

# Adsorpcija glukoze na površini zeolita klinoptilolita u vodi i modelnim otopinama želuca i crijeva in vitro i in vivo

---

Markoska, Rumenka

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:601193>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)





SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Rumenka Markoska

**ADSORPCIJA GLUKOZE NA POVRŠINI  
ZEOLITA KLINOPTILOLITA U VODI I  
MODELNIM OTOPINAMA ŽELUCA I  
CRIJEVA *IN VITRO* I *IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Ko-mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Rumenka Markoska

**ADSORPTION OF GLUCOSE ON THE  
ZEOLITE CLINOPTILOLITE SURFACE IN  
WATER AND MODEL STOMACH AND  
GUT SOLUTIONS  
*IN VITRO AND IN VIVO***

Ph.D. Thesis

Mentor: Full professor Sandra Kraljević Pavelić

Co-mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

Rijeka, 2024.

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Ko-mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. Ivana Ratkaj

2. Izv. prof. Aleksandar Bulog

3. Dr. sc. Tihomir Balog, znanstveni savjetnik, naslovni prof.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Krešimiru Paveliću koji mi je pružio mogućnost da istražujem zeolite, te tijekom istraživanja pomagao sa svojim iskustvom i znanjem.

Mojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić zahvaljujem na izuzetnoj podršci koju mi je dala tijekom mojeg doktorskog studija. Osobito joj se zahvaljujem za neizmjernu pomoć u kreiranju pokusa, vođenju istraživanja, prezentiranju rezultata i ljubavi prema znanosti. Naučila me da nikada ne odustajem, bez obzira na teškoće i probleme koji naiđu na putu ka ostvarenju željenog cilja.

Zahvaljujem se mojem komentoru prof. dr. sc. Deanu Markoviću na podršci, razumijevanju i pomoći u dizajnu pokusa za utvrđivanje adsorpcije D-glukoze na površinu zeolita.

Zahvaljujem Marku Filipoviću koji mi je uvijek spremno, kolegijalno i stručno pomagao u pripremi uzoraka za pokuse.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivni Kavre Piltaver i prof. dr. sc. Ivani Jelovica Badovinac s Fakulteta za fiziku Sveučilišta u Rijeci koje su omogućile i napravile snimanja zeolitnih uzoraka u vodi na elektronskom mikroskopu (SEM i EDS mjerenja).

Zahvaljujem dr. sc. Mladenki Jurin s IRB-Zagreb koja je mi je pomogla provesti analize UHPLC.

Zahvaljujem se dr. sc. Vedrani Špadi na pomoći oko uzoraka zeolita u pokusima vezanja D-glukoze na površinu zeolitnih materijala u modelnim otopinama želucai crijeva.

Zahvaljujem se dr. sc. Ranku Stojkoviću s IRB-Zagreb koji je pomagao u dizajniranju i realizaciji *in vivo* pokusa.

Zahvaljujem se i voditeljima u Institutu za istraživanje materijala METRIS, Pula i IRB, Zagreb za ljubaznu dozvolu i pristup dijelu opreme korištene za izradu ovog doktorata.

Zahvaljujem se mom suprugu i mojoj djeci koji su mi dali neizmjernu podršku, pružili razumijevanje i ljubav tijekom doktorskog studija.

Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način pomogli da realiziram ovaj doktorski rad.

## SAŽETAK

Zeoliti su prirodni ili sintetski alumosilikatni minerali porozne strukture. Pore su međusobno povezane kanalima u kojima su smješteni hidratizirani kationi te molekule vode. Primarna ili osnovna građevna jedinica zeolita je tetraedar  $TO_4$  gdje je T oznaka za četverovalentni silicij (Si(IV)) ili trovalentni aluminij (Al(III)) pri čemu su kod različitih zeolitnih materijala omjeri Al(III) naspram Si(IV) različiti. Ovi se elementi u prostoru povezuju preko zajedničkih atoma kisika (O) gradeći sekundarne poliedarske jedinice čijim povezivanjem nastaje kristalna rešetka. Upravo je ova rešetka odgovorna za glavno svojstvo zeolita, ionsku izmjenu kationa iz šupljina s kationima iz okoline. Drugo važno svojstvo zeolita je svojstvo adsorpcije organskih molekula na površinu zeolita. U medicinske je svrhe do sada korišten netoksični prirodni zeolitni materijal klinoptilolit. U ovom su se doktorskom radu za istraživanje koristili različito mikronizirani klinoptilolitni materijali: TMAZ (tribomehanički aktivirani klinoptilolit), PMA (dvostruko tribomehanički aktivirani zeolit) i PMAO<sub>2</sub> (dvostruko tribomehanički aktivirani zeolit obogaćen medicinskim kisikom), te kao kontrolni spoj korišten je sintetski Zeolit A. Za navedene je materijale je u prvom dijelu istraživanja utvrđen omjer Si/Al u vodi i modelnim otopinama želucai crijeva. Nakon inkubacije u vodi ili modelnim otopinama u trajanju 24 h, izdvojene su frakcije centrifugiranjem pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm. Supernatanti svake frakcije analizirani su uz pomoć elektronskog mikroskopa (skenirajući elektronski mikroskop, SEM) i elektronske disperzijske spektroskopije (EDS). Oblik čestica supernatanta zeolitnog materijala i omjer Si/Al uspoređen je sa zeolitnim materijalima u krutom stanju. U drugom dijelu istraživanja, istražen je i kvantificiran postotak interakcije ili adsorpcije D-glukoze na površinu zeolitnih materijala uz pomoć elektronske mikroskopije SEM u kombinaciji s elementnom analizom EDS te kvantitativne metode tekućinske kromatografije ultravisoke razlučivosti (UHPLC). Adsorptivna svojstva šećera validirana su na zdravim miševima *in vivo* za zeolit PMA koji je pokazao najbolja svojstva interakcije s D-glukozom *in vitro* pri čemu su rezultati ukazali na smanjenje razina glukoze u krvi u kod miševa pred tretiranih sa zeolitom PMA. Dobiveni rezultati pokazuju potencijal korištenja zeolitnih materijala u patološkim stanjima poput metaboličkog sindroma ili dijabetesa što bi trebalo dodatno istražiti.

**Ključne riječi:** klinoptilolit, PMA-zeolit, Si/Al, svojstva vezivanja šećera, D-glukoza, adsorpcija, miš

## ABSTRACT

Zeolites are natural or synthetic aluminosilicate minerals with a porous structure. The pores are interconnected by channels in which hydrated cations and water molecules reside. The primary or basic building block of zeolite is the TO<sub>4</sub> tetrahedron where T stays for tetravalent (Si(IV)) or trivalent aluminum (Al(III)), where the ratios of Al(III) to Si(IV) are different in different zeolite materials. These elements are connected through common oxygen atoms (O) and build secondary polyhedral units, the connection of which creates a crystal lattice. It is this lattice that is responsible for the main property of zeolite, the ion exchange of cations from the cavity with cations from the environment. Another important property of zeolite is adsorption of organic molecules on the surface of zeolite. So far, the non-toxic natural zeolite material clinoptilolite is used for medical purposes. In this doctoral thesis, differently micronized clinoptilolite materials were studied: TMAZ (tribomechanically activated clinoptilolite), PMA (double tribomechanically activated zeolite) and PMAO<sub>2</sub> (double tribomechanically activated zeolite enriched with medical oxygen), and synthetic zeolite was used as a control compound A. In the first part of the research, the Si/Al ratio in water and model solutions of the stomach and intestines was determined for the mentioned materials. After incubation in water or model solutions for 24 h, fractions were separated by centrifugation at 4000 rpm, 14000 rpm and 140000 rpm. The supernatants of each fraction were analyzed using electron microscope (scanning electron microscope, SEM) and electron dispersion spectroscopy (EDS). The particle shape of the zeolite material supernatant and the Si/Al ratio were consistent with the zeolite materials in the solid state. In the second part of research, the percentage of interaction or adsorption of D-glucose on the surface was investigated with SEM in combination with EDS and quantified with ultra-high resolution liquid chromatography (UHPLC). The adsorptive properties for D-glucose were validated on healthy mice *in vivo* for the zeolite PMA, which showed the best properties of interaction with D-glucose *in vitro*. The results indicated a decrease in blood glucose levels in mice pretreated with zeolite PMA. The obtained results show the potential of using zeolite materials in pathological conditions such as metabolic syndrome or diabetes, which should be further investigated.

**Key words:** clinoptilolite, PMA-zeolite, Si/Al, sugar binding properties, D-glucose, adsorption, mouse



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Zeoliti i njihova struktura .....	1
1.1.1. Heulandit i klinoptilolit .....	1
1.1.2. Sintetski zeolit A .....	10
1.1.3. Fizikalno-kemijska svojstva klinoptilolita .....	11
1.1.4. Industrijska aplikacija klinoptilolita .....	12
1.1.5. Medicinske aplikacije klinoptilolita .....	13
1.2. Metabolički poremećaji i šećerna bolest.....	16
1.2.1. Medicinski pripravci i dodaci prehrani za kontrolu razine glukoze u krvi ..	19
1.2.2. Zeoliti kao oralni medicinski pripravci .....	24
1.2.3. <i>In vivo</i> modeli za istraživanje bioloških učinaka medicinskih proizvoda	25
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	29
3. MATERIJALI I METODE.....	30
3.1. Materijali.....	30
3.1.1. Zeolitni materijali.....	30
3.1.2. Priprema suspenzija i otopina.....	31
3.2. Metode .....	31
3.2.1. Analiza površine skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i energijom disperzivne rendgenske spektroskopije (EDS).....	31
3.2.2. Analiza tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti (UHPLC) .....	32
3.2.3. Mjerenje razina D-glukoze <i>in vivo</i> .....	32
3.2.4. Statistička analiza <i>in vivo</i> studija .....	33
3.2.5. Mjerenje pH vrijednosti suspenzija zeolita u mQ vodi i modelnim otopinama želudca crijeva s dodatkom D-glukoze .....	34
4. REZULTATI .....	35
4.1. pH vrijednosti suspenzija zeolita u mQ H <sub>2</sub> O i otopini D-glukoze .....	35
4.2. Analiza površine sintetskog zeolita A i prirodnog zeolita klinoptilolita TMAZ, PMA i PMAO <sub>2</sub> uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS .....	39
4.2.1. Površina sintetskog zeolita A i prirodnog zeolita klinoptilolita u obliku TMAZ, PMA i PMAO <sub>2</sub> uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS u vodi.....	39

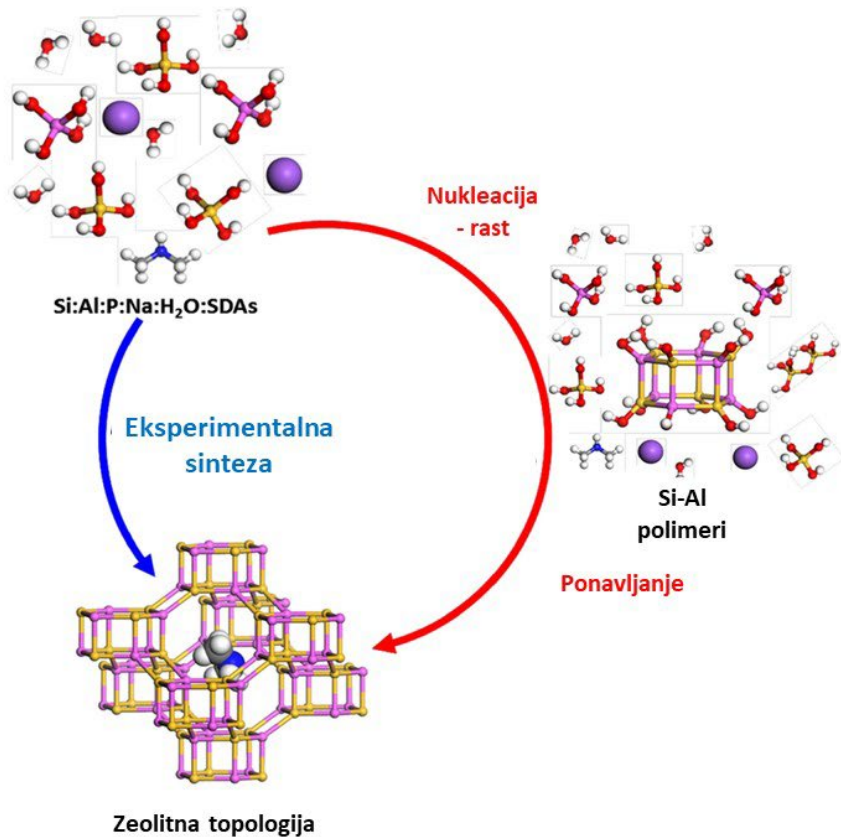
4.2.2. Analiza površine testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u otopini D-glukoze uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS.....	50
4.2.3. Analiza površine testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnim otopinama želucai crijeva uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS .....	57
4.3. Kvantifikacija interakcije i/ili vezanja D-glukoze na površinu sintetskog ZA i klinoptilolitne zeolite TMAZ, PMA i PMAO2 uz pomoć tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti (UHPLC).....	64
4.4. <i>In vivo</i> studija na miševima .....	69
4.4.1. Oralni test razina D-glukoze u krvi u miševa tretiranih s PMA i D-glukozom te predtretiranih s PMA i naknadno tretiranih s D-glukozom .....	69
5. RASPRAVA .....	74
6. ZAKLJUČCI .....	79
7. LITERATURA .....	80
8. POPIS TABLICA.....	92
9. POPIS SHEMA .....	94
10. POPIS SLIKA .....	94
11. ŽIVOTOPIS .....	98

## 1. UVOD

### 1.1. Zeoliti i njihova struktura

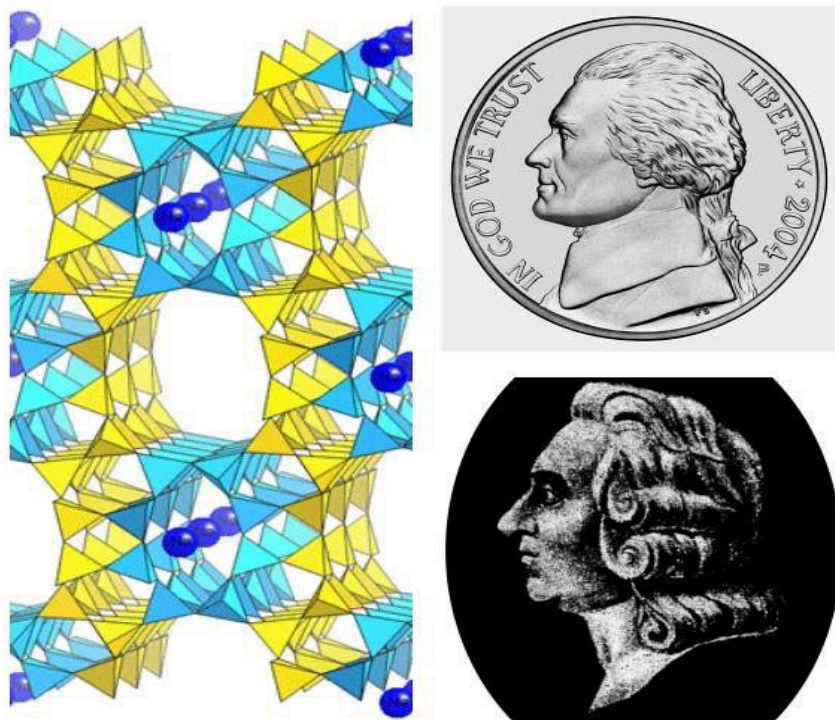
#### 1.1.1. Heulandit i klinoptilolit

Zeoliti su skupina prirodnih minerala. Najčešće se nalaze u vulkanskim sedimentnim stijenama, slanim alkalnim jezerima i tlima, dubokim morskim sedimentima i hidrotermalnim sustavima. Nastali su u složenim procesima vulkanske lave, pepela i vode pod djelovanjem tlaka i temperature. (Hay et al., 2001; Langella et al., 2001; Sheppard et al., 2001; Ming et al., 2001.) Zeoliti su minerali porozne strukture pri čemu su pore međusobno povezane kanalima u kojima su smješteni hidratizirani kationi (primjerice  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ) te molekule vode. Primarna ili osnovna građevna jedinica zeolita je tetraedar  $TO_4$  gdje je T oznaka za četverovalentni silicij (Si (IV)) ili trovalentni aluminij (Al) (III) pri čemu su kod različitih zeolitnih materijala omjeri Al (III) naspram Si (IV) različiti. Ovi se elementi u prostoru povezuju preko zajedničkih atoma kisika (O) gradeći dvodimenzionalne i trodimenzionalne sekundarne strukturne mrežaste jedinice sa šupljinama i kanalima (slika 1). Kristalna rešetka zeolita je negativno nabijena što je posljedica izomorfne zamjene četverovalentnog silicija s trovalentnim aluminijem. Kationi smješteni u porama su upravo bitni za neutralizaciju negativnog naboja u  $AlO_4$  tetraedru i stabilnost strukture.



**Slika 1.** Nastajanje zeolitne strukture. (Liu., 2021.)

Povijest intenzivnog istraživanja zeolita počinje 1756. godine kada je švedski mineralog i kemičar Freiherr Axel Frederick Cronstedt (slika 2), zagrijavao prirodni zeolitni mineral stilbit koji je na visokim temperaturama bubrio. Dao mu je ime ZEOLIT, što dolazi od grčkih riječi (*zein* - vriti ili kipjeti i *lithos* - stijena). (Breck., 1964; Masters i Maschmeyer., 2011.)


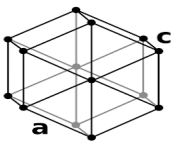

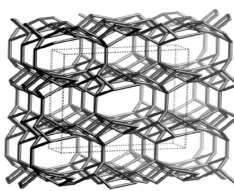

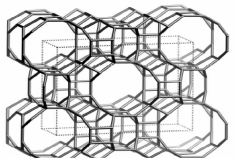

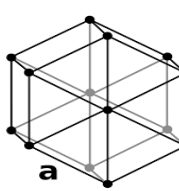

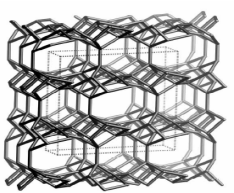


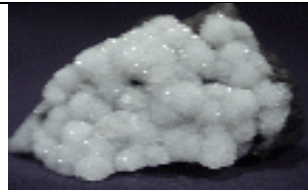
**Slika 2.** Freiherr Axel Frederick Cronstedt (1722-1765) (desno) i zeolitna struktura (lijevo). Preuzeto s web stranice:

<https://www.flickr.com/photos/108033873@N02/16083401351>, 8. siječanj 2024.

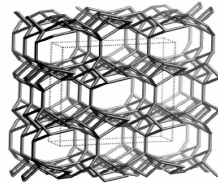
Razvojem civilizacije i paralelno industrijalizacije krajem 19-tog. i početkom 20-tog. stoljeća, početkom proizvodnje električne energije iz nuklearnih elektrana, pojavio se veliki interes za zeolite. Razlog tomu je sposobnost zeolitnih materijala da vežu radionuklide, ne samo onih prirodnih već i onih sintetskih. Do danas je otkriveno oko 40 vrsta prirodnih zeolita, a opisano je preko 200 različitih strukturnih vrsta zeolita. Strukture zeolita mogu se pronaći u bazi podataka Međunarodne udruge zeolita (IZA) i klasificirane su u Atlasu zeolitnih konstrukcija, izdanom od iste udruge. (Baerlocher et al., 2007.) U atlasu zeolitnih konstrukcija pokazan je prirodni oblik zeolita njegova kristalna struktura, te kemijska formula zeolita. Najzastupljeniji u prirodi su zeoliti kabazit, klinoptilolit, mordenit, erionit, heulandit i filipsit (tablica 1) (Rožić et al., 2004.). Opća formula prirodnih zeolita je  $M_{2/n} \times Al_2O_3 \times xSiO_2 \times yH_2O$  gdje je M oznaka za kation izvan osnovne tetraedarske strukture, a n je valencija kationa. (Bogdanov et al., 2009.) Upravo je porozna struktura zeolita osnova njihove široke industrijske i medicinske primijene. Alkalijski se i zemnoalkalijski kationi u porama ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , te  $Zn^{+2}$  itd.) pa i molekule  $H_2O$ , lako izmjenjuju ionskom izmjenom s drugim molekulama i kationima iz okoline. Logično je onda da konačni omjer Si/Al u zeolitu određuje kapacitet ionske izmjene i privlačnost kationa koji se nalaze unutar pora i kanala. (Mumpton., 1999.)

