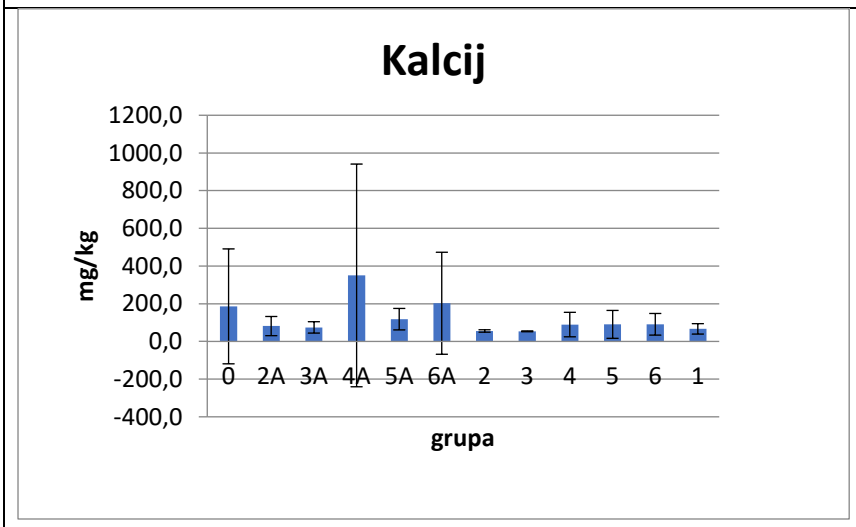
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,063 MT(p)=0,1441 Tukeys post hoc test=1-6,4A-6
	KW(p)=0,0003 MT(p)=0,0006 Post hoc analiza=2A-3A,2A-4,2A-5

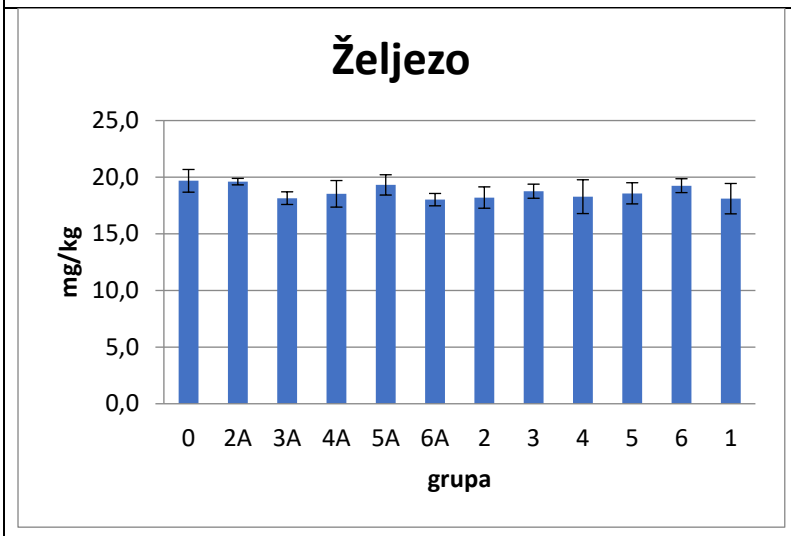
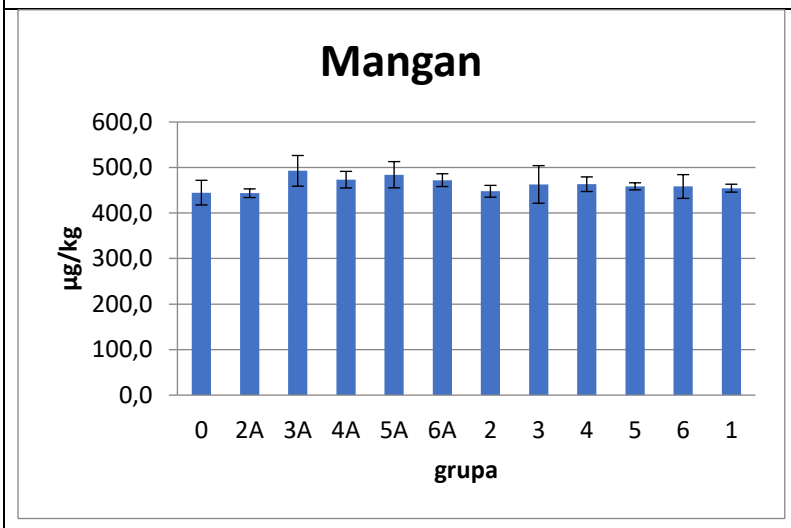
Mozak