**Tablica 1.** Bruto kemijske formule i strukturna svojstva odabranih prirodnih zeolita (Margeta et al., 2013.)

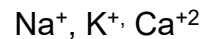
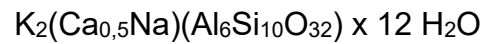
Zeolit	Kristalni sustav Struktura	Bruto formula jedinične ćelije i Izmjenjivi kationi
 Kabazit (CHA)	 Heksagonalna	$\text{Ca}_2(\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{24}) \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Na}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{K}^+$
 Klinoptilolit (CLI)	 Monoklinska	$(\text{Na},\text{K})_6(\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}) \times 24 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Na}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{K}^+, \text{Sr}^{+2}, \text{Ba}^{+2}$
 Mordenit (MOR)	 Ortorombska	$\text{Na}_3\text{KCa}_2(\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}) \times 28 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Na}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{K}^+$
 Erionit (ERI)	 Heksagonalna	$\text{NaK}_2\text{MgCa}_{1,5}(\text{Al}_8\text{Si}_{28}\text{O}_{72}) \times 28 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{Mg}^{+2}$
 Heulandit (HEU)	 Monoklinska	$(\text{Na},\text{K})\text{Ca}_4(\text{Al}_9\text{Si}_{27}\text{O}_{72}) \times 24 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Na}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{K}^+, \text{Sr}^{+2}, \text{Ba}^{+2}$



Filipsit (PHI)



Monoklinska



Mineralni sklopovi najčešćih pojava zeolita u prirodi su stijene koje sadrže klinoptilolit i mordenit, u kojima je udio zeolitnog klinoptilolita i mordenita visok (80% i više). Zeoliti u stijenama mogu doći uz ostale minerale npr. aluminij filosilikatnom glinom smektit (bentonit) i pratećim fazama u manjim postocima kristobalit, kalcit, feldspat i kvarc. (Kraljević et al., 2018.) Klinoptilolit je strukturno sličan heulanditu i spada u istu grupu heulanditnih zeolita (HEU) ali se od njega razlikuje po većem omjeru silicija i aluminija u korist silicija, gdje je  $Si/Al > 4,0$  i  $(Na + K) > (Ca + Sr + Ba)$ . Heulandit je prvi put dobio ime 1822. godine po engleskom sakupljaču minerala J. H. Heulandu. (Dana., 1914.) To je makroskopski (0,2 - 2 cm) kristal, sa monoklinskom kristalnom strukturom koji zagrijavanjem mijenja svoje optičke osobine. (Slawson., 1925.) Klinoptilolit isto tako ima monoklinsku kristalnu strukturu ali je mikroskopski (2 - 20  $\mu m$ ) kristal, koji je za razliku od heulandita, stabilniji na zagrijavanje. Iako je klinoptilolit danas poznat kao najčešći prirodni zeolit koji se javlja u velikim količinama pa i milijunima tona u izmijenjenim vulkanskim i slanim, alkalno-jezerskim naslagama, klinoptilolit se opisuje kao posebna mineralna vrsta tek od 1932 godine.

Do tada se svrstavao kao mordenit. (Schaller., 1932.) Hey i Bannister (1934) zaključili su da je klinoptilolit jednostavno heulandit bogat silicijevim dioksidom. Kemijski sastav ovih vrlo sličnih minerala je:  $(Na,K) Ca_4 (Al_9Si_{27}O_{72}) \times 24 H_2O$  (heulandit;  $Si/Al = 3$ ) i  $(Na,K)_6 (Al_6Si_{30}O_{72}) \times 24 H_2O$  (klinoptilolit;  $Si/Al = 5$ ), gdje se vidi da u kemijskom sastavu zeolita klinoptilolita ima više silicija u odnosu na aluminij (omjer  $Si/Al = 5$ ), dok kod heulandita ima manje silicija (omjer  $Si/Al = 3$ ). (Mumpton., 1960.)

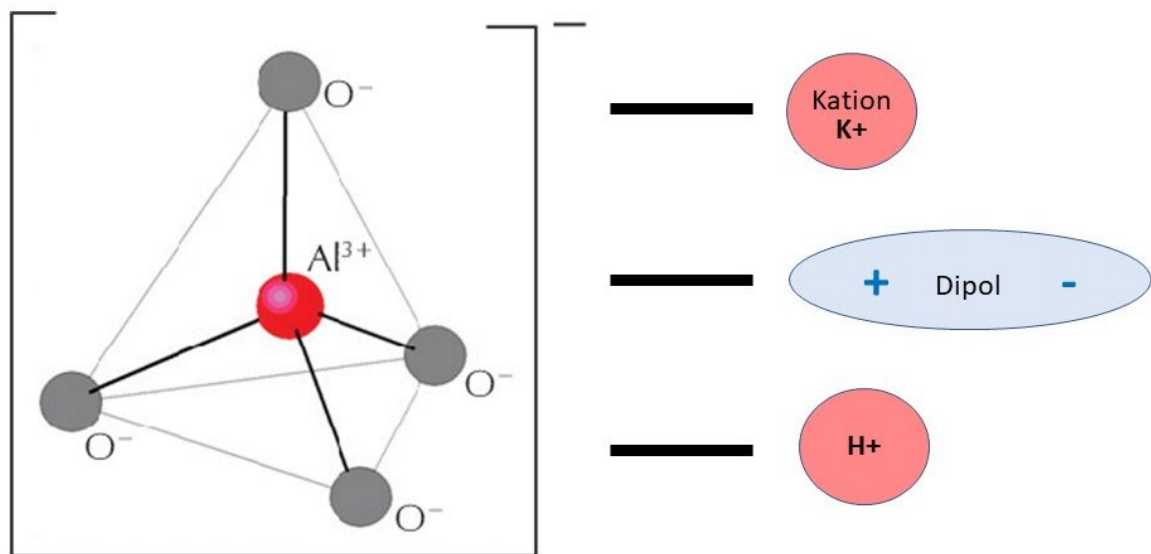
Prirodni zeolit klinoptilolit u potpunosti je netoksičan za ljude i životinje. (Mumpton., 1999.) Kationi u strukturi zeolita klinoptilolita su lako pokretljivi mogu se izmjenjivati s kationima iz okoline, a struktura alumosilikatne mreže klinoptilolita je pri tome stabilna, što je osnova za razlikovanje heulandita od klinoptilolita. (Boles., 1972.) Heulanditi i klinoptiloliti se dijele u tri skupine na temelju njihove toplinske stabilnosti. Heulanditi tipa 1 definiraju se kao minerali koji se transformiraju u takozvanu B fazu (amorfnu) tijekom zagrijavanja i čija je struktura potpuno uništena nakon zagrijavanja na 450 °C. Heulanditi tipa 2 mogu se, ali i ne moraju, transformirati u B fazu, a podvrgavaju se samo djelomičnom uništavanju na 450 °C. Heulanditi tipa 3 ili klinoptiloliti se ne pretvaraju u B fazu i stabilni su obično do ~ 650 °C. (Mumpton., 1960.; Alietti., 1972.)

Primarna građevna jedinica klinoptilolita (PBU) (eng. *primar building units*) je tetraedar  $[SiO_4]$  i  $[AlO_4]^-$  u čijem su središtu smješteni kationi  $Si^{+4}$  ili  $Al^{+3}$  dok se u kutovima tog tetraedra nalaze atomi kisika. (slika 3a) Ove jedinice se u prostoru povezuju preko zajedničkih atoma kisika (slika 3b) gradeći sekundarne građevne jedinice (SBU) (eng.

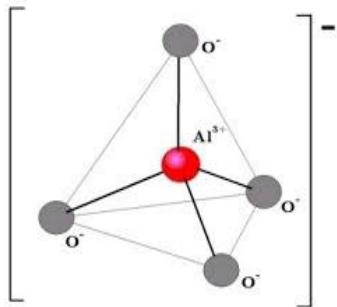
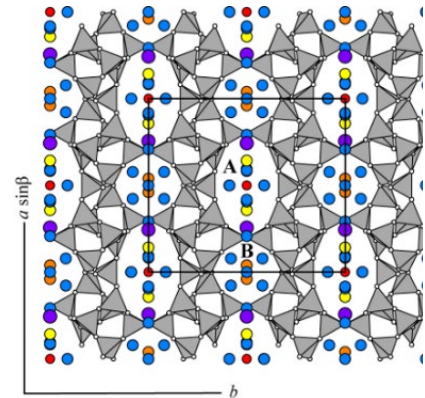
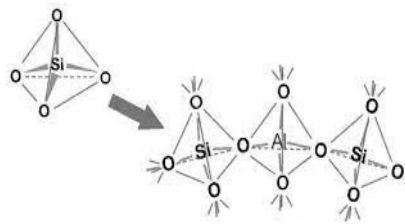
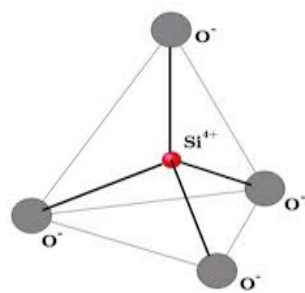
*secundar building units*). Od ove poliedarske jedinice međusobnim povezivanjem nastaje kristalna (alumosilikatna) rešetka klinoptilolita (slika 3c). Stoga, klinoptilolit ima tetraedre aluminijske koji su ukupno jednostruko negativno nabijeni za razliku od tetraedra silicijevih koji su ukupno neutralnog naboja što je važno za nespecifična adsorptivna svojstva zeolita stvaranjem ionske veze ili vodikove veze. (Manda et al., 2024.; Sprynskyy et al., 2008.) Stvaranje ionske veze odvija se između negativno nabijenih aluminijskih tetraedara sa kationima iz okoline. Također, moguća je ionska veza aluminijskog tetraedra sa molekulama koje imaju dipolni moment, primjerice onih koje imaju hidroskilne skupine (OH) poput D-glukoze. U reakcijama klinoptilolita s okolinom važne su i dipol-dipol interakcije u vodi, pri čemu se takve interakcije stvaraju između OH skupina i karbonilnih (COH) skupina određenih molekula, poput molekula D-glukoze. OH skupine na površini klinoptilolita nastaju vezanjem molekula vode preko vodika na O<sup>-</sup> tetraedarske strukture površine materijala. Naposljetku, interakcija dipol-inducirani dipol mogu se stvoriti između OH površine klinoptilolita u vodi i OH skupine iz molekule u okolini, poput primjerice D-glukoze (shema 1). OH skupine površine klinoptilolita mogu stvoriti i vodikove veze sa OH skupinom iz druge molekule, poput primjerice D-glukoze.

Osim ovih jakih privlačnih sila koje nastaju interakcijom aluminijskih tetraedara s molekulama iz okoline, adsorpcija molekula na površinu klinoptilolita moguća je i stvaranjem slabih Van der Waalsovih sila u kojima mogu sudjelovati i silicijevi tetraedri. Naposljetku, adsorpcija na klinoptilolit može se odvijati i vrlo specifičnim interakcijama s određenim molekulama što uključuje stvaranje lokalnih kemijskih veza različitog intenziteta što rezultira stvaranjem različitih supramolekularnih struktura. (Tabacchi., 2018.)





**Shema 1.** Stvaranje ionske veze između negativno nabijenog tetraedra aluminija na površini zeolita klinoptilolita. Ionska veza može nastati u interakciji sa kationom bilo kojeg metala, molekulama s dipolnim momentom te vodikovim kationom.



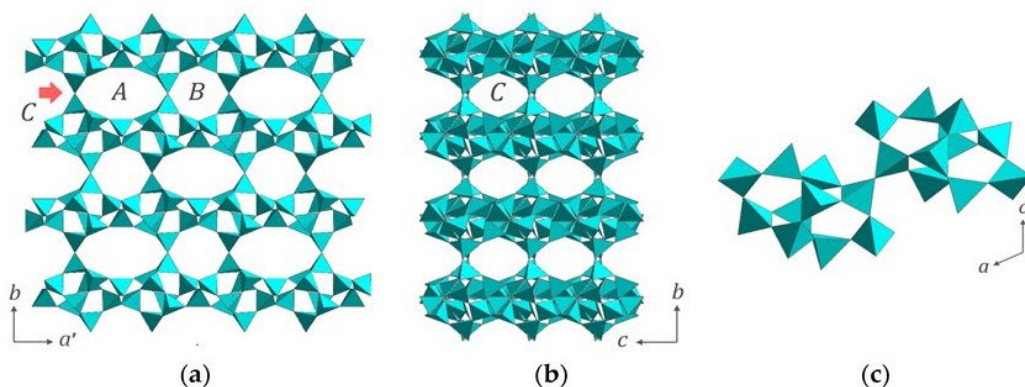
a)  
Tetraedarske jedinice

b)  
Poliedarske jedinice

c)  
Kristalna (alumosilikatna)  
rešetka klinoptilolita  
(preuzeto s web stranice  
IZA <http://www.iza-online.org/natural/Datasheets/Clinoptilolite/clinoptilolite.htm> )

**Slika 3.** Prikaz formiranja kristalne (alumosilikatne) rešetke klinoptilolita.

Kristalna struktura klinoptilolita ima tri vrste kanala. Kanal A sastavljen od 10-članih prstena međusobno povezanih tetraedrom silicija i aluminija, kanal B sastavljen od 8-članog prstena međusobno povezanih tetraedrom silicija koji su paralelni (uzduž osi c) i kanal C sastavljen od osmeročlanog prstena tetraedra silicija i aluminija koji je okomit na kanale A i B (uzduž osi a). Model sustava kanala u jediničnoj stanici kristalne strukture, kao i vrsta i položaja kanala i šupljina prikazana je na slici 4.



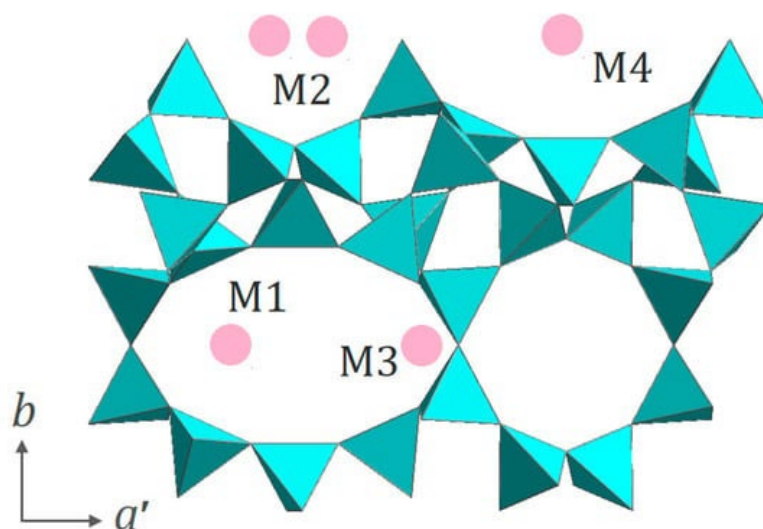
**Slika 4.** Vrsta i položaj kanala i šupljina u strukturi klinoptilolita (Rodríguez et al., 2022)

U kanalima su smješteni hidratizirani kationi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , te molekule vode. (Ackley i Yang., 1991.) Odnos Si/Al je uvijek  $\geq 1$ . U alumosilikatnoj rešetki se nikad ne formiraju Al - O - Al veze. (Lonwenstein., 1954.) U ovisnosti od molarnog odnosa Si/Al zeoliti se dijele na:

1. Zeolite s malim sadržajem silicija, odnosno velikim sadržajem aluminija: sintetski zeoliti A i X (Si/Al = 1 – 1,5)
2. Zeolite sa srednjim sadržajem silicija: prirodni zeoliti klinoptilolit, erionit, mordenit i sintetički zeoliti L i Y (Si/Al = 2 – 5)
3. Zeolite bogate silicijem: zeolit beta i ZSM-5 (Si/Al = 10 – 100)
4. Porozne silikate (Si/Al > 100)

Što je molarni odnos Si/Al manji, udio pokretljivih kationa, kao i hidrofilitnost zeolita su veći. (Flanigen et al., 2010.) Postoje modeli koji opisuju strukturu zeolita tipa HEU s obzirom na pozicije metalnih kationa u strukturi, a najčešće se koristi strukturni model prirodnog klinoptilolita koji su dali Koyama i Takeuchi. (Rodríguez et al., 2022.)

Kod ovog modela, kationi se smještaju izvan okvira na mjesta M1, M2, M3 i M4 u tri kanala A, B i C (slika 5). Tako npr. kationi  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  zauzimaju najčešće mjesto M1 u kanalu A, potom  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  mjesto M2 u B kanalu. Kation  $\text{K}^+$ ; nalazi se u C kanalu, na ulazu u A i vrlo blizu M1. M4 se nalazi u središtu kanala A, gdje se nalazi kation  $\text{Mg}^{2+}$ .

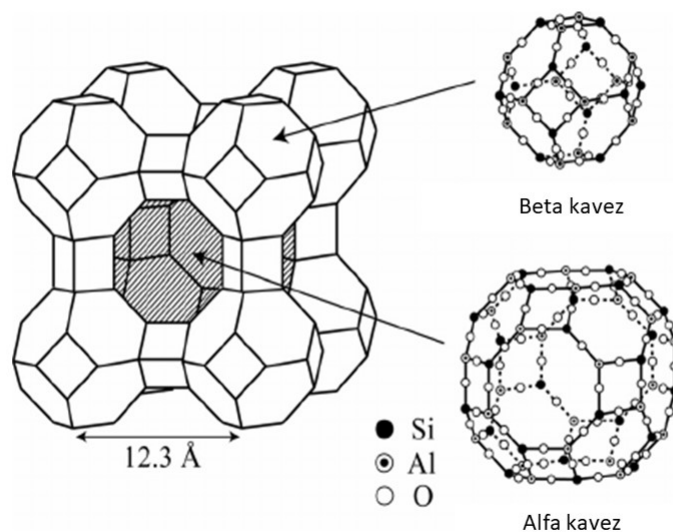


**Slika 5.** Kationska mjesta M1, M2, M3 i M4 u A i B kanalima klinoptilolita prema Koyama i Takeuchi modelu gledano duž [001] ( $a' = a \sin\beta$ ). Preuzeto iz (Rodríguez et al., 2022.)

### 1.1.2. Sintetski zeolit A

Prvi sintetski zeoliti su se pojavili 1948 godine zahvaljujući radu Barrera i Miltona, te su ovi porozni materijali zauzeli važno mjesto u industrijskim procesima koji su vezani uz katalitičke reakcije i procese. (Weitkamp., 2000.) Od 1950-te godine zbog povećane potrebe za pročišćavanjem vode iz nuklearnih centrala, a koja je kontaminirana s radionuklidima, povećao se interes i za zeolite. Do sredine pedesetih godina prošlog stoljeća sintetizirani su stoga zeoliti koji su danas komercijalno dostupni: A, X i Y. (Rožić et al., 2004.) Zeolit A (slika 6) je prvi zeolit sintetiziran pedesetih godina prošlog stoljeća. Kemijska formula sintetskog zeolita A, poznatog još i kao zeolit NaA ili zeolit 4A je  $\text{Na}_{12} [(\text{AlO}_2)_{12} (\text{SiO}_2)_{12}] \times 27\text{H}_2\text{O}$ .