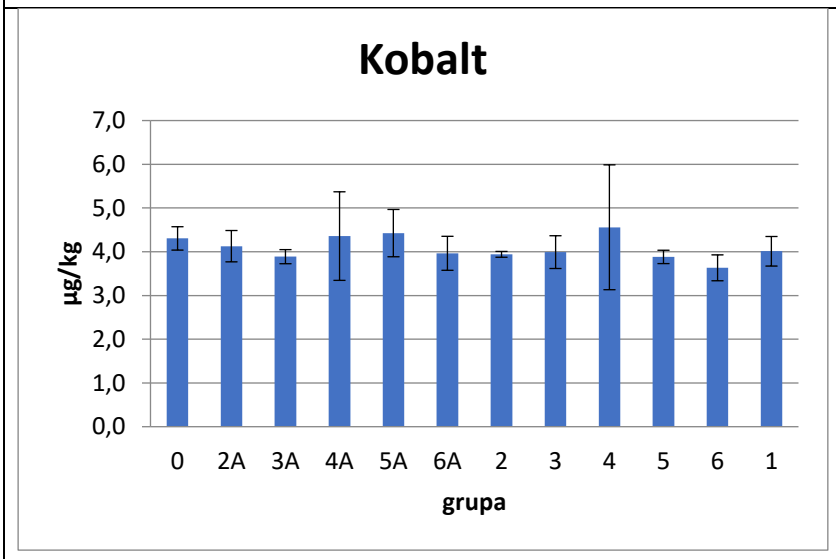
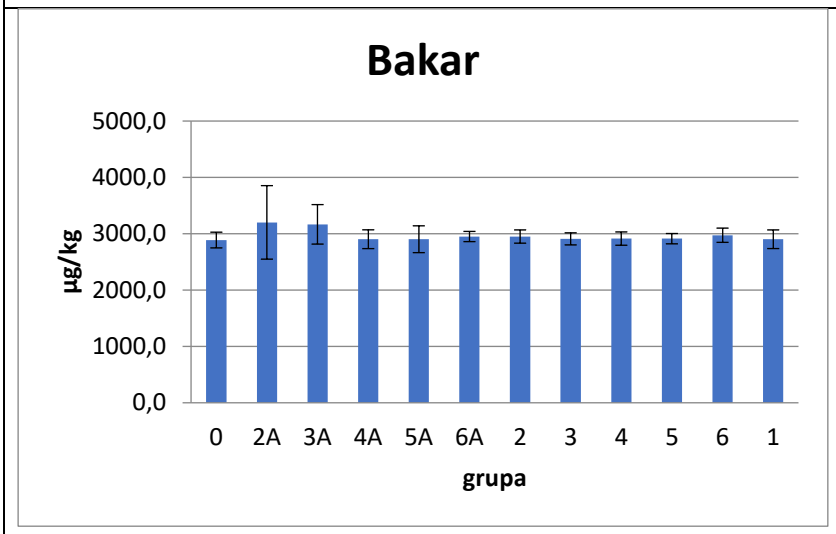
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,005 MT(p)=0,1319 Post hoc analiza=0-4A
	KW(p)=0,6146 MT(p)=0,5436

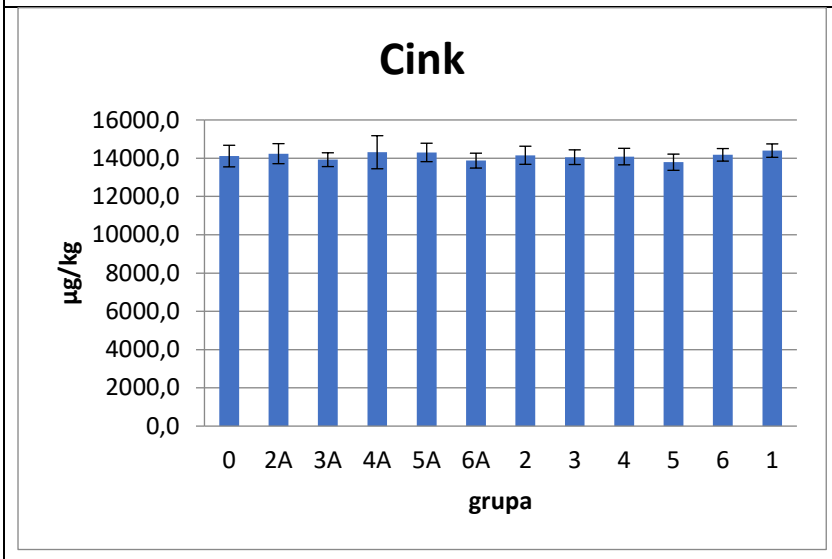
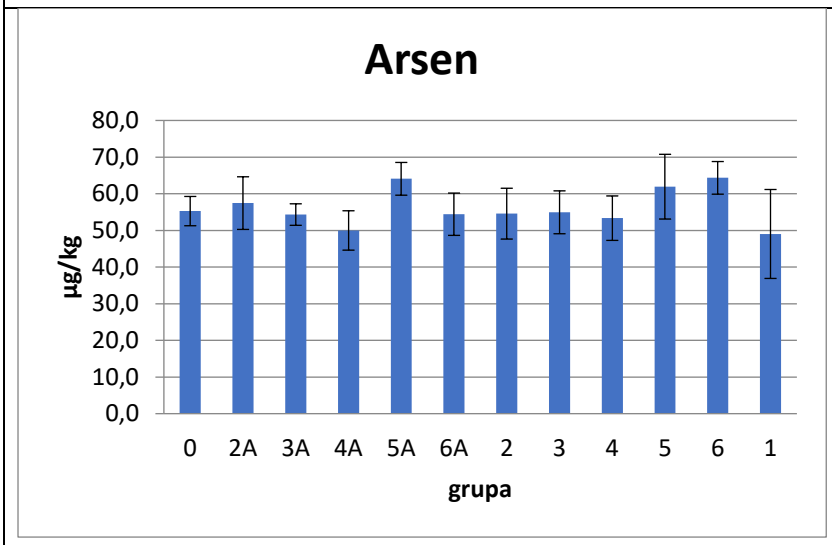
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0073 MT(p)=0,0112 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=4-3A,4-5,4-4A,1-4
	KW(p)=0,6489 MT(p)=0,7264

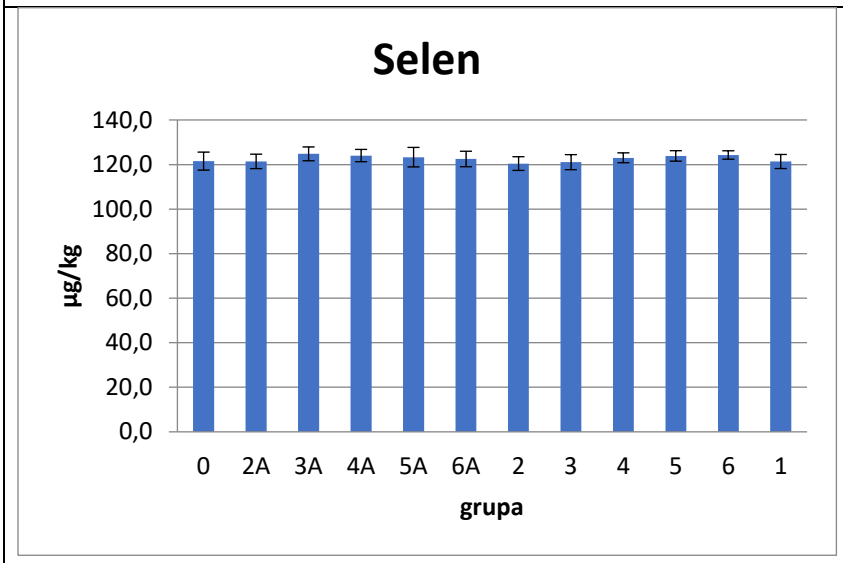
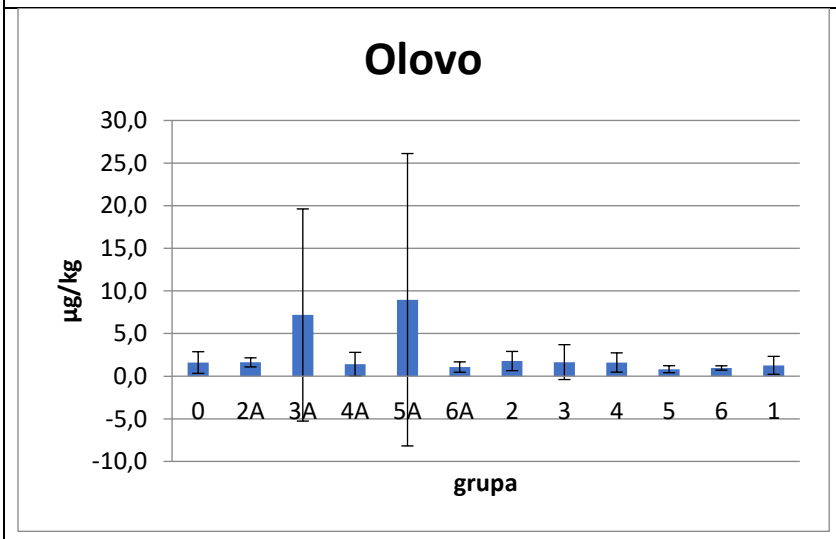
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0004 MT(p)=0,0007 Post hoc analiza=3-3A,3-6A
	KW(p)=0,5661 MT(p)=0,5557

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,2189 MT(p)=0,0523
	KW(p)=0,2862 MT(p)=0,1367

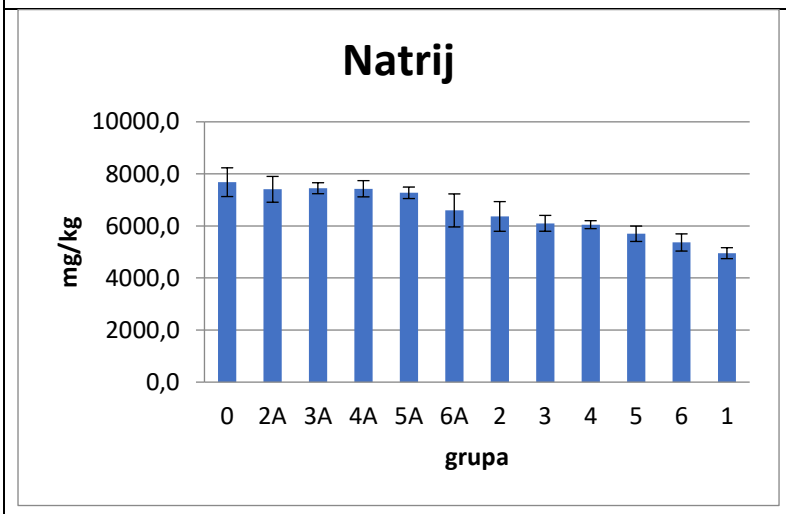
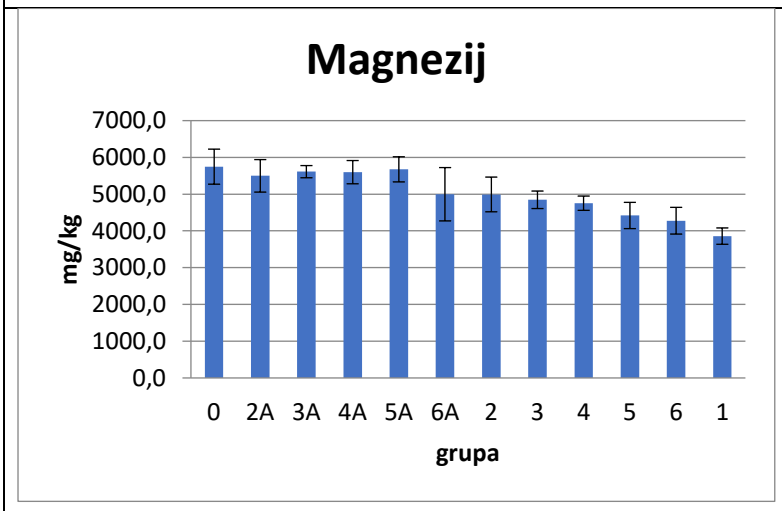
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,044 MT(p)=0,0356 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=0-6A
	KW(p)=0,0191 MT(p)=0,0272 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=2A-3A