Zeolit A se koristi u proizvodnji deterdženta za obradu tvrde vode. Također se koristi kao zamjena za natrijev tripolifosfat koji nije ekološki prihvatljiv. Nadalje, zeolit A ima veliki kapacitet ionske izmjene s prosječnom veličinom čestica u rasponu od 4 do 10  $\mu\text{m}$ , što sprječava prijenos boje rublja tijekom pranja. (Tessema et al., 2021.) Zeolit A ima najveći mogući sadržaj aluminija u tetraedarskoj strukturi, a odnos je  $\text{Si}/\text{Al} \approx 1$ .



**Slika 6.** Struktura sintetskog zeolita A. Zatvoreni krugovi, otvoreni krugovi i oni s točkama prikazuju atome Si, O i Al. ( Nakano i Nozue., 2007.)

### 1.1.3. Fizikalno-kemijska svojstva klinoptilolita

Zbog svoje specifične strukture zeoliti imaju posebne fizikalne osobine. U prirodi se nalaze u krutom stanju te imaju kristalnu strukturu koja varira od monoklinaste kristalne strukture do heksagonalne i ortogonalne. Prirodni zeolit klinoptilolit ima monoklinastu kristalnu strukturu (tablica 1). Specifično se adsorpcija i ionska izmjena mogu istaknuti kao posebno važna svojstva zeolita klinoptilolita. Adsorpcijska svojstva zeolita temelje se na teoriji strukture koja je u podlozi kiselih i lužnatih reakcija. Kisikov atom u strukturi zeolita je primjerice, proton akceptor te ima negativan naboj i predstavlja potencijalno adsorpcijsko mjesto za pozitivne ione ili polarne organske molekule. (Deka., 1998.) Svojstva zeolita za ionsku izmjenu temelje se na postojanju izmjenjivih kationa, što omogućuje njihovu pokretljivost u, ali i izvan zeolitne strukture te mogućnost zamjene s kationima iz otopine. Ionska izmjena na zeolitu je reverzibilan proces kod kojeg se kationi iz zeolita izmjenjuju s kationima iz otopine u stehiometrijskom odnosu. (Hendrichs., 2006.) Kapacitet izmjene je kvantitativno mjerilo sposobnosti izmjene iona te označava količinu koju izmjenjivač može izmijeniti po jedinici svoje mase ili volumena. (Inglezakis., 2005) Specifična površina zeolita je stoga vrlo velika i može iznositi do  $700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , dok ukupna zapremina pora iznosi od  $0,1$  do  $0,35 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Ionsko-izmjenjivački kapacitet zeolita ovisi o mnogim parametrima, a najvažniji su: struktura i kemijski sastav zeolita, električnog naboja i dimenzije kationa, temperature i pH otopine. (Godelitsas i Armbruster., 2003.) Selektivnost je također važno svojstvo zeolita pri čemu je opisano kako zeoliti vežu različite katione iz otopine različitom jačinom i afinitetom. Ovo svojstvo ovisi o vrsti

zeolita, prirodi izmjenjivih kationa (naboj, hidratizirani radijus, te koncentracija kationa), omjeru Si/Al u rešetci i temperaturi. Selektivnost kationskih izmjenjivača se povećava s porastom naboja kationa (elektroselektivnost):  $\text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Al}^{3+}$ , a opada s rastućim promjerom hidratiziranog iona. Zeoliti s većim Si/Al omjerima pokazuju veću selektivnost prema većim kationima, kao što su  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  i  $\text{K}^+$ , dok oni s manjim Si/Al omjerom imaju sklonost za pokretljivije, manje katione, poput  $\text{Li}^+$  i  $\text{Na}^+$ . (Hendrichs., 2006-) Ustanovljeno je da potrebno vrijeme kontakta otopine i zeolita za uspostavljanje ravnoteže iznosi 24 h – 48 h. Klinoptilolit pokazuje selektivnost prema kationima na slijedeći način:  $\text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Co}^{2+}$  (Blanchar et al., 1984.),  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cs}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$  (Zamzow et al., 1990.) i  $\text{Co}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ . (Erdem et al., 2004.)

#### 1.1.4. Industrijska aplikacija klinoptilolita

Na prijedlog kanadskog znanstvenika B.W. Mercera, 1970. počelo je pročišćavanje otpadnih voda sa zeolitom klinoptilolitom. (Mercer et al., 1970.) On je predložio sistem za pročišćavanje otpadnih voda sa međusobno povezanim kolonama punjenim klinoptilolitom. Dotadašnje konvencionalne smole koje su se koristile u tu svrhu su bile glomazne i neselektivne dok je klinoptilolit bio učinkovitiji. Ovaj novi postupak je uklanjao amonijak sa 97 %-tnom učinkovitošću. Prirodni zeoliti se učinkovito koriste za uklanjanje teških metala iz otpadnih voda, u metalnoj industriji, pri galvanizaciji, proizvodnji papira, grafičkoj industriji što se pokazalo znatno učinkovitijim u odnosu na dotadašnje procese pročišćavanja koji su bili skupi i neučinkovit. (Haggerty i Bowman., 1994.)

Suvremena sredstva za dekontaminaciju bojnih otrova također su najčešće zeoliti, s obzirom da zeoliti mogu uklanjati teške metale. (Satya et al., 2012.) Zeolit se danas naširoko koristi kao ionski izmjenjivač za pročišćavanje vode za piće te u odvajanju plinova uključujući vodenu paru, ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ) i sumpor(IV)-oksid ( $\text{SO}_2$ ) iz prirodnih i industrijskih procesa, ali isto tako i okside dušika, freona i formaldehida. Petrokemijska industrija koristi zeolite za pročišćavanje sirove nafte, te kao katalizator u proizvodnom procesu nafte. (Primo i Garcia., 2014.) U nuklearnoj industriji zeolit se koristi intenzivno, jer je u stanju ukloniti određene produkte iz nuklearnog otpada i pri tom ih trajno zarobiti u svoju strukturu. (Tušek et al., 2019.) Najistaknutija i najrasprostranjenija industrijska uporaba zeolita je u proizvodnji deterdženata za pranje rublja, opet na principu ionske izmjene, jer uklanjaju  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  iz vode i time mekšaju vodu. (Margeta et al., 2013) U poljoprivrednoj industriji koristi se kao dodatak zemlji za povećanje prinosa s obzirom da primjerice zeolit klinoptilolit u kontinuitetu ispušta  $\text{K}^+$  u tlo i s time omogućava trajnu koncentraciju kalija koji je neophodan za rast biljke. Istim mehanizmom regulira se i količina vode u tlu, te se sprečava sušenje biljaka. Obogaćen amonijakom, zeolit opskrbljuje biljku i s dušikom. U industriji za proizvodnju hrane za životinje, naročito peradi, koristi se kao dodatak prehrani. Poboljšava uzgoj, omogućava dobivanje kvalitetnijeg mesa i mlijeka, a koristi se i za smanjenje koncentracije amonijaka u štalama. (Tušek et al., 2019.)

### 1.1.5. Medicinske aplikacije klinoptilolita

Pozitivni učinak zeolita klinoptilolita na zdravlje i opći zdravstveni status dokazan je u brojnim znanstvenim radovima i studijama. To su najčešće detoksifikacijska svojstva, odstranjivanje teških metala, slobodnih radikala i pesticida (Kraljević Pavelić et al., 2017; Mastinu et al., 2019.). Dokazana su u nekim studijama i antikancerogena, antiviralna, antibakterijska, antioksidativna i imunološka svojstva, povoljni učinci na dijabetičare, pozitivno djelovanje na koštanu strukturu, na probavni sustav uključujući i dijareju, pozitivni učinak na paradentozu, bolesti kože i akne. (Auerbach et al., 2003; Pavelić et al., 2001; Pavelić et al., 2002; Neag et al., 2022.)

Važan je učinak zeolita klinoptilolita na eliminaciju teških metala jer oni djeluju detrimentalno na ljudsko zdravlje. Naime, akumulacija teških metala (Hg, Pb, Cd, As i dr.) u masnim stanicama, kostima, žlijezdama s unutrašnjim izlučivanjem ili u centralnom živčanom sustavu, često rezultira narušavanjem općeg zdravstvenog stanja. (Erdem et al., 2004.) Svjetska zdravstvena organizacija je izradila opširne studije koje su razmatrale učinke teških metala na zdravlje ljudi. Posljednje studije su pokazale da zeolit klinoptilolit ima značajnu sposobnost uklanjanja teških metala iz tijela putem procesa ionske izmjene. Pozitivni ioni metala unutar kristalne rešetke zeolita u procesu jonske izmjene zamjenjuju mjesta s pozitivno nabijenim toksinima (metalnim kationima) iz tijela, koji se onda čvrsto vežu unutar kristalne rešetke i zatim se kompletno izbacuju iz tijela. (Pabalan i Beretti, 2001; Rozić et al., 2002.) Zeolit klinoptilolit uklanja i amonijak iz tijela. (Burgess et al., 2004; Belcheva et al., 2012.) Također, uklanja iz tijela i neke toksine kao što su to primjerice fenoli, pesticidi i mikotoksini. (Khalid et al., 2004.) Klinoptilolit se može koristiti čak i kao pomoć za uklanjanje ksenoestrogenih molekula, plastike, pesticida i herbicida iz vode procesom adsorpcije. (Tahar et al., 2014.) Zeolit ima pozitivan učinak u nekih zloćudnih, infekcijskih i autoimunoloških bolesti. (Pavelić et al., 2001.)

Istraživanjem imunostimulativnog djelovanja zeolita, dokazano je da se on ponaša poput superantigena. Superantigeni mogu poboljšati ili umanjiti imunološke reakcije na veliki broj antigena, prisutnih u većini oboljenja, posebno kod autoimunih bolesti. Primjena klinoptilolita u konkretnom objavljenom slučaju korelira s remisijom karcinoma, tj. potpunim nestajanjem simptoma. (Žarković et al., 2003.) U skladu s tim možda se može koristiti i u prevenciji tumora, no to treba dodatno istražiti. Primjena zeolita kod oboljelih od malignih bolesti u relativno kratkom roku izaziva poboljšanje općeg stanja i povećanje tjelesne težine, te dolazi do ublažavanja simptoma bolesti. (Poljak-Blaži et al., 2001.) Struktura zeolita klinoptilolita poput kaveza i kisikovi atomi u strukturi koji imaju po jedan ne spareni elektron, privlače i deaktiviraju molekule slobodnih radikala, koje također imaju po jedan ne spareni elektron. Zbog toga zeolit klinoptilolit može smanjiti razine slobodnih radikala u krvi. Naime, pokazano je prethodno kako zeolit smanjuje razinu slobodnih radikala u krvi i njihov učinak na albumin u uvjetima *in vitro* (Pellegrino et al. 2011.) Primijećeno je također, da su

oboljeli od zloćudnih tumora koji su uzimali tribomehanički aktivirani zeolit (TMAZ), imali poboljšano opće zdravstveno stanje te im je poboljšan totalni antioksidativni status (TAS). (Ivković et al., 2004.)

Klinički je dokazano da zeolit klinoptilolit može djelovati poput antibiotika, odnosno da ima mikrobiološko djelovanje, jer veže bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. (Rivera-Garza et al., 2000; Uchida et al., 1992.) Zbog svoje strukture zeoliti vrlo vjerojatno vežu i pojedine virusne sastavnice unutar svojih pora ili na svoju površinu. Navedenim mehanizmom zeolit klinoptilolit zaustavlja razvoj mnogih virusnih infekcija uključujući *Herpes simplex 1 i 2*, *Herpes zoster*, *Coxsackievirus B-5*, adenoviruse, virus gripe, virusne prehlade, *hepatitis C*. (Grce i Pavelić., 2005.) Zeolit veže i neke od alergena i antigene koji uzrokuju alergije, astmu i autoimune bolesti kao što su multipla skleroza i reumatoidni artritis. (Andronikashvil., 2009.) Homeostaza je vrlo značajna za pravilno funkcioniranje organizma, a znači održavanje stabilnih unutarnjih uvjeta za ispravno funkcioniranje stanice ili živog bića u cjelini. Istraživanja su potvrdila opravdanost primjene zeolita kao podršku u uspostavljanju narušene homeostaze, te su dokazala da je zeolit značajan u stimulaciji i unapređenju regeneracije stanica. (Andronikashvili et al., 2009.)

**Učinak na neurodegenerativne bolesti.** Smatra se da je većina slučajeva Parkinsonove bolesti posljedica interakcije između genetskih i okolišnih čimbenika. Studije su pokazale da su osobe s Parkinsonovom bolešću izloženije pesticidima i štetnim kemikalijama od osoba koje to nisu bile. (Hancock et al., 2008.) Posebno su se isticali herbicidi i insekticidi, kao što su organokloridi i organofosfati. (Bhatt et al., 1999.) Znanstvena istraživanja i pojedine kliničke studije dokazale su da zeolit povoljno djeluje na funkcionalne poremećaje u neurodegenerativnih bolesnika (veća snaga, bolja koordinacija pokreta, brži oporavak mišića, optimiziranje rada krvotoka, bolje opće stanje). Primjena zeolita kod multiple skleroze rezultira poboljšanjem stanja, a posebno dobro reagiraju mladi pacijenti u ranijoj fazi bolesti. Kod terminalnih faza multiple skleroze gdje su razvijena žarišta u mozgu, rezultati su daleko skromniji. Povoljan učinak postiže se kod muskularnih distrofija, također u ranijoj fazi bolesti. Postoje istraživanja o opravdanosti primjene zeolita kod Alzheimerove bolesti. (Candy et al., 1986.) Pristupi s konvencionalnom terapijom koja iz organizma neselektivno eliminira i korisne minerale, te koji ne održavaju biološku ravnotežu, mogu biti čak i opasni. Stoga je važna činjenica ta da zeolit klinoptilolit povećava koncentraciju, Si, Na, K, Ca i Mg, fiziološki esencijalnih mikroelemenata. (Candy et al., 1986.)

**Učinak na gastrointestinalni trakt.** Postoje naznake kako prisutnost zeolita klinoptilolita u gastrointestinalnom traktu povećava adsorpciju i unapređuje produkciju fizioloških crijevnih mikroorganizama, što smanjuje mogućnost želučanih problema, influence i infekcije. (Duncan et al., 2012.) Objavljene kliničke studije nedvojbeno opravdavaju primjenu zeolita klinoptilolita primjerice, kod gastritisa, čira na dvanaesteru i želucu. Zeolit regulira probavne tegobe i uspješno zaustavlja dijareju. (Rodriguez-Fuentes et al., 2006.) Rezultati kliničkog ispitivanja upotrebe zeolita u kompleksnom tretmanu pacijenata s kroničnim *hepatitisom* pokazuje također da



pacijenti s hepatitisom imaju niži sadržaj ukupnog bilirubina i ukupnih lipida u jetra u odnosu na skupinu koja nije uzimala zeolit klinoptilolit, što potvrđuje tezu predmetne kliničke studije da zeolit klinoptilolit ima zaštitni učinak u razvoju toksičnog hepatitisa. (Chuikova i Vozhakov 2005)

**Učinak na urinarni trakt.** Zbog zatajenja rada bubrega dolazi do taloženja štetnih tvari u tijelu, što doprinosi pojavi drugih bolesti. Najčešće ljudi s takvim oštećenjima završavaju na dijalizi. Liječenje dijalizom može dodatno ugroziti život ovih pacijenata stoga što su ti bolesnici jako osjetljivi na infekcije. (Uchida et al., 1992.) Uporaba mikrokapsula koje sadrže pripravak ureaze-zeolita klinoptilolita može biti potencijalni način za uklanjanje uree iz krvi. (Cattaneo i Chang ., 1991.)

**Učinak na zglobno-koštane bolesti.** Osteoporoza se češće javlja u žena nego u muškaraca, a vrlo rijetko u djece. Uobičajeno je da se javlja kao postmenopauzalna osteoporoza koja nastaje zbog pada ženskog spolnog hormona estrogena, a razvija se 15-20 godina nakon menopauze. Zbog toga je važno održavati koštanu masu prije menopauze jer je koštana masa u mladosti od odlučujuće važnosti za veličinu gubitka koštane mase u starosti. Ženski spol, bijela rasa, visoka dob i demencija također su čimbenici rizika za osteoporozu. (Khosla i Hofbauer., 2017.) Zeolit klinoptilolit može se koristiti stoga u ovoj grupi pacijenata za povećanje razina Ca, P, Fe, Mn, Mg u krvi, i konkomitantno smanjenje razina teških metala poput primjerice Cd, Pb, Al. Naime, povećane razine Ca i P u krvi važno je u pacijenata s osteoporozom jer su to glavne komponente potrebne za formiranje kalusa. Stoga biološki aktivni zeolit klinoptilolit ima sve širu primjenu i u traumatologiji. (Fabiano et al., 2019.) Predkliničke studije na modelu štakora s ovariektomijom su također pokazale su da se oralna primjena jedne vrste klinoptilolita, PMA-zeolita, dobro podnosi i da su markeri kojima se može ocijeniti integritet i kvaliteta kostiju poboljšani u tretmanu sa PMA-zeolitom. (Kraljević et al., 2021.) Pozitivni rezultati na kosti pokazani su i u kliničkoj studiji na ljudima kod kojih je nakon 5 godina suplementacije s PMA-zeolitom došlo do značajnog pada broja frakturnih ozljeda u pacijenata s osteoporozom te poboljšanje kvalitete života. (Kraljević et al., 2022.)

**Učinci na paradontne bolesti.** Klinoptilolit ima pozitivan utjecaj na paradontne bolesti. Najčešći simptomi paradontoze su krvarenje zubnog mesa na dodir ili prilikom pranja zubi, povlačenje i oticanje zubnog mesa koji ima žarko crvenu ili ljubičastu boju, klimavost zuba te pojava paradontnih džepova. (Jainkittivong et al., 2002.) Klinička studija o primjeni zeolita kod liječenja bolesti usne šupljine pokazala je da je zeolit jedan od novijih načina regeneracije, jer ima imunomodulacijsko i antioksidativno svojstvo, te pojačava protuupalno djelovanje, što dugoročno ima povoljan utjecaj na procese ozdravljenja u cjelini, a posebno na usnu šupljinu. (Morishita et al., 1998.) Ove pojave je moguće kontrolirati upotrebom zeolita i dodavanjem u zubnu pastu ili neposrednom primjenom na desni. Ovakvu namjenu zeolita također potvrđuje registrirani lijek za dentalnu upotrebu – Zeomin, koji se bazira na zeolitu. (Morishita et al., 1998.)

**Učinak na cijeljenje rana.** Otprije je poznato da zeolit klinoptilolit pomaže cijeljenju rana, posjekotina, ogrebotina i sličnih oštećenja kože. Posebno je efikasan za tretiranje opekotina, kod cijeljenja postoperativnih ožiljaka ali i tretmana nekih drugih patoloških promjena na koži. Mikronizacijom zeolita u ultra fini puder postiže se povećanje aktivne površine čime se snažno veže i amonijak koji se oslobađa iz oštećenih stanica kože i sluznice. Primjerice, ispitivanje povoljnog utjecaja tribomehanički usitnjenog zeolita klinoptilolita na cijeljenje površinskih rana na koži i sluznici pokazalo je, da zeolit utječe na fiziološki proces cijeljenja površinskih rana kože, bez obzira na etiologiju nastanka rane. (Mc Manus et al., 2007.)

## **1.2. Metabolički poremećaji i šećerna bolest**

Najvažniji metabolički poremećaju današnjice odnose se na metabolički sindrom (MetS) i šećernu bolest odnosno dijabetes (*Diabetes mellitus*, DM). Metabolički sindrom i sindrom inzulinske rezistencije odnosi se na čest poremećaj koji uključuje središnju pretilost, sustavnu hipertenziju, inzulinsku rezistenciju, aterogenu dislipidemiju posebno hipertrigliceridemiju i smanjene razine lipoproteinskog kolesterola visoke gustoće. Poznato je kako MetS povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti i pripadajuće smrtnosti, dijabetes melitus tipa 2 i moždani udar, a neki aspekti MetS prisutni su i u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 1 što povećava smrtnost ili komplikacije. (Belete et al., 2021.) *Diabetes mellitus* (DM) najčešća je skupina metaboličkih poremećaja koji pogađaju populaciju s obzirom da je 2021 godine čak 537 milijuna ljudi u svijetu bolovalo od DM. (Rodrigues et al.,2023.)

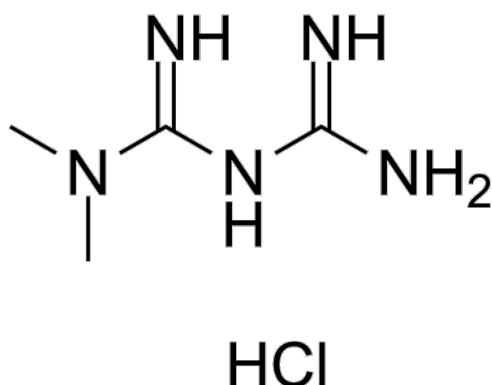
Poznate su četiri vrste šećerne bolesti:

- *diabetes mellitus* tipa 1 (T1DM) koji je autoimuna bolest te je uzrokovan razaranjem beta stanica gušterače i posljedičnim apsolutnim nedostatkom inzulina;
- *diabetes mellitus* neovisan o inzulinu, poznat kao tip-2 (T2DM), koji je rezultat je disfunkcije beta stanica u kombinaciji sa sustavnom inzulinskom rezistencijom;
- gestacijski dijabetes (GDM), javlja se kada tijelo ne može proizvesti dovoljno inzulina ili razvije intoleranciju na glukozu tijekom trudnoće i, ako se ne liječi pravilno, može evoluirati u doživotno stanje T2DM;
- monogenski dijabetes ili dijabetes s početkom zrelosti kod mladih (MODY) i često se pogrešno smatra T1DM ili T2DM, rijedak je tip dijabetesa uzrokovan promjenama ili mutacijom u jednom genu. (Gaál i Balogh., 2019.) Postoji više razloga zbog kojih je učestalost šećerne bolesti u stalnom porastu, a glavni čimbenici porasta incidencije su oni koji direktno ometaju fiziološku regulaciju metabolizma glukoze u ljudskom tijelu povratnom spregom koja se temelji na endokrinoj signalizaciji između gušterače, jetra i tkiva koja konzumiraju

glukozu. (Guyton i Hall., 2003; Gamulin et al., 2002; Rang et al., 2005.) Za T1DM to su deficijencija vitamina D u trudnoći te hranjenje kravljim formulama poslije carskog reza u periodu duljem od 6 mjeseci. (Rodrigues et al., 2023.) U liječenju T1DM neophodno je davanje egzogene terapije inzulina. (Subramanian i Baidal., 2021.)

Incidencija T2MD je također u porastu i povezuje se osim s genetskom predispozicijom sa čimbenicima poput stresa, smanjene tjelovježbe, pretilosti, povećanog unosa hrane, neadekvatne prehrane. (Temneanu et al., 2016.) Terapija T2DM je prvenstveno usmjerena na reguliranje razina glukoze odnosno hiperglikemiju što se prati kontrolom parametra HbA1c koji predstavlja mjeru količine šećera koji je vezan uz hemoglobin u crvenim krvnim zrnima. Hiperglikemija nije isključivo poremećaj metabolizma ugljikohidrata, već je to složeni metabolički poremećaj koji uključuje i disbalans masti, bjelancevina i elektrolita, a uzrokovan je promijenjenom funkcijom tkiva koja su zadužena za stvaranje energije, prvenstveno jetra i masnog tkiva. Ovo doprinosi poremećaju rada drugih tkiva i organa te pojavnosti mikro i makro arterijskih bolesti donjih ekstremiteta dijabetičara. To su primjerice, dijabetička makroangiopatija i kronična stanja kao što su pretilost i arterijska hipertenzija. (Jenkins., 1981.) Liječenje dijabetesa je stoga vezano uz normalizaciju glikemije, vježbanje, gubitak težine ukoliko je pacijent pretio, te kontrolu komorbiditeta, uključujući hipertenziju, dislipidemiju, nefropatiju i steatozu jetra. (American Diabetes Associations, 2015.) Jedan od najčešće korištenih lijekova za dijabetes je metformin (slika 7) koji se nalazi se na popisu esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije. (World Health Organization, 2022 dostupno na: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/general-availability-of-metformin-in-the-public-health-sector> )

Korištenje ovog lijeka izravno se povezuje s deficitom vitamina B<sub>12</sub> te je tijekom liječenja potrebna suplementacija B<sub>12</sub>. (Valdés-Ramos et al., 2015.) Razvijeni su i mnogi novi lijekovi npr. analozi glukagonu sličnog peptida 1 (GLP1), inhibitori dipeptidil peptidaze 4 (DDP4), glitazoni, glitazari, inhibitori SGLT2, bromokriptin, agonisti GPR40. (Velea et al., 2015.)



**Slika 7.** Molekula metformin hidroklorida.

Preporuke za kontrolu šećerne bolesti uz standardne lijekove odnose se i na prehranbenu kontrolu razina šećera u krvi. Primjerice, u prehrani se daju prednost složenim ugljikohidratima dobivenim iz cjelovitih žitarica, jer je eksperimentalno utvrđeno da program prehrane u kojoj su složeni ugljikohidrati zamijenjeni saharozom ili D-fruktozom ima negativan učinak na inzulinsku rezistenciju. (Cummings i Stephen., 2007.) Vrijedno je istaknuti da obroci s ugljikohidratima iz krumpira ili obroci s dekstrozom uzrokuju značajniji porast razine glukoze nakon obroka, usporedno s ugljikohidratima iz riže ili pšenice, dok ugljikohidrati iz krušnih proizvoda pokazuju intermedijarni odgovor. (Storlien et al., 2000.)

Glikemijski indeks je mjera pomoću koje se ugljikohidratne namirnice svrstavaju prema njihovom postprandijalnom učinku (nakon obroka) na razinu glukoze u krvi. S druge strane glikemijsko opterećenje procjenjuje ukupan učinak unesene namirnice na glikemiju te sumira glikemijski indeks s unesenim ugljikohidratima. (Crapo et al., 1997.) Koncept se temelji na činjenici kako se ugljikohidrati s nižim glikemijskim indeksom sporije apsorbiraju iz crijeva uzrokujući ravnomjernije postprandijalno oslobađanje glukoze i smanjeno oslobađanje masnih kiselina koje bi se koristile kao supstrat, što u konačnici rezultira i bržim uklanjanjem glukoze iz krvi. (Crapo et al., 1997.) U skladu s time preporuča se uzimanje hrane s niskim glikemijskim indeksom zbog povoljnih učinaka na smanjenje razine glukoze u krvi. Prema postojećim smjernicama, dijabetičarima se preporuča konzumacija prehrambenih vlakana u istim količinama koje vrijede i za opću populaciju. (Jenkins et al., 2002.) Rezultati istraživanja ističu da hiperglikemija utječe i na metabolizam lipida. Uzrok je također smanjena količina inzulina koja dovodi do poremećaja inhibicije hormon osjetljive lipaze u masnom tkivu uz pojačanu razgradnju masnih kiselina što uzrokuje hipetrigliceridemiju. (Evert et al., 2014.) Dokazano je kako umjereno ili smanjeno uzimanje glukoze u prehrani uvelike utječe i na smanjenje hiperlipidemije te posredno i na ukupno smanjenje kardiovaskularnog rizika u oboljelih od šećerne bolesti. (Ozougwu et al., 2013.)

Proteinska hrana ne utječe znatno na postprandijalnu razinu glukoze u krvi, vjerojatno zbog činjenice da je glukoneogeneza vrlo spor proces koji zahtijeva vrijeme da bi se aminokiseline pretvorile u glukozu. (Post et al., 2012.)

Osim prehranbenih intervencija vezanih uz razine i vrstu nutrijenata u hrani, jedino od rješenja za smanjenje količine slobodnih radikala u tijelu, smanjenja čimbenika stresa u dijabetičara te kontrole simptoma dijabetesa je i povećanje količine antioksidansa u prehrani. Važnu ulogu imaju vitamini C, A i E (Franz, 1997; Vrhovac et al., 2008.) Vitamin D također ima značajnu ulogu u smanjivanju oksidativnog stresa najvjerojatnije u sinergiji s melatoninom. (Stryer., 1991.) Blaži elektrolitski disbalans sastavni je dio šećerne bolesti. Simptomi mogu postati izraženiji u akutnim komplikacijama šećerne bolesti. To se osobito odnosi na dijabetičku ketoacidozu gdje, uz glukozuriju, elektrolitskom poremećaju dodatno pridonosi i povraćanje. (Gamulin et al., 2014.) Dolazi do gubitka kalija pa je ukupna količina kalija u organizmu snižena (ali povećana u serumu) što dalje pogoršava hiperglikemiju. (Fowler., 2009.) U liječenju hiperglikemijskih komplikacija dijabetesa uz nadoknadu inzulina i vode potrebno je adekvatno nadoknaditi i kalij. Zaključno, Američka udruga za dijabetes i Europska udruga za proučavanje dijabetesa preporučuju dijetu s niskim udjelom ugljikohidrata i podržavaju korištenje kratkotrajnih niskokaloričnih dijeta za mršavljenje u dijabetičara. (Ojo., 2019.).

### **1.2.1. Medicinski pripravci i dodaci prehrani za kontrolu razine glukoze u krvi**

Iako je osnova kontrole razine šećera u krvi i održavanje zdravlja tijela pravilna prehrana, postoji čitav niz ispitivanja različitih medicinskih proizvoda i dodataka prehrani koji mogu pomoći pacijentima s dijabetesom u kontroli razine šećera u krvi pa tako i simptoma bolesti. Čitav niz istraživanja je proveden u praćenju učinaka flavonoida iz hrane ili dodataka prehrani u kontroli dijabetesa. Pokazano je tako kako flavonoidi djeluju na staničnu signalizaciju i u konačnici mogu pomoći u regulaciji endogenih razina inzulina. (Oh i Jun., 2014.) Osobito su dobro istraženi učinci flavonoida na ulazak glukoze u stanicu, jetrene enzime, inhibiciju tirozin kinaze, AMPK, PPAR i NF- $\kappa$ B. (Al-Ishaq et al., 2019.) Međutim, nus pojave i točni mehanizmi učinaka flavonoida u pacijenata sa dijabetesom zahtijevaju dodatna istraživanja. Najčešće korišteni dodaci prehrani u kontroli simptoma dijabetesa i pripadajuća klinička ispitivanja obrađeni su i u radu Hannon i suradnika. (Hanon et al., 2020) U njihovo je analizi pokazano kako nema pouzdanih dokaza koji bi poduprli korištenje mnogih komercijalnih dodataka prehrani za liječenje dijabetesa ili njegovih komorbiditeta. Studije koje su obrađene u radu često su bile lošeg dizajna i nekontroliranih metoda istraživanja (tablica 2). Kada su u pitanju dodaci prehrani u kontroli dijabetesa, Američka udruga za dijabetes navodi kako korištenje suplementacije u obliku vitamina ili minerala u svrhu postizanja optimalnih glikemičkih vrijednosti ili smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti kod osoba s dijabetesom ili pred dijabetesom nije preporučena, osim u onim slučajevima gdje je eksplicitno utvrđen deficit pojedinog vitamina ili minerala. (Evert et al., 2019.) Sve je više i studija s pozitivnim preliminarnim rezultatima provedenih s ostalim dodacima prehrani poput

primjerice vanadija i biljaka *Gymnema sylvestre*, *Aloe vera*, *Momordica charantia* (Yeh et al., 2003.) te probiotika. (Kijmanawat et al., 2019.) Korištenje dodataka poput cimeta i kurkumina u svrhu poboljšanja glikemijskog stanja kod osoba s dijabetesom iziskuje još istraživanja. (Cortez-Navarrete et al., 2023.) Nadalje, alfa lipoična kiselina je dodatak prehrani koji može pomoći kod dijabetičke neuropatije i reducirati bol uzrokovanu oksidativnim oštećenjima. (<https://www.nccih.nih.gov/health/diabetes-and-dietary-supplements>, pristupljeno 30.1.2024.) Krom također može pomoći u poboljšanju glikemijske kontrole kod osoba s T1DM i T2DM. Dugotrajni učinci nisu dovoljno istraženi, a postoji rizik i od nuspojava kao što je oštećenje bubrega. (<https://www.nccih.nih.gov/health/diabetes-and-dietary-supplements>, pristupljeno 30.1.2024.) Kod T2DM nedostatak magnezija direktno utječe na razinu glikemije, a može ometati i sekreciju inzulina te utjecati na inzulinsku rezistenciju. (<https://www.nccih.nih.gov/health/diabetes-and-dietary-supplements>, pristupljeno 30.1.2024.) Popularni dodaci prehrani omega-3 masnih kiselina nisu pokazali očekivano pozitivno djelovanje na razine glikemije ili na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti kod osoba s T2DM. (Brown, et al., 2019.)

**Tablica 2.** Sažeta tablica učinaka suplemenata kod dijabetesa adaptirana iz (Hannon et al., 2020.).

Nutrijent	Podržavaju li rezultati korištenje ovog dodatka za liječenje dijabetesa? (Da, Ne, mješovito)	Kratki sažetak rezultata studija
<b><i>Vitamini topivi u vodi</i></b>		
Niacin		Meta-analiza u randomiziranoj kliničkoj studiji pokazuje da suplementacija niacinom rezultira povećanom pojavom dijabetesa tipa 2 (T2DM); studije na životinjama ispitivale su rezultate oksidativnog stresa, tolerancije glukoze i osjetljivosti na inzulin, s različitim rezultatima.
Vitamin B6		Suplementacija može olakšati dijabetičku neuropatiju, razinu glukoze natašte i endotelnu disfunkciju povezanu s dijabetesom kod miševa. Narativni pregled studija na ljudima zaključio je da nema koristi.
Biotin		Kod životinja je biotin bio učinkovit samo u kombinaciji s tjelovježbom. Narativni pregled ispitivanja na ljudima pokazuje da visoke doze biotina mogu poboljšati razinu glukoze natašte i funkciju glukokinaze.
Folat/Folna kiselina		Meta-analize su dale proturječne nalaze o suplementaciji folne kiseline za glukozu natašte i HOMA-IR (engl. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance). Suplementacija nije dovela do poboljšanja HbA1c ili homocisteina, ali je poboljšala debljinu medija karotidne intime u odraslih s metaboličkim sindromom (MetS-om) i smanjila rizik od moždanog udara u odraslih s T2DM kada se istodobno primjenjivala s ACE inhibitorom.
Vitamin B12		Suplementacija B12 može biti važna kod osoba na metforminu, jer ovaj lijek smanjuje razinu vitamina u serumu. Eksperimentalni dokazi ne podržavaju suplementaciju B12 za ishode povezane s dijabetesom.
Vitamin C		Meta-analize pokazuju da suplementacija može poboljšati razinu glukoze natašte i dijastolički krvni tlak, ali ne i HbA1c, u odraslih s T2DM. Klinička ispitivanja na ljudima nisu pokazala nikakvu korist od suplementacije

na razine glukoze natašte, lipide u krvi ili pojavu T2DM, ali mogu poboljšati simptome tjeskobe. Nalazi dobiveni na životinjskim modelima ukazuju na poboljšanje antioksidativnog kapaciteta i funkcije T limfocita.

### ***Vitamini topivi u mastima***

Vitamin E	<p>Meta-analize nisu pronašle nikakav učinak na markere dinamike glukoze ili inzulina, s izuzetkom jedne koja pokazuje poboljšani HbA1C kod ispitanika s nekontroliranom glikemijom na početnoj razini i niskim početnim razinama vitamina E. Poboljšanja iz kliničkih ispitivanja na ljudima pokazala su mješovite nalaze. Meta-analiza ispitivanja na životinjama pokazala je značajna poboljšanja u zacjeljivanju rana.</p> <p>Meta-analize prikazuju mješovite rezultate o kontroli glukoze, koncentracijama HbA1C i TG. Ispitivanja na ljudima i životinjama pokazala su različite rezultate o HbA1C, inzulinu i oksidativnom stresu. Jedna je meta-analiza otkrila da je nedostatak kroma povezan s oštećenom tolerancijom glukoze.</p>
Krom	<p>Jedno ispitivanje na ljudima zaključilo je poboljšanja glukoze natašte, ali ne i oralni test glukoze (OGTT) nakon suplementacije, unatoč povećanju težine. Debljanje.</p>
Kalij	<p>Nema poboljšanja u riziku od dijabetesa u meta-analizama. Klinička ispitivanja na ljudima sugeriraju poboljšanja glukoze, inzulina, inzulinske rezistencije, lipida u krvi i upale. Pokusi na životinjama pokazuju poboljšanja aktivnosti antioksidativnih enzima, glukoze u krvi i osjetljivosti na inzulin.</p>
Selen	<p>U jednom ispitivanju na ljudima, GLP-1 je poboljšán, ali nema drugih mjerenja povezanih s dijabetesom. Pokusi na životinjama pokazuju poboljšanja u kontroli glukoze, mjerenju inzulina i tjelesnoj težini.</p>
Natrij	<p>Meta-analize su zaključile poboljšanja razina glukoze natašte, HbA1c, inzulina natašte i markera dijabetičke ozljede bubrega. Randomizirane kliničke studije na ljudima pokazale su mješovite, ali uglavnom pozitivne učinke suplementacije na smanjenu progresiju dijabetesa u preddijabetesu, poboljšanja glukoze natašte, OGTT-a, inzulinske rezistencije i lipida u krvi. Ispitivanja na životinjama ukazuju na potencijal cinka da</p>
Cink	



pojača liječenje metforminom, druge pozitivne učinke na kontrolu glukoze, inzulin i oksidativni stres.

### **Aminokiseline**

Beta-  
Alanin

Može neizravno poboljšati komplikacije T2DM povećanjem intramuskularne koncentracije karnozina.

Taurin

Unakrsna ispitivanja na ljudima nisu pokazala učinak na osjetljivost na inzulin ili agregaciju trombocita. Rad na životinjama ukazuje na potencijalnu korist za komplikacije uključujući dijabetičku retinopatiju i endotelnu disfunkciju, ali mješovite rezultate za razinu glukoze natašte, funkciju beta stanica i toleranciju na glukozu. Narativne recenzije navode potencijal taurina, ali nedostaju klinička ispitivanja.

I-Leucin

Randomizirana klinička studija u ljudi ne pokazuje korist u poboljšanju HbA1C ili inzulinske osjetljivosti. Studije na životinjama dokazale su poboljšanja glukoze natašte i OGTT, ali mješovite učinke na inzulinsku rezistenciju. Suplementacija nije poboljšala proizvodnju inzulina iz gušterače. Narativni pregledi zaključili su mješovite rezultate o homeostazi glukoze.