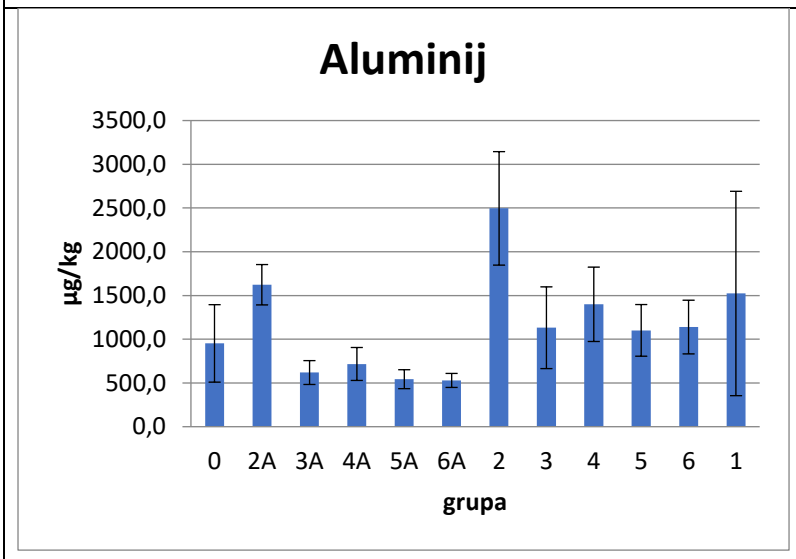
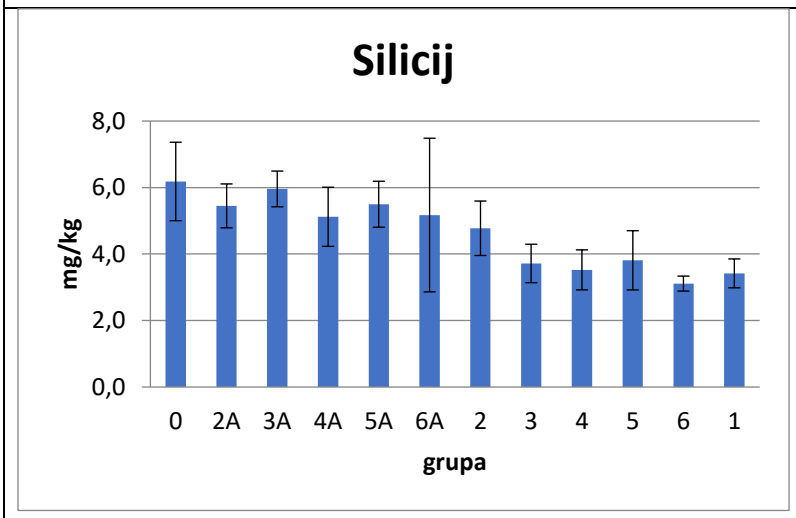
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,1937 MT(p)=0,0969
	KW(p)=0,8859 MT(p)=0,8743

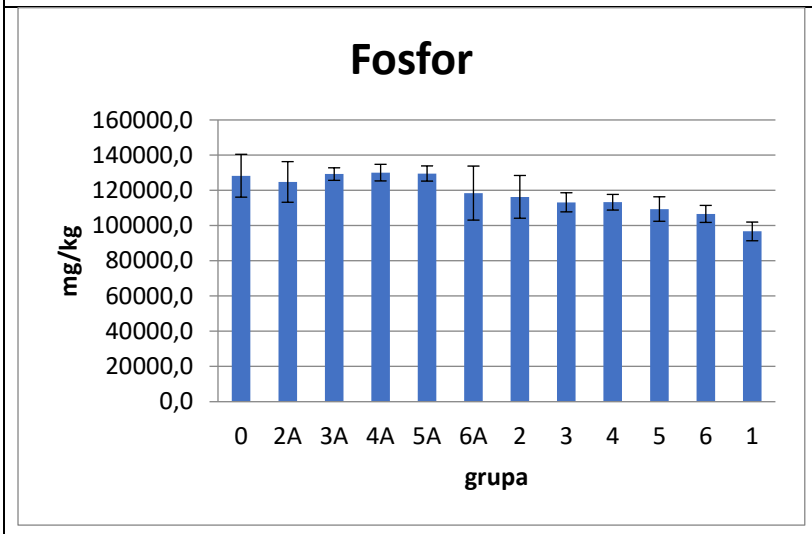
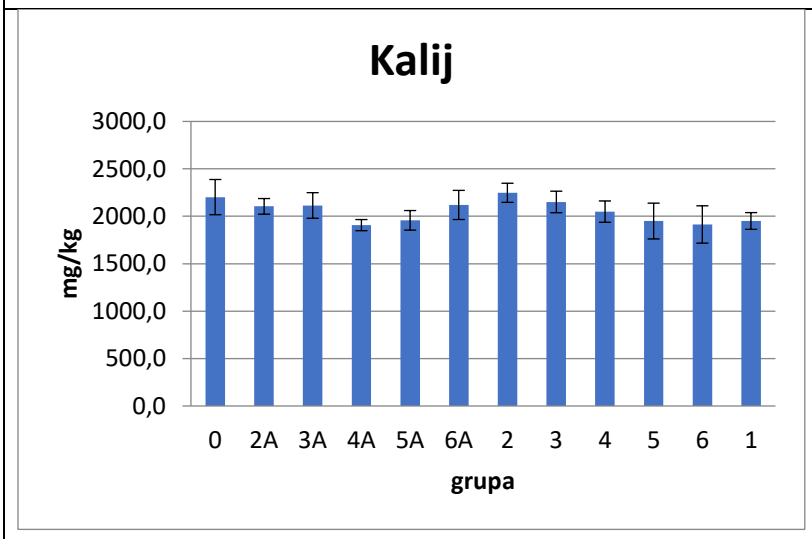
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,6691 MT(p)=0,6965
	KW(p)=0,021 MT(p)=0,0819 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=nema razlike

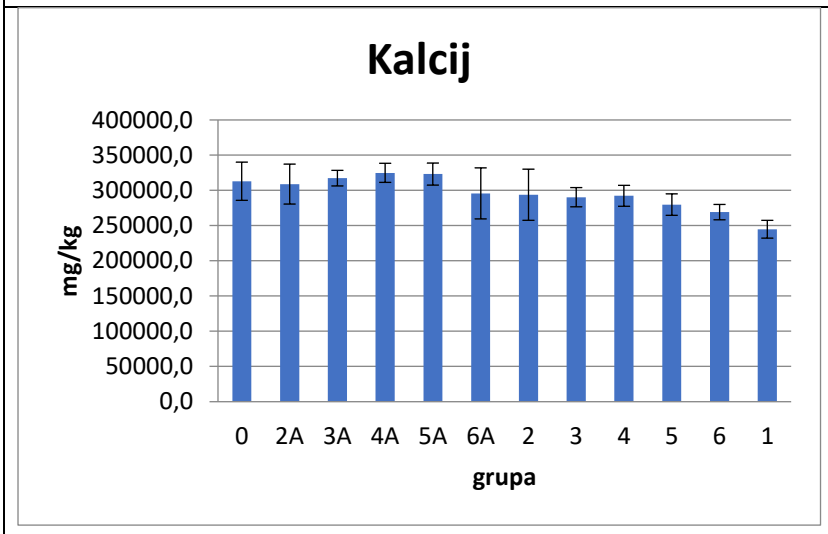
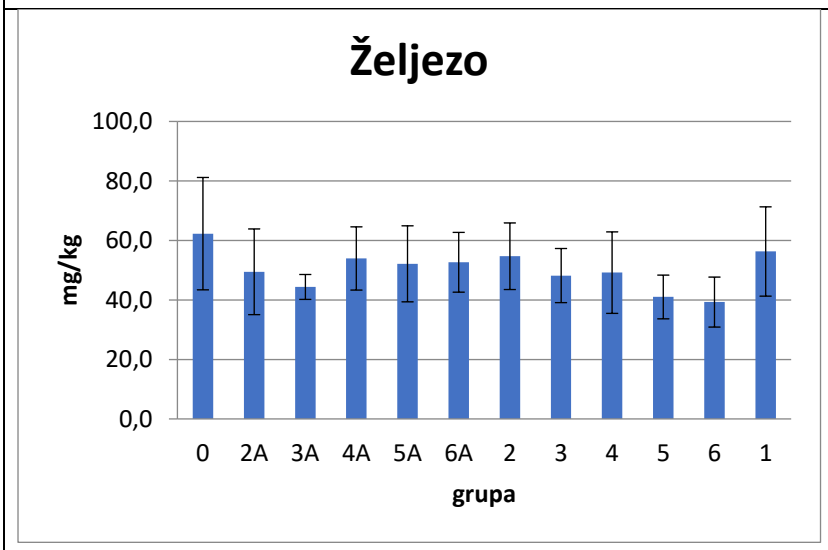
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,4836 MT(p)=0,5497
	KW(p)=0,5115 MT(p)=0,2898