### **Ostalo**

Kafein

Randomizirana klinička studija na bolesnicima s dijabetesom tipa 1 (T1DM) pokazuje da kofein može ublažiti pad glikemije nakon vježbanja, ali također može rezultirati hipoglikemijom s kasnim početkom. Studija na životinjama nije pokazala nikakvu korist za agregaciju trombocita ili ATP signalizaciju.

Dijetalna  
vlakna

Ispitano je mnogo različitih izvora vlakana. Rezultati meta-analize pokazuju poboljšanja u HbA1C, HOMA-IR i razinama inzulina nakon suplementacije topivim vlaknima. Randomizirane kliničke studije kod ljudi pokazale su dobrobiti topivih vlakana na razinu glukoze u krvi nakon jela i natašte, ali ne i intravenoznu toleranciju glukoze. Randomizirani testovi na životinjama ispitivali su različita topiva vlakna i prebiotike i pokazali dobrobiti u tjelesnoj

21

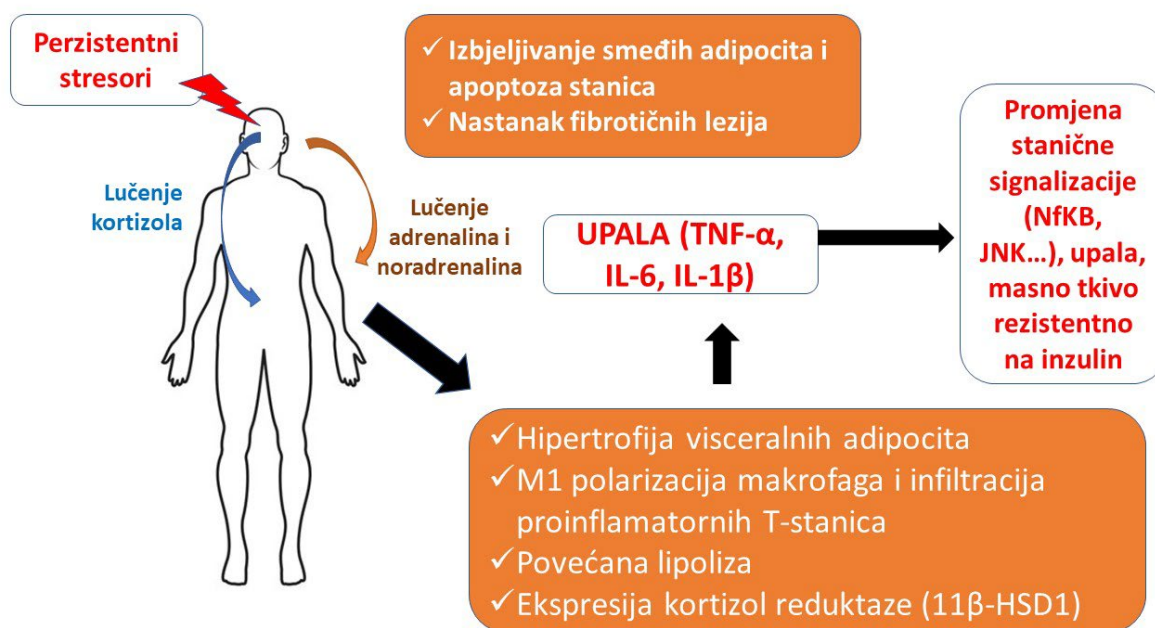
težini, hiperglikemiji, hiperinzulinemiji i mikrobnj raznolikosti. Nekoliko narativnih recenzija o prebioticima ukazuje na njihovu korist za mikrobnj raznolikost i poboljšanja koncentracije glukoze i inzulina.

Protein	Randomizirana klinička studija kod ljudi pokazuje mješovite učinke na profile adipokina. Ispitivanja na životinjama ukazuju na dobrobit za inzulinsku osjetljivost nakon suplementacije beta-konglicininom; ali suplementacija glukozamina izazvala je inzulinsku rezistenciju. Narativni pregled sugerira da mliječni proteini mogu poboljšati postprandijalnu glukozu.
Trans masti	Dodatak konjugirane linolenske kiseline smanjio je osjetljivost na inzulin kod muškaraca s pretilošću, ali je poboljšao izlučivanje inzulina u studijama na životinjama, unatoč drugim mješovitim rezultatima. Trans-vakcenična kiselina poboljšala je osjetljivost na inzulin kod štakora.

### 1.2.2. Zeoliti kao oralni medicinski pripravci

Zeoliti, osobito zeolit klinoptilolit, se zadnjih desetljeća sve više koriste u medicini kao proizvodi za vanjsku uporabu i oralnu suplementaciju. (Kraljević et al., 2018) Kao oralni suplementi pokazali su značajne pozitivne učinke na kosti u kliničkoj studiji na pacijentima s osteoporozom (Kraljević et al., 2022.), na status probavnog sustava (Lamprecht et al., 2015.) te na opće stanje pacijenata s karcinomom kolona podvrgnutih kemoterapiji karboplatinom (Vitale et al., 2020; Vitale et al., 2022.) Zeoliti su za razliku od većine standardnih lijekova i dodataka prehrani, a koji su mahom organske molekule (male molekule, protutijela, vitamini, flavonoidi, vlakna itd.) bilo sintetskog ili prirodnog podrijetla, anorganski minerali velike stabilnosti koji nakon oralnog unosa u probavni sustav ne ulaze u krv i ne metaboliziraju se kao ostale organske molekule koje se oralno unose u tijelo. Stoga je njihov učinak najprije lokalni u probavnom sustavu, a potom sistemski s obzirom da se učinci očituju kao posljedica detoksikacijskih i adsorptivnih učinaka u probavnom traktu, otpuštanja topivih silicijjskih formi u tijelo, mogućih neistraženih interakcija s mikrobiomom ali aktivacije imunološkog odgovora najvjerojatnije mehanizmom superantigena kroz Peyerove ploče. (Kraljević et al., 2018.) Zeoliti su u manjem broju studija istraženi i kao supstance za kontrolu simptoma dijabetesa. Primjerice, zeolit klinoptilolit je u jednoj studiji na miševima s pretilošću izazvanom visokim udjelom masti i DM tipa 2, unosom prehrane s 10% zeolita potisnuo je porast tjelesne težine, kao i težine jetre i visceralne masnoće, bez ikakvih promjena u unosu hrane i energije. U studiji je pokazano kako su se i razine lipida u plazmi i glukoze u krvi natašte smanjivale su se paralelno s unosom zeolita. (Kubo i Kawai., 2021.) Slično je u studiji Sultana i suradnika istražen učinak sintetskog zeolita na dijabetičke štakore s pozitivnim rezultatima nakon 6 mjeseci suplementacije i opserviranim smanjenjem razina glukoze, lipida, fragmentacije DNA, alanin aminotransferaze (ALAT), aspartat aminotransferaze (ASAT), uree, kreatinina, malondialdehida (MDA) i dušikovog monoksida (NO).

(Sultan et al., 2021.) Nanočestice zeolita tipa Linde A s cerijem inkorporirane u hidrogel uspješno su upotrijebljene i u terapiji dijabetičkih rana. (Qi et al., 2021.) Posebno je zanimljiva mogućnost uporabe prirodnog zeolita klinoptilolita u kontroli razina glukoze u krvi, stoga što se radi o netoksičnom materijalu čija fizikalno-kemijska svojstva indirektno mogu djelovati na ključne putove uključene u razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa, a to su prije svega antioksidativni učinak koji umanje djelovanje stresora i slobodnih radikala u tijelu te antiinflamatorni učinak (slika 8).



**Slika 8.** Ključni procesi uključeni u razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa koji se aktiviraju djelovanjem perzistentnih stresora.

### 1.2.3. *In vivo* modeli za istraživanje bioloških učinaka medicinskih proizvoda

Sigurnost i učinkovitost medicinskih proizvoda, bilo da se radi o lijekovima ili drugim medicinskim proizvodima može se dokazati samo kroz opsežna ispitivanja na ljudima odnosno kliničkim ispitivanjima. Međutim, prije razvoja novog lijeka ili medicinskog proizvoda i testiranja u kliničkom okruženju na ljudima, odnosno prenamjene u indikaciji postojećih lijekova ili medicinskih proizvoda eksperimentalno, potrebno je dobiti dokaze o mehanizmima djelovanja, učinkovitosti i sigurnosti. To se u pravilu provodi eksperimentima *in vitro* na staničnim kulturama, tkivima i organoidima, u novije vrijeme i *in silico* uz pomoć računalnih programa te *in vivo* na životinjskim modelima. (Mukherjee et al.,2022; Loewa et al.,2023.)

*In vivo* modeli koriste se za pokuse na živim organizmima. Oni su ključni za razvoj medicinskih proizvoda, postupka i novih vidova terapije. Proces odabira životinjskog modela za biomedicinska istraživanja nije jednostavan s obzirom različiti modeli

životinja imaju i specifična ograničenja. Primjerice, pri odabiru valja voditi računa o sličnosti fizioloških aspekata, poput primjerice probave ili reprodukcije, odabrane životinjske vrste i čovjeka. Do sada se u istraživanjima zbog određenih aspekata sličnosti s čovjekom najviše koriste vrste *Drosophila* (insekt), *Danio rerio* (riba), *Caenorhabditis elegans* (nematoda), te sisavci poput glodavaca, mačaka, pasa, svinja i majmuna. Osobito su glodavci pogodni kao modeli istraživanja lijekova i medicinskih proizvoda zbog genetske, biološke i bihevioralne sličnosti s ljudima. (Fox et al., 2017.) Kada bi bilo jednostavno utvrditi koja su to svojstva potrebna da se pronađe takva tvar koja djeluje terapijski ili biološki *in vitro*, a da je aktivna i *in vivo*, tada bi otkriće lijeka bi bilo daleko jednostavnije, pouzdanije i ubrzala bi se proizvodnja. (Lipinski i Hopkins., 2004.) No to nije tako, te je i opravdanosti uporabe životinja u znanstvenim istraživanjima kojima je krajnji cilj korist za čovjeka, iako predmet brojnih biomedicinskih rasprava, još uvijek važna za razvoj sigurnih lijekova i medicinskih proizvoda. Razvojem znanstvene, stručne i društveno-moralne svijesti, razvili su se i etički standardi za korištenje životinja u eksperimentalne svrhe. (Alfaro., 2005.) Prema Međunarodnim načelima za biomedicinska istraživanja na životinjama, postupke koji mogu prouzročiti više od trenutne ili minimalne boli, potrebno je provoditi uz prikladnu sedaciju, analgeziju ili anesteziju. Isto tako, postavljaju se pravila i pri usmrćivanju životinja na kraju pokusa. Prilikom odabira najprikladnijeg načina eutanazije treba voditi računa o vrsti, starosti, veličini i broju životinja, dostupnosti farmakoloških sredstava i odgovarajuće opreme, te vještini osobe koja provodi eutanaziju. (Alfaro., 2005.) Također, pri odabiru modela vodi se računa o načelima poznatima kao tzv. "3R model" od engleskih riječi **Replacement** (zamjena modela), **Reduction** (smanjenje broja životinja), **Refinement** (poboljšanje modela), čije je provođenje i pridržavanje propisano različitim međunarodnim deklaracijama o etici pokusa na laboratorijskim životinjama. Pridržavanje načela 3R modela tijekom planiranja i provođenja pokusa na životinjama bitno pridonosi moralnoj, a također i znanstvenoj kvaliteti istraživanja. (Alfaro, 2005.) Nakon uvođenja 3R modela uočen je pokazatelj promjene stava o uporabi životinja u znanstvenim istraživanjima, tako što je smanjen broj korištenih životinja, prisutan u različitim omjerima po pojedinim zemljama. U zapadnoeuropskim zemljama, u posljednjih 20 godina ukupan broj korištenih životinja se prepolovio. Broj primata ostao je nepromijenjen, a za male glodavce nema pouzdanih podataka. Upravo bi, međutim taj podatak bio značajan, obzirom da od ukupnog broja životinja u znanstvenim istraživanjima, 80-85% čine miševi i štakori, dok 1-10% otpada na ostale glodavce, ptice i ribe, a manje od 1% na pse, mačke i primat. U SAD-u se, međutim, psi zamjenjuju drugim vrstama životinja, poput svinja, krava i sl., dok su u Kanadi ribe zamijenile većinu sisavaca, posebno u toksikološkim istraživanjima. (Mukerjee., 2007.) Zemlje u kojima su istraživanja na transgeničnim životinjama intenzivna i s tendencijom porasta, osnivaju nacionalna tijela zadužena posebno za etička pitanja u svezi transgeničnih životinja, te usklađivanje istih unutar Europske unije. Neke prednosti životinjskih modela koji se koriste u svrhu razvoja lijekova i medicinskih proizvoda prikazana su u tablici 3.

**Tablica 3.** Biomedicinski značaj i ograničenja malih životinjskih modela (tablica adaptirana iz (Mukherjee, 2022)).

<b>Model</b>	<b>Važnost i limitacije</b>
Štakor ( <i>Rattus norvegicus domestica</i> ) i miš ( <i>Mus musculus</i> )	Jednostavan uzgoj, rukovanje, manje brige o uzgoju. Nemaju genetske varijacije kao ljudi zbog uzgoja međusobnim križanjem, nisu prikladan model za proučavanje upale.
Zamorac ( <i>Cavia porcellus</i> )	Pogodni za istraživanje metabolizma kolesterola, model astme, feto-placentalni razvoj i porođaj, proučavanje Alzheimerove bolesti, istraživanje tuberkuloze, proučavanje cjepiva. Visoke fenotipske varijacije, istraživanje ebole na zamorcima ograničeno je zbog slabog infektivnog potencijala virusa.
Hrčak, posebno zlatni hrčak ( <i>Mesocricetus auretus</i> )	Izvršno za reproduktivna istraživanja zbog strogog progesterona, ali ne i estrogena, kratkog gestacijskog razdoblja, jedinstvene anatomske značajke poput labavog potkožnog prostora, važno za studije mikrocirkulacije, model raka, model infekcije za leptospirozu, studije cjepiva.
Zec ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Dobar model za kirurški induciran osteoartritis, model zacjeljivanja rana, istraživanje lijekova, model astme, model kolesterola, model kardiovaskularnih bolesti, model Alzheimerove bolesti.
Kopitari ( <i>Equus</i> )	Važan za proučavanje zglobnih defekata, ortopedskih modela, tendinopatija, modela astme, reproduktivnih modela. No, potrebni su veći troškovi njege.
Govedo ( <i>Bos taurus</i> )	Važni za proučavanje ženskog reproduktivnog modela, problema vezanih uz trudnoću, modela tuberkuloze. No, potrebni su veći troškovi njege.
Koza ( <i>Capra hircus</i> )	Potencijal za ortopedske studije, mehanički uređaji za potporu cirkulacije, model za promjenu spola između žena i muškaraca.
Ovca ( <i>Ovis aries</i> )	Jednostavan model za rad, jednostavno uzimanje uzoraka, fiziološka i anatomska priroda slična je ljudskoj, dobra za kirurški model za kosti i zacjeljivanje rana, model astme, srčanu patologiju, razvoj cjepiva.
Mačka ( <i>Felis catus</i> )	Važni modeli za astmu, pretilost, dijabetes melitus tipa 2, HIV, cerebralnu paralizu.
Pas ( <i>Canis familiaris</i> )	Narkolepsija, hemofilija B ili nasljedne bolesti, rak, istraživanje mišićno-koštanog sustava itd.

<b>Model</b>	<b>Važnost i limitacije</b>
Svinja ( <i>Sus scrofa</i> )	Velika veličina legla, sličnija ljudskoj fiziologiji, važna za kardiovaskularne studije, Alzheimerovu bolest, aterosklerozu, dijabetes melitus tipa 2, rak dojke itd.

U istraživanju hipertenzije, dijabetesa i pretilosti najviše se koriste štakori i miševi iz skupine glodavaca. (Raut i Bandawane., 2018.) Tome su razlozi što glodavci dobro podnose različite vrste prehrane, osobito štakori Wistar i Sprague-Dawley. (Marques et al., 2016.) Štakori hranjeni hranom bogatom mastima primjerice, mogu razviti potpuni fenotip MetS. (Cheng et al., 2017.) Tijekom razvoja MetS modela, važno je voditi računa i o sastavu i kombinaciji ugljikohidrata pri čemu se često koriste D-fruktoza (Ajiboye et al., 2016.) i saharoza. (Wong et al., 2016.) Modeli MetS se mogu razviti korištenjem lijekova ili kemijskih supstanci, kao što su glukokortikoidi, antipsihotici, aloksan i streptozotocin. MetS modeli također mogu biti genetski modificirane životinje, na primjer knock-out miševi za leptin ili receptor za leptin, Zucker dijabetički masni štakori, DahlS.Z-Leprfa/Leprfa štakori, Goto–Kakizaki štakori, pretili spontani hipertenzivni štakor (Koletsy štakor) i POUND miševi. (Gunawan et al., 2021.) Praćenje razine glukoze u krvi u bazalnom stanju ili nakon željene stimulacije stoga je važan dio istraživanja potencijalnih učinaka lijekova ili medicinskih proizvoda koji se koriste u takvim klinčkim aplikacijama i istraživanjima. Primjerice, oralni test tolerancije glukoze (OGTT) i test inzulinske rezistencije (ITT), koriste se za karakterizaciju metaboličkog fenotipa, statusa glukoze u krvi i istraživanje promjena u metabolizmu glukoze. (Ayala et al., 2010.)

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog doktorata je bio istražiti i kvantificirati svojstvo adsorpcije D-glukoze i/ili interakcije s D-glukozom zeolita klinoptilolita u vodi i modelnim otopinama želucaj crijeva kiselog pH u uvjetima *in vitro* i *in vivo* u kontekstu moguće medicinske primjene zeolita klinoptilolita u ljudi.

Kako su adsorptivna svojstva i svojstva interakcije u uskoj vezi sa svojstvima površine zeolitnog materijala specifični ciljevi rada bili su:

- Analizirati svojstva i promjene površine mikroniziranog klinoptilolita u vodi i modelnim otopinama želucaj crijeva uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize površine materijala (EDS);
- Analizirati adsorpcijska ili interakcijska svojstva površine mikroniziranog klinoptilolitnog materijala za D-glukozu *in vitro* u vodi i modelnim otopinama želucaj crijeva uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize površine materijala (EDS);
- Kvantificirati svojstva adsorpcije i/ili interakcije zeolita klinoptilolita s D-glukozom uz pomoć metode tekućinske kromatografije ultra visoke moći razlučivanja UHPLC;
- Validirati svojstvo adsorpcije D-glukoze ili interakcije s D-glukozom klinoptilolitnih materijala u uvjetima *in vivo* na miševima mjerenjem razina D-glukoze u krvi.

Hipoteza pretpostavlja vezanje ili interakciju D-glukoze s površinom zeolita klinoptilolita, te odvijanje tog procesa i uvjetima *in vivo* što će se ogledati u smanjenju razine D-glukoze u krvi miševa.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Zeolitni materijali

Zeoliti koji su se koristili tijekom istraživanja dobiveni su iz prirodnog zeolita klinoptilolita. Zeolite je donirala tvrtka Panaceo International Active Mineral Production GmbH, Austrija. Sintetski Zeolit A (ZA) je od A. + E. Fischer-Chemie (Njemačka).