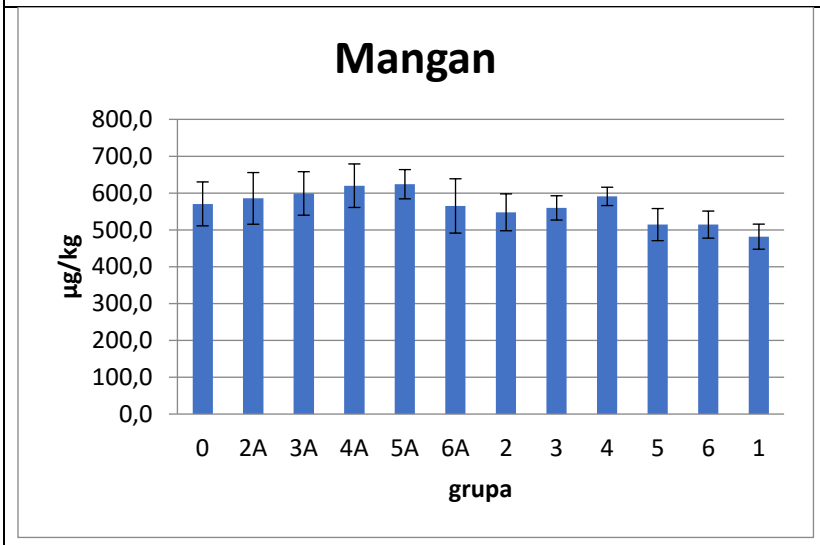
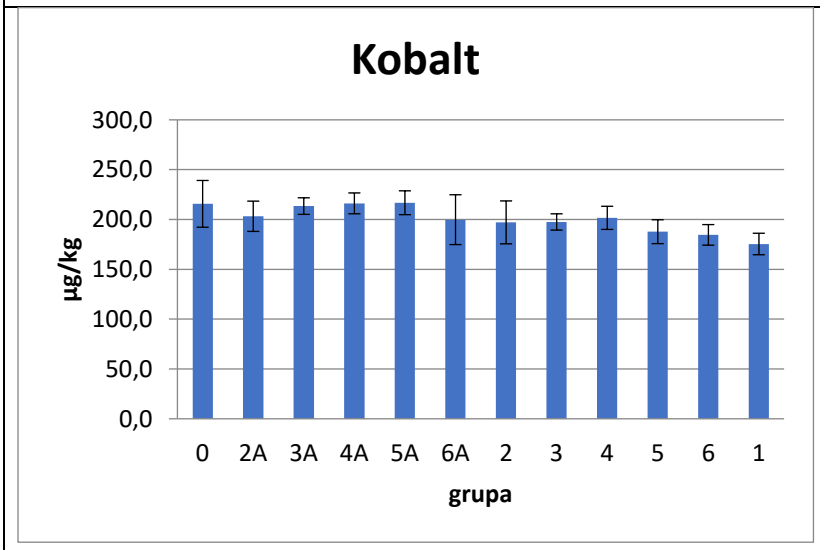
Kosti

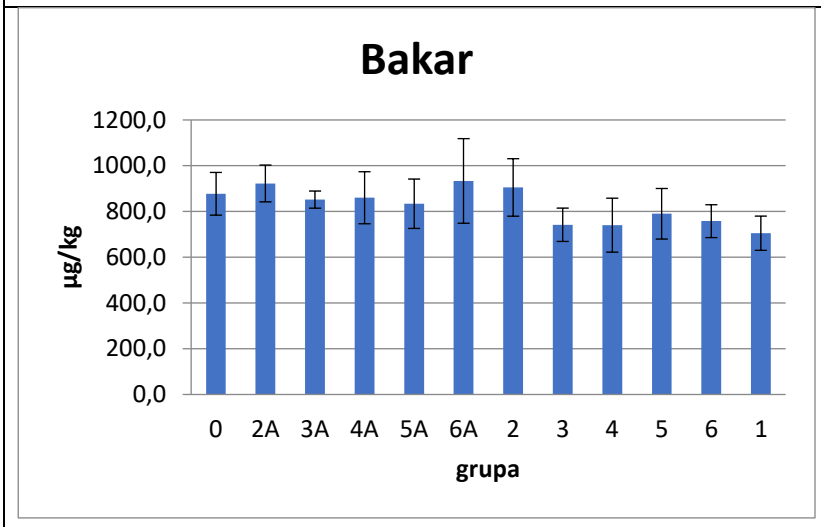
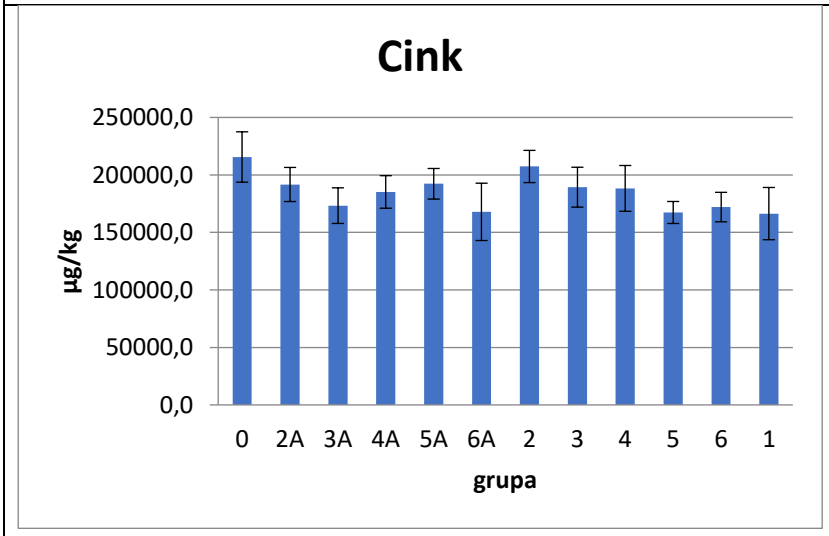
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0 MT(p)=0 Post hoc analiza=0-5,0-6,0-1,1-2A,3A-1,4A-1,5A-1 Tukeys HSD post hoc test=0-6A,0-2,0-3,0-4,0-5,0-6,0-1,2A-2,2A-3,2A-4,2A-5,2A-6,2-1,3A-2,3A-3,3A-4,3A-5,3A-6,1-3A,4A-6A,4A-2,4A-3,4A-4,4A-5,4A-6,4A-1,5A-2,5A-3,5A-4,5A-5,5A-6,5A-1,6A-5,6A-6,6A-1,3-1,4-1
	KW(p)=0 MT(p)=0 Post hoc analiza=0-1,1-2A,1-3A,1-4A,1-5A Tukeys HSD post hoc test=0-3,0-4,0-5,0-6,0-1,2A-5,2A-6,3A-5,3A-6,3A-1,4A-4,4A-5,4A-634A-1,5A-3,5A-4,5A-5,5A-6,5A-1,6A-1,1-2,1-3,1-4