Oblici prirodnog zeolita klinoptilolita koji su se koristili tokom istraživanja su:

- Tribomehanički Aktivirani Zeolit klinoptilolit – TMAZ
- Panaceo Mikroaktivirani zeolit klinoptilolit - PMA
- Panaceo Mikroaktivirani zeolit klinoptilolit pomoću Oksigenizacije-PMAO2

Prirodni zeolit klinoptilolit TMAZ je dobiven tribomehaničkom aktivacijom uz pomoć patentiranog uređaja (Patent:PCT/1B99/00757). Ovaj postupak aktivacije prirodnog zeolita klinoptilolita i dobiveni TMAZ zeolit, zaštićen je patentima HR P990263 A2; US2013/0119,174 A1; WO 2000/064,586 A1; DE 10200688 A1. PMA je dobiven tehnologijom dvostruke aktivacije. To je tehnika koja koristi višestruko sudaranje čestica velikih brzina kroz vrtloge koji se generiraju pomoću sedam kružnih redova lopatica pričvršćenih na dva protutirajuća diska, dok su suprotno rotirajući diskovi postavljeni tako da čestice moraju proći sve redove lopatica sa centrifugalnom silom. Opisani postupak izvršava se dva uzastopna puta. Ovaj PMA zeolit dobiven dvostrukom mikronizacijom registriran je i u Europskoj uniji kao medicinski proizvod (registracija prema direktivi: European directive 93/42/EEC). PMAO2 je dobiven istom tehnologijom kao i PMA uz dodatak medicinskog kisika tijekom usitnjavanja. Materijali i procedure za njegovu pripremu PMA zaštićeni su patentom. (Patent broj: 16 202 000.2) [100] (Kraljević et al., 2017 ) Kemijski sastav materijala prema specifikacijama proizvođača korištenog za pripremu TMAZ, PMA i PMAO2: SiO<sub>2</sub>: 65,0 - 71,3% ; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 0,7 - 1,9%; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 11,5 - 13,1 ; MgO: 0,6 - 1,2%; CaO: 2,7 - 5,2% ; Na<sub>2</sub>O: 0,2 - 1,3%; K<sub>2</sub>O: 2,2 - 3,4% ; TiO<sub>2</sub>: 0,1 - 0,3%. Mineraloški sastav: klinoptilolit 86%, kvarc 2%; kristobalit 6% ; biotit: 5%, ilit, feldšpar i karbonatni minerali – u tragovima. Teški metali: Pb ≤ 14mg / kg; Hg ≤ 3 mg / kg; As ≤ 1.5 mg / kg; Cd ≤ 0.5 mg / kg; Co ≤ 5 mg / kg; Va ≤ 10 mg / kg; Ni ≤ 20 mg / kg. Ionska selektivnost: Cs<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Pb<sup>2+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup>

D-glukoza, D-fruktoza, saharoza i laktoza su od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), NaCl- od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD), HCl 37% od Gram Mol d.o.o. (Hrvatska), Milli-Q voda (mQ H<sub>2</sub>O) je dobivena pomoću povezanih sustava ultračiste vode (GenPure UV-TOC/UF xCAD plus) i Milli-Q sustava za pročišćavanje vode (<0,055 μS/cm, Milli-Q model Pacific TII 12; Thermo Fisher Scientific, SAD).



### 3.1.2. Priprema suspenzija i otopina

Suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O pripremljene su u masenoj koncentraciji 5 g/L zeolita u mQ H<sub>2</sub>O, pH = 7,18. Za model želučane otopine pripremljen je sustav 7 mL/L 37% HCl i 2 g/L NaCl; pH = 1,94 a za model crijevne otopine sustav 8,649 g/L NaCl; pH = 5,7. Otopina D-glukoze je pripremljena u koncentraciji 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O. Za pokuse kvantifikacije vezanja D-glukoze na zeolite, pripremljene su i kontrolne otopine D-fruktoze, saharoze i laktoze u koncentracijama 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O.

Suspenzije zeolita u mQ H<sub>2</sub>O su pripremljene na sobnoj temperaturi, te nakon pripreme vorteksirane 1-2 min (Vorteks 3 IKA, Njemačka). Potom su uzorci miješani 30 min na elektromagnetskoj miješalici (IKA basic, Njemačka), pri 800 rpm. Ovako pripremljene suspenzije inkubirane su u mraku 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h inkubacije, supernatant je odvojen od taloga dekantacijom, te je dobiveni supernatant centrifugiran na 4000 rpm (Eppendorf 5810 R, Njemačka) pri 4 °C, 30 min. Preostali supernatant ponovno je centrifugiran na 14000 rpm (centrifuga Eppendorf 5427 R, Njemačka) pri 4 °C, 30 min te pri 140000 rpm (mikro-ultracentrifuga, Thermo Fisher Scientific, Njemačka) pri 4 °C, 30 min. Svi dobiveni talozi i supernatanti analizirani su uz pomoć SEM i EDS. Isti postupak analize proveden je za suspenzije zeolita uz dodatak D-glukoze no samo do koraka centrifugiranja pri 4000 rpm. Eksperimentalni dizajn za studije adsorpcije D-glukoze bio je sljedeći:

- Kontrola 1: ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> suspenzije zeolita (zeolit dodan u mQ H<sub>2</sub>O pri masenoj koncentraciji od 40 g/L)
- Kontrola 2: otopina D-glukoze pri koncentraciji od 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O
- Ispitni uzorci suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> + otopina D- glukoze.

Svi talozi i supernatanti su analizirani elektronskom mikroskopijom SEM u kombinaciji s EDS kao što je opisano u poglavlju 3.2. Metode.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Analiza površine skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i energijom disperzivne rendgenske spektroskopije (EDS)

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) koristi se za proučavanje površine čvrstih tijela i dobivanje informacija o njihovoj morfologiji i topologiji. (Nyankson et al., 2018.) Također, elementna analiza uz pomoć EDS daje informacije o elementnom statusu na površini materijala ili tijekom istraživanja adsorpcije malih molekula. (Turp et al., 2020.) Površinske analize frakcije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O, rađene su na JEOL FE-SEM instrumentu (JSM-7800F PRIME, JEOL Ltd., Tokio, Japan), opremljenim EDS detektorom (X-MAX80 Aztec, Oxford instrumenti, UK). Uzorci zeolita ili zeolitnih suspenzija stavljeni su na držač uzorka s karbonskom pastom. Naponi ubrzanja za SEM i EDS primijenjeni su na 5 kV. Za EDS mjerenja, odabrano je 5 različitih mjesta za procjenu reprodukcije rezultata. Konkretno, za studije površine

materijala (SEM i EDS), miješanjem su pripravljene suspenzije zeolita (ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub>), u koncentraciji 5 g/L, svaka vrsta zeolita u mQ H<sub>2</sub>O.

Suspenzije zeolita uz dodatak otopine D-glukoze analizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektorom (SEM) i EDS detektorom OXFORD PENTA FET (Thermo Fisher Scientific, SAD) za određivanje kemijskog sastava uzoraka. Uzorci su stavljeni na karbonske diskove (karbonsko ljepilo diskovi 12 mm, AGAR Scientific, UK) do potpunog sušenja. Nakon 1 h, osušeni uzorci skenirani su SEM-om pomoću detektora niskog vakuuma i slike su dobivene u rasponu povećanja od 5000 do 20000x uz vakuum (100 Pa).

### **3.2.2. Analiza tekućinskom kromatografijom ultraviseke učinkovitosti (UHPLC)**

Kvantifikacija D-glukoze, D-fruktoze, saharoze i laktoze u supernatantu je izvedena UHPLC kromatografijom s obzirom da se metoda standardno koristi za kvantifikaciju adsorpcije malih molekula na zeolit u različitim aplikacijama. (Rubashvili et al., 2019). Analiza je provedena na instrumentu za tekućinsku kromatografiju (Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC hibridni sustav, SAD) s kolonom Hi-Plex Ca (Agilent Technologies, 8 µm, 300 mm × 7,7 mm, SAD). Kao mobilna faza koristila se mQ H<sub>2</sub>O. Protok 0,5 mL/min. Vrijeme analize 30 min, temperatura u koloni 85 °C, sobna temperatura autosamplera, detektor RI 31 °C, volumen injekcije 10 µL. Kontrole (mQ H<sub>2</sub>O i otopina D-glukoze, D-fruktoze, saharoze i laktoze podešene su na koncentraciju od 2 mg/mL) i uzorci (PMA-zeolit i D-glukoza u 2 mg/mL). ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> supernatant dobiven je centrifugiranjem suspenzije zeolita 40 g/L, centrifugiranjem pri 4000 rpm. Svi su uzorci ubrizgani u instrument u tehničkom duplikatu. Kalibracijska krivulja za kvantifikaciju D-glukoze, D-fruktoze, saharoze i laktoze, konstruirana je korištenjem otopine D-glukoze, D-fruktoze, saharoze i laktoze u mQ H<sub>2</sub>O pri koncentracijama 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125, 0,025 mg/mL.

### **3.2.3. Mjerenje razina D-glukoze *in vivo***

Pokusi *in vivo* izvedeni su na ženkama miševa C57BL/6 Zgr/Hr. Životinje su na početku pokusa bile stare 3-4 mjeseca. U svakoj skupini korišteno je šest miševa po eksperimentu. Miševi su dobiveni iz jedinice za eksperimentalni rad životinja Instituta Ruđer Bošković. Tijekom eksperimentalnog razdoblja držano je šest životinja po kavezu. Dna kaveza prekrivena su piljevinom (Scobis Uno®, Mucedola srl, Italija). Korištena je standardna hrana za laboratorijske miševe (4RF 21 GLP® Mucedola srl, Italija). Pristup hrani i vodi bio je *ad libitum*. Životinje su se uzgajale u uobičajenim uvjetima: ritmovi svjetla/tama od 12/12 sati, temperatura od 22 °C, a vlažnost zraka 55%. Svi pokusi izvedeni su prema smjernicama Instituta za istraživanje laboratorijskih životinja - ILAR Guide for the Care i korištenje laboratorijskih životinja, EU Direktiva 2010/63/EU, i hrvatskom zakonu o zaštiti životinja (NN 102/17). Sve postupke koji su se izvodili na životinjama odobrilo je Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede i

šumarstvo Republike Hrvatske – UP/I-322-01/21–01/49. Oralni test tolerancije D-glukoze (OGTT) ili test opterećenja glukozom izveden je prema sljedećem dizajnu:

- Negativna kontrola
- Pozitivna kontrola 1 – PMA zeolit 4 g/kg
- Pozitivna kontrola 2 – otopina D-glukoze 2 g/kg
- Protokol 1 – Tretman PMA zeolitom 4 g/kg dnevno tijekom 72 h. 24 h nakon posljednje primjene otopine PMA daje im se D-glukoza 2 g/kg.
- Protokol 2 – primjena otopine D-glukoze 2 g/kg + PMA zeolit 4 g/kg istovremeno

U pokusu su korištene svježe pripremljene otopine D-glukoze i suspenzije PMA zeolita u sterilnoj vodi. Pripremljeni uzorci su finalno aplicirani u volumenu 10mL/kg tjelesne težine miševa. Prije primjene D-glukoze, miševi su bili na tašte 12 h. Krv je uzorkovana iz lateralne repne vene pomoću lancete. Početne razine D-glukoze izmjerene su pomoću Start Strip Xpress (Nova Biomedicinski) glukometra. Potom se oralno aplicirala D-glukoza i njezina razina u krvi određena je u vremenskim točkama od 15, 30, 60 i 120 min. Nakon konzumacije, koristeći metodologiju opisanu za određivanje bazalne koncentracije glukoze, određena je i aktualna koncentracije glukoze u krvi. Životinje su zatim anestetizirane pomoću 3% izoflurana. Nakon što je potvrđeno da je životinja pod dubokom anestezijom (bradikardija, odsutnost palpebralnog i kornealnog refleksa), životinje su žrtvovane rezanjem vratne vene, a sakupljena se krv koristila za daljnje kvalitativne i kvantitativne biokemijske pretrage tako što je skladištena u epruvetama s 10  $\mu$ L EDTA za analizu cijele krvi i 100  $\mu$ L pune krvi za heparinske testove jetra. Testovi pune krvi napravljeni su na automatskom hematološkom analizatoru BC-30 Vetfor (Mindray, Shenzhen Kina): bijele krvne stanice (WBC); crvena krvna zrnca (RBC); hemoglobin (HB); hematokrit (HCT); srednji korpuskularni volumen (MCV); srednji korpuskularni hemoglobin (MCH); srednja koncentracija korpuskularnog hemoglobina (MCHC); trombocitni kritični (PCT); širina distribucije crvenih krvnih zrnaca (RWD). Jetrene probe su napravljene na RC kliničkom kemijskom analizatoru (Scil Animal Care Company, Njemačka) s heparinom kako slijedi: alanin aminotransferaza (ALT); albumin (ALB); alkalne fosfataze (ALP); amilaza (AMY); gama glutamiltransferaza (GGT); D-glukoza (Gluh); kreatinin (CREA); globulin (Glob); bilirubin (TBIL); urea (BUN); omjer albumin/globulin (A/G); fosfati (PHOS); ukupni proteini (TP); ukupni kolesterol (TC).

#### **3.2.4. Statistička analiza *in vivo* studija**

Rezultati *in vivo* studija statistički su analizirani uz pomoć višestrukog Mann Whitney U-neparametrijskog testa, nakon čega je napravljena ANOVA Kruskal-Wallis analiza na razini značajnosti  $p > 0,05$  (Program Sigma Statistics v. 3.5 ). Mann-Whitney U test je odabran za analizu *in vivo* rezultata kao neparametrijski statistički test za usporedbu dva neovisna uzorka kako bi se utvrdilo postoji li razlika u njihovoj distribuciji. Za razliku od t-testa, koji pretpostavlja da su podaci normalno raspoređeni i da je varijanca jednaka među grupama, Mann-Whitneyjev U test ne zahtijeva ove pretpostavke, što znači da je bio primjenjiv u ovom istraživanju s obzirom na mali uzorak i nenormalno

distribuirane podatke. Kruskal-Wallisov test je također proveden s obzirom da je bilo potrebno usporediti više od dvije neovisne grupe. Ovaj test je naime, posebno koristan kada nisu zadovoljene pretpostavke o normalnosti i homogenosti varijanci. Također, ovaj test se smatra proširenjem Mann-Whitneyevog U testa jer može obraditi tri ili više skupina (Aron et al, 2021; Petz et al. 2012).

### **3.2.5. Mjerenje pH vrijednosti suspenzija zeolita u mQ vodi i modelnim otopinama želuca i crijeva s dodatkom D-glukoze**

Mjerena je promjena pH za suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 tijekom vremena. U tu su svrhu pripremljene suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O, masene koncentracije zeolita 40 g/L. Suspenzije zeolita su nakon pripreme vorteksirane 1-2 min (Vorteks 3 IKA, Njemačka), te je izmjeren pH (pH Lab Meter, Metrohm, Švicarska). Izmjera pH provedla se odmah nakon pripreme suspenzija te nakon 5min, 30 min, 24 h i 48 h. Izmjera pH zeolitnih suspenzija provedena je i u modelnim otopinama želuca i crijeva s dodatkom 40 g/L D-glukoze, nakon 24 h inkubacije u mraku.

## 4. REZULTATI

### 4.1. pH vrijednosti suspenzija zeolita u mQ H<sub>2</sub>O i otopini D-glukoze

Za mjerenje pH vrijednosti, korištene su suspenzije ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u mQ vodi u koncentraciji (40 g/L). Neposredno nakon pripreme zeolitnih suspenzija, pH vrijednost izmjerena je odmah te nakon 5 min, 30 min i nakon 24 h inkubacije na sobnoj temperaturi. Temeljem dobivenih pH vrijednosti, analizirani su teoretski procesi otapanja površine zeolita u vodi i postizanja ravnotežnog stanja. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Sintetski ZA vidljivo je imao najveću pH vrijednost (pH = 11) što je očekivano zbog njegovih lužnatih osobina pogodnih za industrijske aplikacije u industriji detergenata. Za razliku od ZA klinoptilolitni materijali TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> su već nakon 24 sata imali pH vrijednosti približno neutralne suspenzije.

**Tablica 4.** pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> (40 g/L) u mQ vodi u vremenskim intervalima: početni pH, nakon 5 min, 30 min i 24 h inkubacije na sobnoj temperaturi. Suspenzije su potom inkubirane do ukupno 48 h.

Zeolit	Početni pH	5 min	30 min	24 h	48 h
ZA	11,13	11,13	11,29	10,98	11
TMAZ	8,72	8,70	7,77	7,33	7,38
PMA	9,20	9,20	9,11	7,93	7,47
PMAO <sub>2</sub>	9,20	9,20	8,82	7,74	7,54

Ravnotežno stanje postignuto je nakon 24 h i razlike za pH vrijednosti izmjerene nakon 24 h i 48 h su prikazane (tablica 5). Mjerenja nakon 48 h su pokazala da nema značajnih promjena vrijednosti pH, posebice za ( $\Delta$  pH = 0,02) i TMAZ ( $\Delta$  pH = 0,05), dok je za PMA ( $\Delta$  pH = 0,46) i PMAO<sub>2</sub> ( $\Delta$  pH = 0,20) promjena pH bila nešto veća što je očekivano jer su ovi materijali dobiveni postupkom dvostrukog usitnjavanja te njihove čestice imaju veću aktivnu površinu. Generalno se može zaključiti kako se za 24 h postiže kemijska ravnoteža otapanja zeolita u vodi.

**Tablica 5.** Razlike za pH vrijednosti ( $\Delta$ pH) suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> (40 g/L) u mQ vodi izmjerene nakon 24 h i 48 h.

Zeolit	$\Delta$ pH
ZA	0,02
TMAZ	0,05
PMA	0,46
PMAO <sub>2</sub>	0,20

Isti pokus određivanja pH vrijednosti proveden je za ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 (koncentracija 40 g/L) u modelnim otopinama želuca (pH = 1,94) i crijeva (pH = 5,7). Usporedba je provedena s podacima za vodene suspenzije zeolita (tablica 6).

**Tablica 6.** pH vrijednosti zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 (koncentracija 40 g/L) u vodi i u modelnim otopinama želuca (pH = 1,94) i crijeva (pH = 5,7).

<b>Zeolit</b>	<b>mQ H<sub>2</sub>O (pH = 7,18)</b>	<b>Modelna otopina želuca (pH = 1,94)</b>	<b>Modelna otopina crijeva (pH = 5,7)</b>
<b>ZA</b>	11,33	6,32	10,47
<b>TMAZ</b>	9,21	2,06	8,24
<b>PMA</b>	9,41	2,08	8,59
<b>PMAO2</b>	9,40	2,06	7,67

Najniže su vrijednosti pH izmjerene u modelnoj otopini želuca. Razlike početno izmjerenih pH vrijednosti suspenzije testiranih zeolita u modelnim otopinama želuca i crijeva te vrijednosti pH nakon inkubacije 24 h (tablica 7). Rezultati mjerenja su pokazali da je  $\Delta$ pH najmanja za zeolite TMAZ i PMAO2 u modelnoj otopini želuca (TMAZ  $\Delta$ pH = 0,12; PMA  $\Delta$ pH = 0,14; PMAO2  $\Delta$ pH = 0,12). To ukazuje na činjenicu da klinoptilolitni materijali TMAZ, PMA i PMAO2 vrlo malo mijenjaju pH želuca. Nasuprot tomu, sintetski ZA imao je visoki  $\Delta$ pH = 4,38.

U modelnoj otopini crijeva,  $\Delta$ pH bila je najmanja za zeolit PMAO2 i iznosila je 1,97. Za zeolite TMAZ  $\Delta$ pH bila je 2,54, a za PMA  $\Delta$ pH bila je 2,89. To bi značilo da TMAZ, PMA i PMAO2 mijenjaju pH crijeva prema neutralnim vrijednostima za 2-3 pH jedinice. Promjena pH za ZA bila je najveća i iznosila je 4,77.

**Tablica 7.** Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija testiranih zeolita u modelnim otopinama želuca i crijeva nakon inkubacije 24 h u mraku pri sobnoj temperaturi.

<b>Zeolit</b>	<b><math>\Delta</math>pH (želudac)</b>	<b><math>\Delta</math>pH (crijeva)</b>
<b>ZA</b>	4,38	4,77
<b>TMAZ</b>	0,12	2,54
<b>PMA</b>	0,14	2,89
<b>PMAO2</b>	0,12	1,97

Nadalje, pokus je ponovljen za modelne otopine želuca i crijeva uz dodatak D-glukoze. Vrijednosti pH izmjerene su odmah na početku pokusa te nakon 24 h inkubacije. Dodatak D-glukoze u koncentraciji 40 g/L utjecao je na promjenu pH vrijednosti zeolitnih suspenzija u modelnim otopinama želuca (tablica 8) i crijeva (tablica 10),

nakon 24 h inkubacije. u slučaju ZA zeolita pH se smanjio u mQ vodi za 0,28, nakon 24 h inkubacije, a za suspenzije klinoptilolitnih materijala TMAZ za 0,9, PMA za 0,45 i PMAO2 za 0,52. To znači da je utjecaj D-glukoze na promjenu pH najmanji za ZA. Vrijednosti pH zeolitnih suspenzija ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u modelnoj otopini želucas dodatkom D-glukoze su različiti. Vrijednosti pH su se smanjile nakon inkubacije 24 h za ZA za 0,32 te za TMAZ za 0,03, PMA za 0,06 i PMAO2 za 0,03. Utjecaj D-glukoze na promjenu pH bio je stoga, najmanji za TMAZ i PMAO2 dok je bio najveći za ZA.

**Tablica 8.** Izmjerene pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O i modelnoj otopini želuca(pH = 1,94) sa dodatkom otopine D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Zeolit	pH (mQ H <sub>2</sub> O)	pH (modelna otopina želudca)	pH (mQ H <sub>2</sub> O + D-glukoza)	pH (modelna otopina želuca+ D-glukoza)
<b>ZA</b>	11,33	6,96	11,05	6,64
<b>TMAZ</b>	9,21	2,06	8,31	2,03
<b>PMA</b>	9,41	2,08	8,96	2,02
<b>PMAO2</b>	9,40	2,06	8,88	2,03

**Tablica 9.** Vrijednosti  $\Delta$ pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnoj otopini želuca(pH = 1,94) sa D-glukozom u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Zeolit	pH (modelna otopina želudca)	pH (modelna otopina želudca+D-glukoza)	$\Delta$ pH
<b>Zeolit A</b>	6,96	6,64	0,32
<b>TMAZ</b>	2,06	2,03	0,03
<b>PMA</b>	2,08	2,02	0,06
<b>PMAO2</b>	2,06	2,03	0,03

Analiza pH u modelnoj otopini crijeva bez i sa dodatkom D-glukoze prikazana je u tablici 10.

**Tablica 10.** pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) sa i bez dodatka otopine D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

	<b>Zeolit</b>	<b>pH (mQ H<sub>2</sub>O)</b>	<b>pH (modelna otopina crijeva)</b>	<b>pH (mQ H<sub>2</sub>O + D-glukoza)</b>	<b>pH (modelna otopina crijeva + D-glukoza)</b>
1	<b>ZA</b>	11,33	10,47	11,05	10,45
2	<b>TMAZ</b>	9,21	8,24	8,31	8,00
3	<b>PMA</b>	9,41	8,59	8,96	8,16
4	<b>PMAO2</b>	9,40	7,67	8,88	8,10

**Tablica 11.** Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) sa dodatkom D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

<b>Zeolit</b>	<b>pH (modelna otopina crijeva)</b>	<b>pH (modelna otopina crijeva+D-glukoza)</b>	<b><math>\Delta</math> pH</b>
<b>Zeolit A</b>	10,47	10,45	0,02
<b>TMAZ</b>	8,24	8,00	0,24
<b>PMA</b>	8,59	8,16	0,43
<b>PMAO2</b>	7,67	8,10	0,43

Vrijednost pH smanjila se u modelnoj otopini crijeva s D-glukozom nakon inkubacije od 24 h kod ZA za 0,02 a kod TMAZ za 0,24, PMA za 0,43 i PMAO2 za 0,43. Utjecaj D-glukoze je stoga bio najmanji za ZA, a za klinoptilolitne materijale TMAZ, PMA i PMAO2 blago veći i iznosio je promjenu pH prema više od 0,24 - 0,43 pH jedinica.



**Tablica 12.** Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> u mQ vode sa D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

<b>Zeolit</b>	<b>pH (mQ voda)</b>	<b>pH (mQ voda +D-glukoza)</b>	<b><math>\Delta</math>pH</b>
<b>Zeolit A</b>	11,33	11,05	0,28
<b>TMAZ</b>	9,21	8,31	0,9
<b>PMA</b>	9,41	8,96	0,45
<b>PMAO2</b>	9,40	8,88	0,52

Dobiveni rezultati mjerenja pH vrijednosti pokazali su da D-glukoza u vodenoj suspenziji testiranih zeolita smanjuje prvobitne vrijednosti pH za 0,28 (ZA) i u rasponu od 0,45 do 0,9 pH jedinica za klinoptilolitne materijale. To znači da D-glukoza ulazi u interakciju sa površinom zeolita te povećava koncentraciju vodikovih kationa (H<sup>+</sup>) u mediju zbog čega pH vrijednost pada. Promijene pH bile su manje u zeolitnim suspenzijama u modelnim otopinama želucal crijeva.

Interesantno je napomenuti kako su promijene pH za suspenzije zeolite u modelnoj otopini želucabile značajno manje uz dodatak D-glukoze nego one u modelnoj otopini crijeva, što se može povezati s otpuštanjem manjeg broja OH<sup>-</sup> skupina sa površine zeolita, a otpuštanje većeg broja H<sup>+</sup>.

#### **4.2. Analiza površine sintetskog zeolita A i prirodnog zeolita klinoptilolita TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS**

##### **4.2.1. Površina sintetskog zeolita A i prirodnog zeolita klinoptilolita u obliku TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS u vodi**

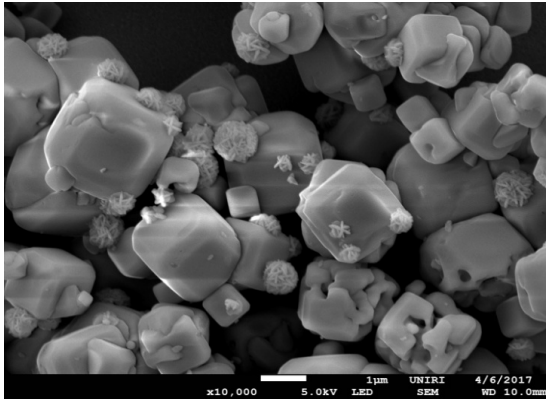
Za analizu površine ispitanih zeolitnih materijala (ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub>) iz suspenzije u mQ H<sub>2</sub>O za dekantiranu frakciju i frakcija nakon centrifugiranja pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm, koristila se metoda skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) (slike 9,10,11,12) i elementne analize EDS (tablica 13). Za elementnu analizu usporedili smo prosječne masene postotke vrijednosti za sljedeće elemente: silicij (Si), kisik (O), ugljik (C), natrij (Na) i aluminij (Al). Rezultati su uspoređeni s elementnom analizom površina krutih suhih zeolita (ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub>). EDS analiza (tablica 13) ukazala je da se u mQ H<sub>2</sub>O odvijaju promjene vezane uz površinskog otapanja zeolita te reorganizaciju kristalne strukture uočene SEM analizom u frakcijama nakon centrifugiranja (4000 rpm, 14000 rpm, 140000 rpm). Naime, u frakcijama zeolita nakon centrifugiranja više se nisu nalazile veće čestice

zeolita te su dominirale silicijeve strukture što ukazuje na otpuštanje Si s površine materijala i stvaranje silicijevih formi u uzorcima (slike 9,10,11,12). Osim malih čestica zeolita i amorfnih oblika Si opserviranih uz pomoć SEM analize, utvrđeno je postojanje čestica koje sadrže Al u frakcijama nakon centrifugiranja, posebno za ZA (tablica 13). Prosječne vrijednosti masenih postotaka elemenata C i Na porasle su pri ponavljanim centrifugiranjima od 4000 rpm do 140000 rpm vjerojatno zbog otpuštanja kationa Na<sup>+</sup> iz unutrašnje strukture zeolita i ugljičnih plinova iz pora zeolita kao posljedice primijenjene centrifugalne sile.

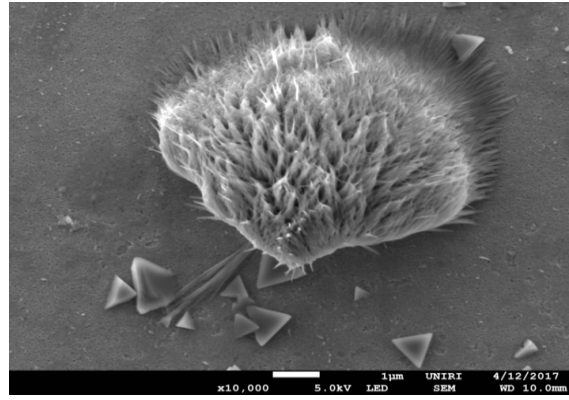
**Tablica13.** Elementna analiza Si, O, C, Na i Al za uzorke ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O dobivene dekantiranjem i centrifugiranjem frakcija pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm te uzoraka krutih zeolita uz pomoć metode EDS. Rezultati su prikazani u prosječnim masenim postocima (w) %.

Materijal	Frakcija	Elementi u prosječnim masenim postocima (w%)				
		Si	O	C	Na	Al
<b>Zeolit A</b>	Dekantirana frakcija	16	49,35	2,7	15,33	16,62
	Frakcija 4000 rpm	16	38,6	14,21	29,79	1,4
	Frakcija 14000 rpm	16,96	35,91	13,34	33,57	0,22
	Frakcija140000 rpm	12	37,85	15,6	31,36	2,91
	Zeolit u krutom stanju	46,73		/	16,36	33,13
<b>TMAZ</b>	Dekantirana frakcija	37,45	49,7	3,05	4	5,8
	Frakcija 4000 rpm	46,23	27,9	10,5	16,64	0,73
	Frakcija 14000 rpm	26,2	29,31	13,78	30	0,55
	Frakcija140000 rpm	15	40,36	12,3	32,2	0,1
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4
<b>PMA</b>	Dekantirana frakcija	39,83	47,7	2,46	4,21	5,8

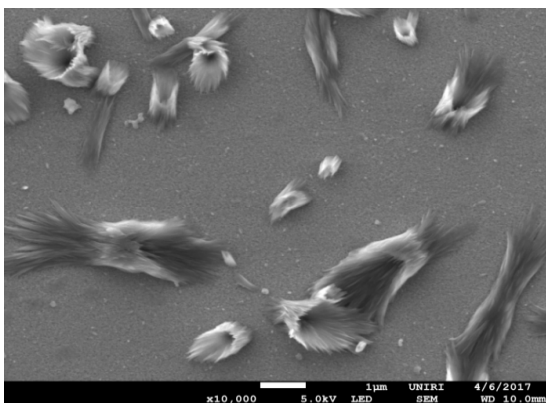
	Frakcija 4000 rpm	40,66	36,61	11,08	10,79	0,86
	Frakcija 14000 rpm	36,11	33,88	19,22	9,62	1,17
	Frakcija140000 rpm	45,15	26,65	11,21	16,72	0,27
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4
<b>PMAO2</b>	Dekantirana frakcija	41,1	42,2	9,1	2	5,6
	Frakcija 4000 rpm	33,04	34,29	9,8	21,59	1,28
	Frakcija 14000 rpm	37,55	32,64	10,21	18,38	1,22
	Frakcija140000 rpm	29,63	35,76	11,26	22,7	0,65
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4



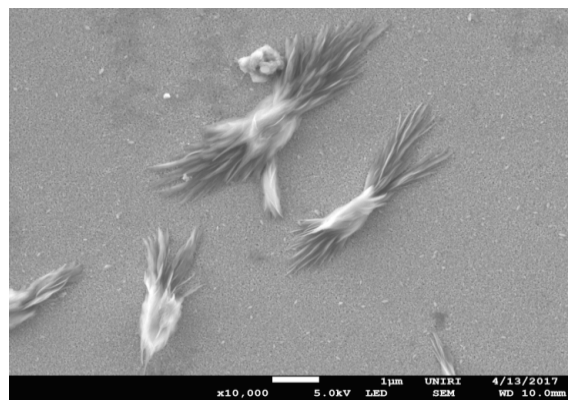
**Panel A**



**Panel C**

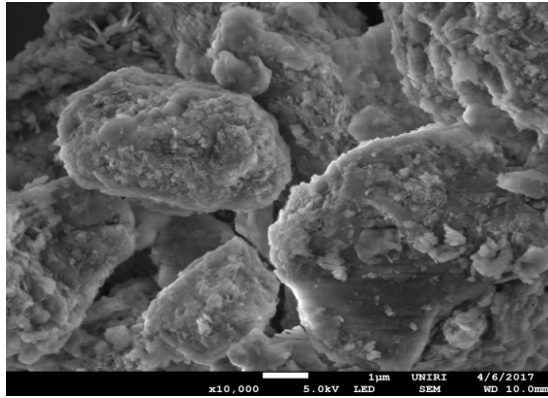


**Panel B**

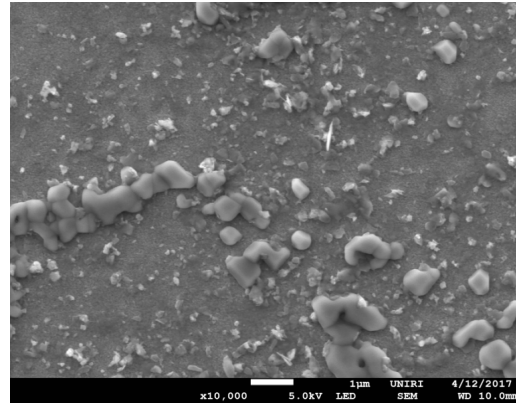


**Panel D**

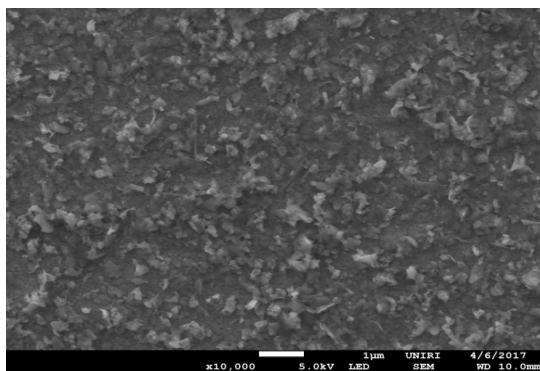
**Slika 9.** Supernatant suspenzije zeolita A u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16% (panel A), 16 % (panel B), 16,96% (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.



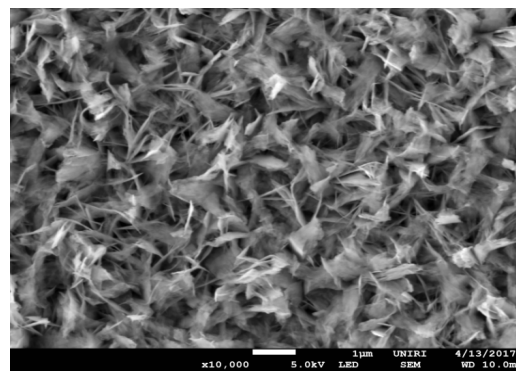
**Panel A**



**Panel C**

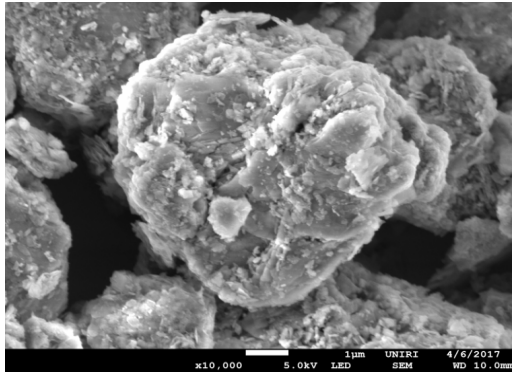


**Panel B**

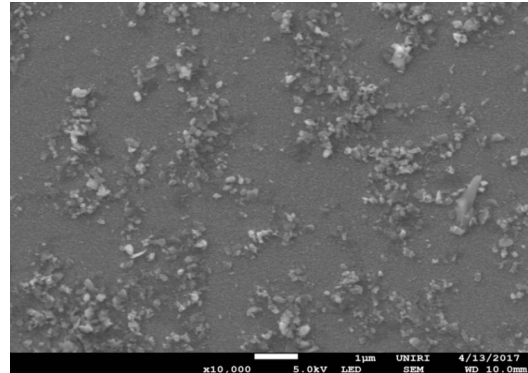


**Panel D**

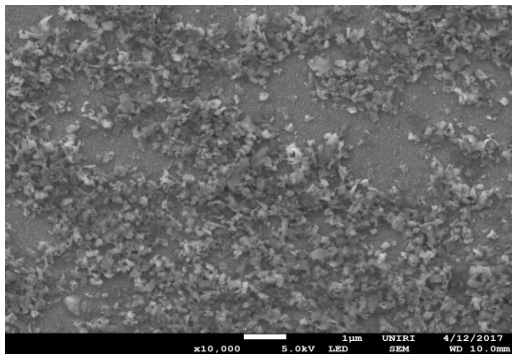
**Slika 10.** Supernatant suspenzije TMAZ u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x



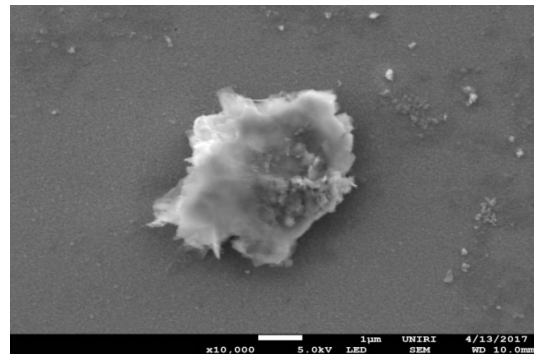
**Panel A**



**Panel C**

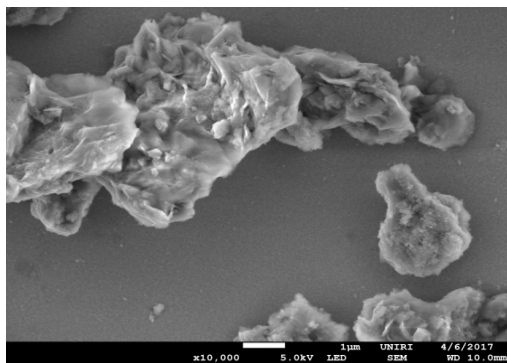


**Panel B**

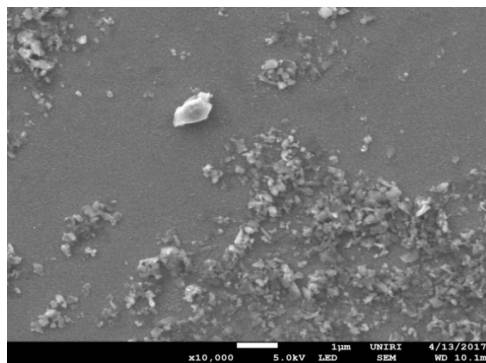


**Panel D**

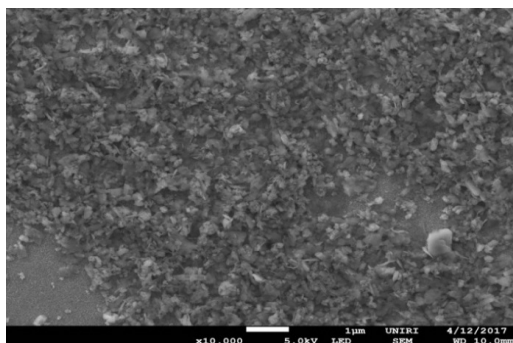
**Slika11.** Supernatant suspenzije PMA u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.