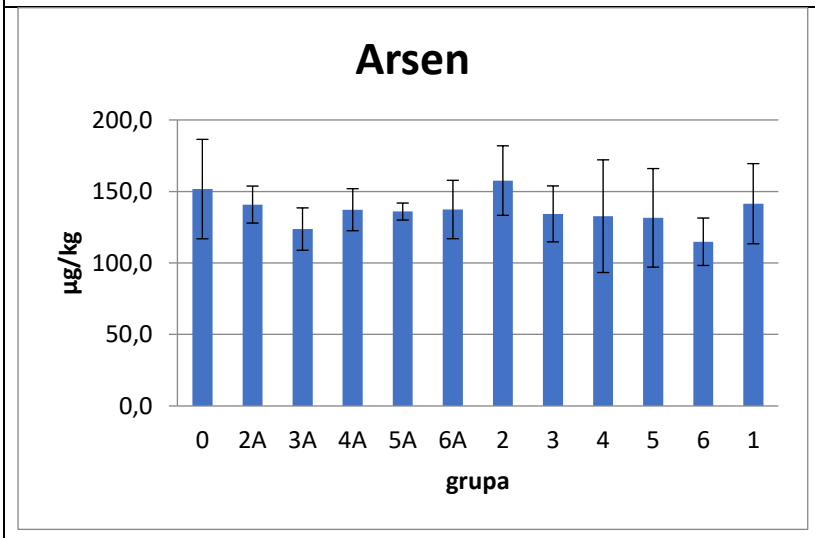
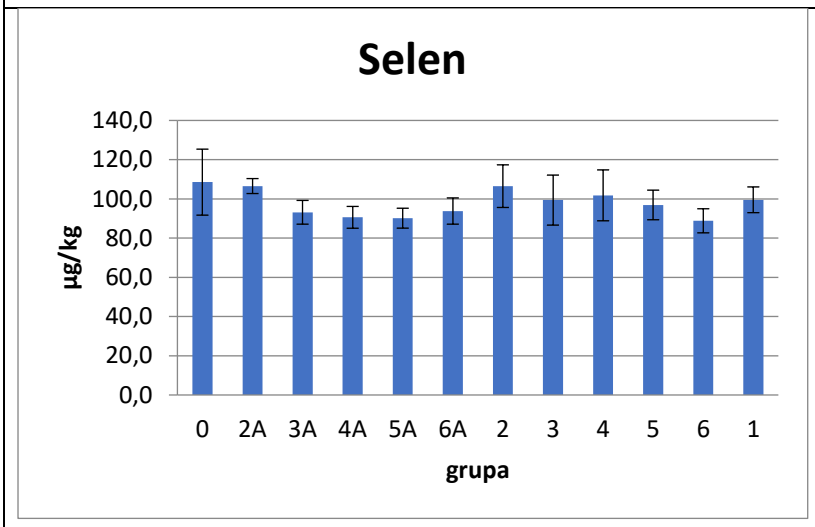
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0 MT(p)=0,0008 Post hoc analiza=2A-5A,2A-6A,3A-2,5A-2,6A-2,4A-2
	KW(p)=0 MT(p)=0,0008 Post hoc analiza=0-1,0-6

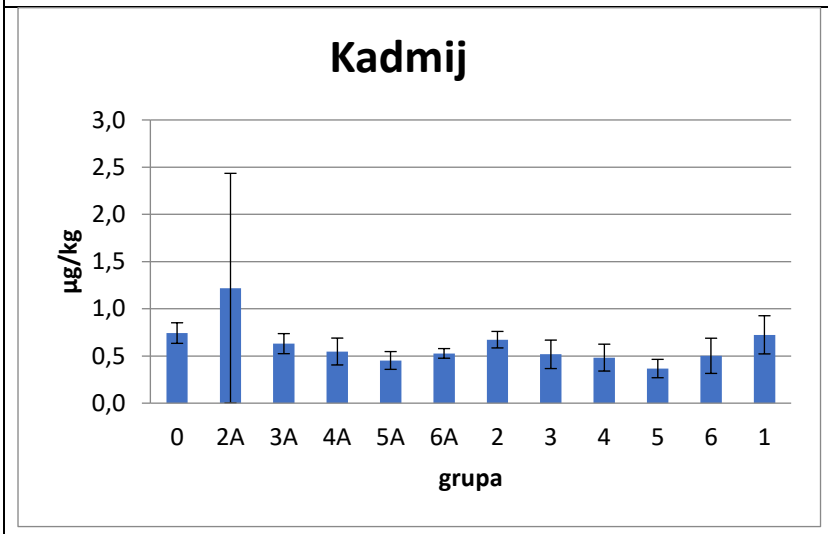
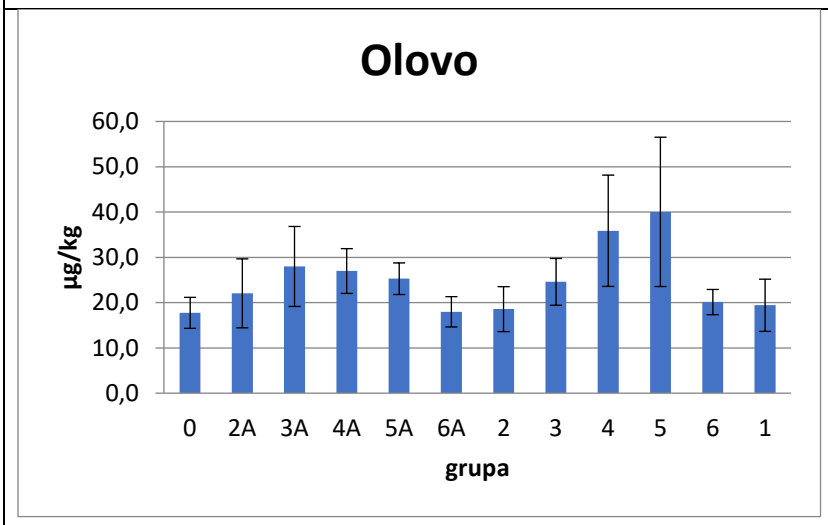
Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0 MT(p)=0,0001 Post hoc analiza=0-1,1-2A,1-3A,1-4A,1-5A
	KW(p)=0,0014 MT(p)=0,0403 Post hoc analiza=2-4A Tukeys HSD post hoc test=0-4A,4A-2,5A-2,5-2,2-6

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0002 MT(p)=0,0003 Post hoc analiza=1-3A,1-4A,1-5A Tukeys HSD post hoc analiza=0-1,0-2A,1-3A,4A-6,1-4A,5A-6,1-5A,1-6A,1-2,1-3,1-4
	KW(p)=0,1963 MT(p)=0,4556

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0035 MT(p)=0,0589 Post hoc analiza=1-4A,1-5A Tukeys post hoc test=1-3A,1-4A,1-5A,1-4
	KW(p)=0,001 MT(p)=0,0006 Post hoc analiza=1-4A,1-5A Tukeys HSD post hoc test=1-0,1-3A,1-4A,1-5

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,0094 MT(p)=0,0545 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=1-6A,3-6A,1-2A,3-2A Tukeys HSD post hoc test=1-6A
	KW(p)=0,0014 MT(p)=0,0149 Post hoc analiza=0-5,0-1 Tukeys post hoc test=0-3A,0-6A,0-5,0-6,0-1,2-6A,2-5,1-2

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički test
	KW(p)=0,4569 MT(p)=0,8316
	KW(p)=0,0252 MT(p)=0,1416 Post hoc analiza=nema razlike

Ovisnost koncentracije o grupama	Statistički testovi
	KW(p)=0,0018 MT(p)=0,0134 Post hoc analiza=0-5
	KW(p)=0,0007 MT(p)=0,0026 Post hoc analiza=nema razlike MW-U test=5-6A,5-2,4-6A,4-2,5-0,5-1,5-6,4-0,4-1,4-6

c) Popis kratica:

AAS-GF- atomska apsorpcijska spektroskopija s grafitnom tehnikom (engl. Atomic apsorption spectroscopy with grafit furnace)

$AlCl_3$- aluminijev klorid

ALT- alanin aminotransferaza

AST- aspartat aminotransferaza

ATR- atenuirana totalna refleksija

BET- Bruneuer-Emmet-Teller

Cu-Zn SOD- bakar-cink superoksid dismutaza

CYP450- citokrom P450

cDNA- komplementarna (engl. copy) DNA

DAPAL- 3,4-dihidroksifenilacetaldehid

DLS- dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. Dynamic Light Scattering)

DOPAL- 3,4-dihidroksifenilglikolaldehid

EDS- elektronska disperzijska spektroskopija (engl. Electronic Dispersive Spectroscopy)

GSH-Px- glutation peroksidaza (engl. glutathione peroxidase)

ICP-MS- Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (engl. Inductive Coupled Plasma – Mass spectrometry)

IL-1- interleukin-1

IL-6- interleukin-6

JNK- Janus kinaza

K_{eff}- efektivna konstanta ravnoteže

KBr- kalijev bromid

KW-Kruskal-Wallis

MALDI- matricom potpomognuta ionizacija s laserskom desorpcijom (engl. Matrix assisted laser desorption/ionization)

miRNA-146a – mikroRNA-146a

MT- engl. Median Test

NF-kB- nuklearni faktor-kapa B

NK- prirodnoubojička stanica (engl. Natural killer)

p38MAPK- p38 Mitogen aktivirajuća protein kinaza

PMA- dvostrukoaktivirani klinoptilolit

PMAO2- dvostrukoaktivirani oksigenirani klinoptilolit

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)

RIS- engl. relative integrative score

ROS- reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive oxygen species)

rpm- okretaja u minuti (engl. revolutions per minute)

SEM- skenirajuća elektronska mikroskopija

SOD- superoksid dismutaza (engl. superoxide dismutase)

TMAZ- jednostrukoaktivirani klinoptilolit

TNF-α- čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. Tumour necrosis factor-α)

TOF- vrijeme leta (engl. Time of flight)

XPS- rentgenska fotoelektronska spektroskopija (engl. X-ray photoelectron spectroscopy)