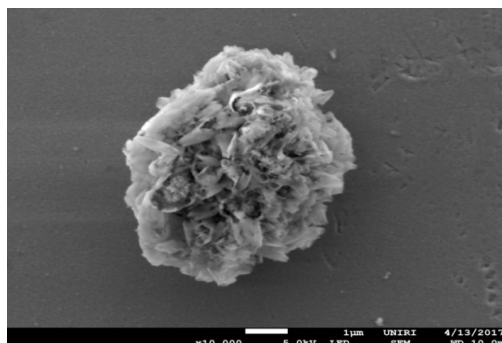
**Panel A**



**Panel C**



**Panel B**



**Panel D**

**Slika 12.** Supernatant suspenzije PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.

Nadalje, koristeći rezultate EDS analize za elemente Si i Al, izračunali smo i omjer Si/Al za testirane zeolite (tablica 14) u uzorcima koji su dobiveni dekantiranjem i centrifugiranjem suspenzija u mQ H<sub>2</sub>O te zeolita u krutom stanju. Prosječni omjer Si/Al bio je veći u centrifugiranim frakcijama zeolita u odnosu na omjer Si/Al zeolita u krutom stanju. Očito je da struktura zeolita se mijenja nakon centrifugiranja i da se u uzorcima detektira neka druga silikatna struktura. Omjer Si/Al ispitanih površina zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> u dekantiranim frakcijama temeljem EDS analize bio je za ZA 0,94 (omjer Si/Al za ZA u krutom stanju 1,41), za TMAZ 6,45; PMA = 6,86 i za PMAO<sub>2</sub> = 7,33 što je za sva tri klinoptilolitna zeolita približno jednako omjeri Si/Al za iste materijale u krutom stanju (Si/Al = 6,25–6,98).



**Tablica 14.** Omjer (Si/Al) testiranih zeolita (ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub>) u krutom stanju, dekantiranoj frakciji iz suspenzije zeolita u mQ H<sub>2</sub>O te u supernatantima nakon centrifugiranja suspenzije zeolita u mQ H<sub>2</sub>O pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm. Vrijednosti za Si i Al prikazane su u prosječnim masenim (w ) postocima (%) iz čega se izračunao omjer Si/Al.

Materijal	Frakcija	Prosječni maseni postoci (w%) za Si i Al te omjer Si/Al		
		Si	Al	Si/Al
<b>Zeolit A</b>	Dekantirana frakcija	16	16,62	0,94
	Frakcija 4000 rpm	16	1,4	11,42
	Frakcija 14000 rpm	16,96	0,22	77
	Frakcija140000 rpm	12	2,91	4,12
	Zeolit u krutom stanju	46,73	33,13	1,41
<b>TMAZ</b>	Dekantirana frakcija	37,45	5,8	6,45
	Frakcija 4000 rpm	46,23	0,73	63,32
	Frakcija 14000 rpm	26,2	0,55	47,63
	Frakcija140000 rpm	15	0,1	150
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3	9,3-11,4	6,25-6,98
<b>PMA</b>	Dekantirana frakcija	39,83	5,8	6,86
	Frakcija 4000 rpm	40,66	0,86	47,27
	Frakcija 14000 rpm	36,11	1,17	30,86
	Frakcija140000 rpm	45,15	0,27	167
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3	9,3-11,4	6,25-6,98
<b>PMAO2</b>	Dekantirana frakcija	41,1	5,6	7,33

	Frakcija 4000 rpm	33,04	1,28	25,81
	Frakcija 14000 rpm	37,55	1,22	30,77
	Frakcija 140000 rpm	29,63	0,65	45,58
	Zeolit u krutom stanju	65-71,3	9,3-11,4	6,25-6,98

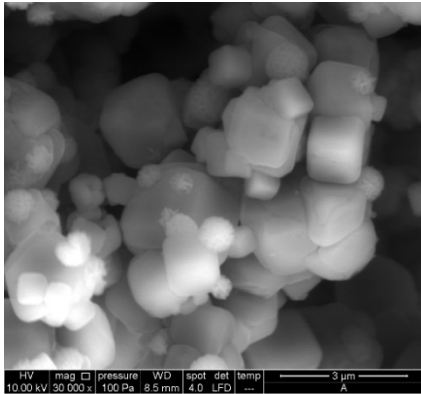
**Tablica 15.** Prosječna vrijednost omjera Si/Al površina zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u krutom stanju i supernatantima suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O centrifugiranim pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm (**prosjeck centrifugiranih ovih frakcija**).

Tip zeolita	Kruto stanje (prosječna vrijednost Si/Al)	Centrifugirane frakcije (prosječna vrijednost Si/Al)
<b>ZA</b>	1,41	30,84
<b>TMAZ</b>	6,25-6,98	86,98
<b>PMA</b>	6,25-6,98	81,71
<b>PMAO2</b>	6,25-6,98	34,05

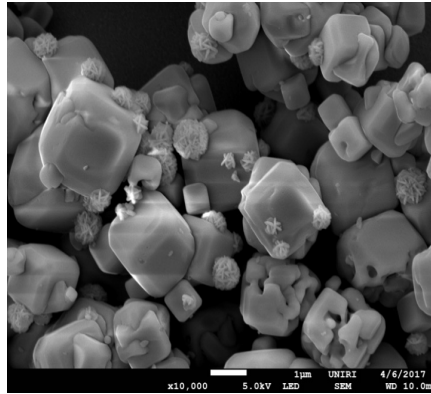
**Tablica 16.** Prosječna vrijednost omjera Si/Al površina zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u krutom stanju i dekantiranih frakcija ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O.

Tip zeolita	Kruto stanje (prosječna vrijednost Si/Al)	Dekantirane frakcije (prosječna vrijednost Si/Al)
<b>ZA</b>	1,41	0,94
<b>TMAZ</b>	6,25-6,98	6,45
<b>PMA</b>	6,25-6,98	6,86
<b>PMAO2</b>	6,25-6,98	7,33

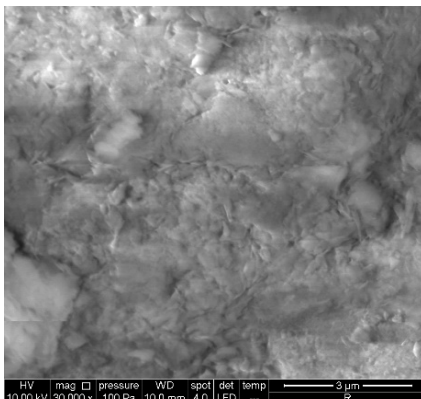
Ovaj usporedivi omjer Si/Al u krutim materijalima testiranih zeolita i dekantiranim talozima suspenzija zeolita u mQ vodi se reflektira na izgled materijala utvrđen SEM analizom pri čemu je karakteristična struktura zeolita u krutom stanju zadržana i u dekantiranim talozima (slika 13).



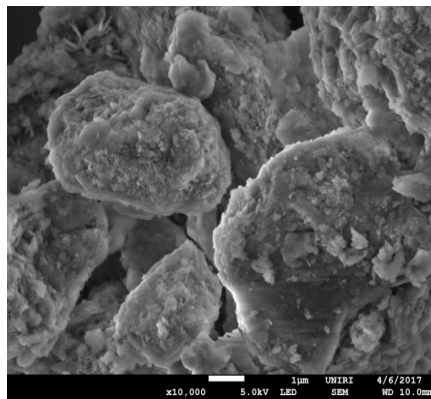
**Zeolit A - kruti materijal**



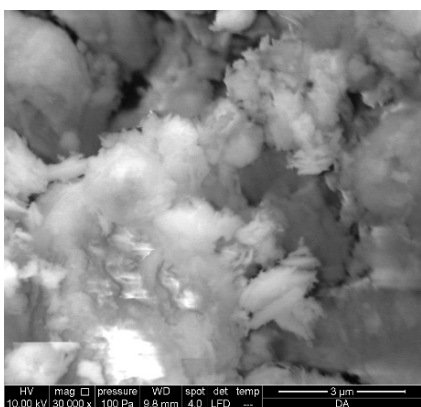
**Zeolit A – dekantirani talog**



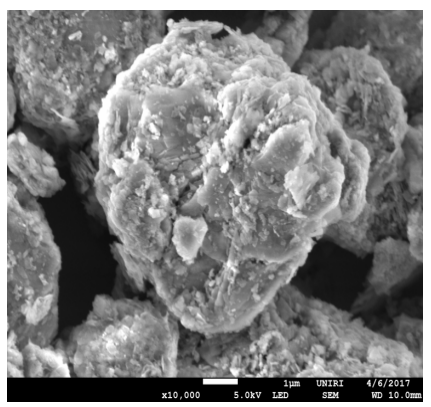
**TMAZ – kruti materijal**



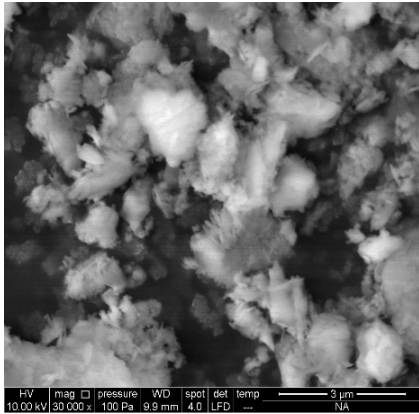
**TMAZ - dekantirani talog**



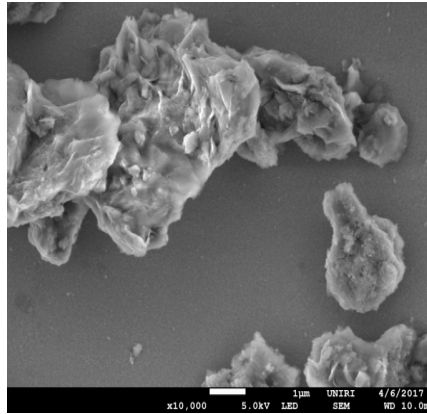
**PMA - kruti materijal**



**PMA – dekantirani talog**



**PMAO2 - kruti talog**



**PMAO2 - dekantirani talog**

**Slika 13.** Usporedba izgleda površina ispitanih zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u krutim suhim uzorcima i talozima dekantiranih uzoraka iz suspenzija mQ vode. Slike krutih uzoraka su snimljene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM QUANTA FEG 250 FEI (povećanje 30000x). Slike dekantiranih taloga snimljene su uz pomoć elektronskog mikroskopa JEOL JSM-7800F (povećanje 10000x).

#### **4.2.2. Analiza površine testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u otopini D-glukoze uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS**

Za analizu potencijala adsorpcije i/ili interakcije D-glukoze na površinu testiranih zeolitnih materijala ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 korištene su metode analize EDS i SEM. Pripremljene su suspenzije zeolita s otopinom D-glukoze kao što je opisano i poglavlju Materijali i metode te su se za analizu koristili talozi i supernatanti nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. U dobivenim uzorcima taloga i supernatanta nakon centrifugiranja je određen prosječni maseni postotak (w%) za elemente Si, O, C, Na i Al. Sastav taloga nakon centrifugiranja je uspoređen sa sastavom određenog zeolita u krutom stanju. Rezultati EDS analize za taloge zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 nakon centrifugiranja pri 4000 rpm, predstavljeni su u (tablica 17). U krutom stanju ispitanih zeolita nije utvrđena prisutnost atoma ugljika. Međutim, u talogu zeolita inkubiranog s otopinom D-glukoze utvrđena je prisutnost ugljika. To ukazuje na adsorpciju ili interakciju D-glukoze na površinu zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2. Za zeolit A maseni postotak ugljika u talogu bio je 41,04 %, a za prirodne klinoptilolitne materijale TMAZ, PMA, PMAO2 bio je u rasponu od 32,46 % do 35,18 %. Najveći je postotak ugljika u talogu izmjeren za zeolit PMA pri čemu je w % adsorpcije i/ili interakcije ugljika bio 35,18 %.

**Tablica17.** Rezultati EDS analize za krute materijale i taloge zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 nakon centrifugiranja suspenzija zeolita u mQ H<sub>2</sub>O uz inkubaciju s otopinom D-glukoze nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. Rezultati su prikazani kao prosječni maseni postotak (w%) elemenata Si, O, C, Na, Al.

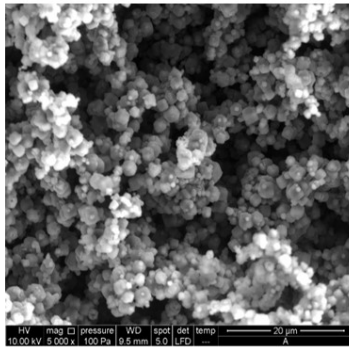
Materijal	Frakcija	Prosječni maseni postotak (w%) elemenata				
		Si	O	C	Na	Al
<b>Zeolit A</b>	Talog nakon centrifugiranja pri 4000 rpm	4,21	45,09	41,04	4,69	4,97
	Kruti materijal	46,73		/	16,36	33,13
<b>TMAZ</b>	Talog nakon centrifugiranja pri 4000 rpm	14,75	47,40	33,04	/	2,68
	Kruti materijal	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4
<b>PMA</b>	Talog nakon centrifugiranja pri 4000 rpm	14,77	43,98	35,18	/	2,7
	Kruti materijal	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4
<b>PMAO2</b>	Talog nakon centrifugiranja pri 4000 rpm	15,91	45,13	32,46	/	3,02
	Kruti materijal	65-71,3		/	0,2-1,3	9,3-11,4

Rezultati dobiveni EDS analizom za supernatante suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 inkubirane s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm predstavljeni su u tablici 18. Elementni sastav dobivenih supernatanta zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 nakon inkubacije s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm, uspoređen je sa sastavom supernatanta zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O također nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. U supernatantima zeolita u mQ H<sub>2</sub>O maseni postotak ugljika bio je 14,21 % za ZA, dok je za TMAZ, PMA, PMAO2 bio u rasponu od 9,8 % do 11,08 %. Vjerojatno je ugljik u ovim uzorcima podrijetlom iz ugljikovih plinova oslobođenih nakon centrifugiranja. U supernatantima zeolita u otopini D-glukoze maseni postotak ugljika bio je očekivano veći te je iznosio 48,13 % za ZA, dok je za TMAZ, PMA, PMAO2 bio je rasponu od 55,24 % do 64,17 %.

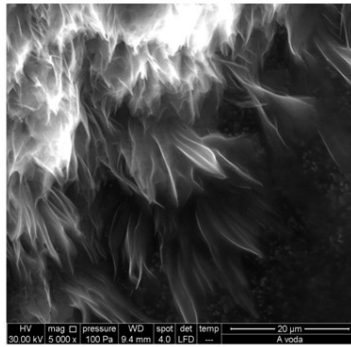
**Tablica 18.** Rezultati EDS analize za supernatante zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O bez ili uz inkubaciju s otopinom D-glukoze nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. Rezultati su prikazani kao prosječni maseni postotak (w %) elemenata Si, O, C, Na, Al.

Uzorak	Elementi u prosječnim masenim postocima (w %)				
	Si	O	C	Na	Al
<b>Supernatant nakon centrifugiranja pri 4000 rpm</b>					
<b>Zeolit A + D-glukoza</b>	0,08	51,48	48,13	0,17	/
<b>Zeolit A + mQ voda</b>	16	38,6	14,21	29,79	1,4
<b>TMAZ + D-glukoza</b>	0,12	35,89	62,99	0,22	0,48
<b>TMAZ + mQ voda</b>	46,23	27,9	10,5	16,64	0,73
<b>PMA + D-glukoza</b>	0,05	34,79	64,17	0,52	/
<b>PMA + mQ voda</b>	40,66	36,61	11,08	10,79	0,86
<b>PMAO2 + D-glukoza</b>	0,30	43,79	55,24	0,19	/
<b>PMAO2 + mQ voda</b>	33,04	34,29	9,8	21,59	1,28

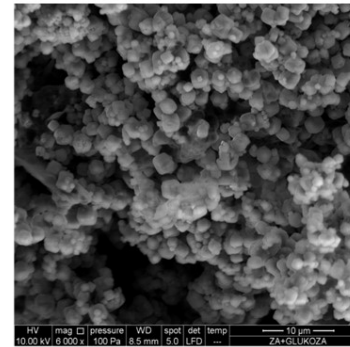
Analiza površine testiranih zeolita inkubiranih u otopini D-glukoze provedena je uz pomoć elektronske mikroskopije SEM (slike 14,15,16,17). Na slikama se mogu vidjeti formacije nalik na hidrogel u supernatantima suspenzije zeolita i D-glukoze (slike panel B) dok veće promijene nisu utvrđene na slikama taloga (slike panel C). Daljnjom analizom taloga i supernatanta uz pomoć EDS utvrđena je povećana količina ugljika što u oba slučaja ukazuje na interakciju i/ili adsorpciju D-glukoze na materijale (tablica 18). Talog ZA nakon inkubacije s D-glukozom i nakon centrifugiranja pri 4000 rpm sadržavao je 41,04 % C dok je taj postotak za prirodne klinoptilolitne materijale bio 33,04 % za TMAZ, 35,18 % za PMA i 32,46 % za PMAO2 (Tablica 17). Zanimljivo, u usporedbi s rezultatima supernatanta suspenzija zeolitnih materijala u mQ H<sub>2</sub>O gdje je postotak Na<sup>+</sup> iona bio povećan nakon centrifugiranja, u otopinama zeolita s D-glukozom Na<sup>+</sup> nije detektiran nakon centrifugiranja. To je vjerojatno zbog promjena površine zeolita u D-glukozi koja može uključivati stvaranje tankog sloja šećera, a što je moglo spriječiti proces ionske izmjene s okolinom koji se javljaju između pora zeolita i kanala koji sadrže različite katione.



**Panel A**



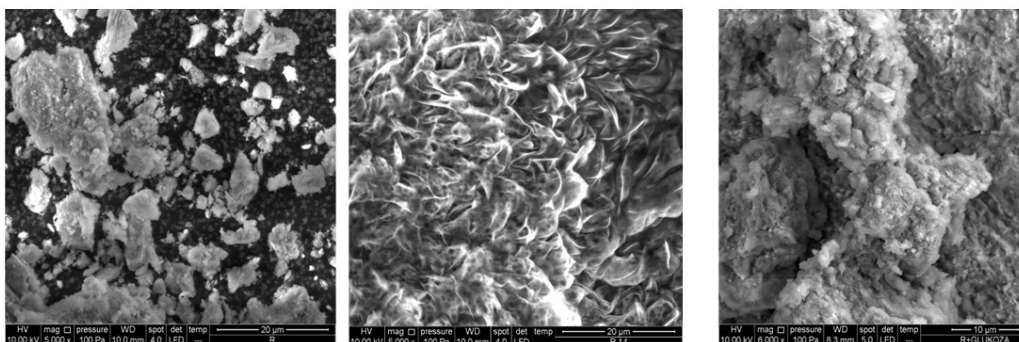
**Panel B**



**Panel C**

**Slika 14.** SEM slike krutog zeolita A (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.



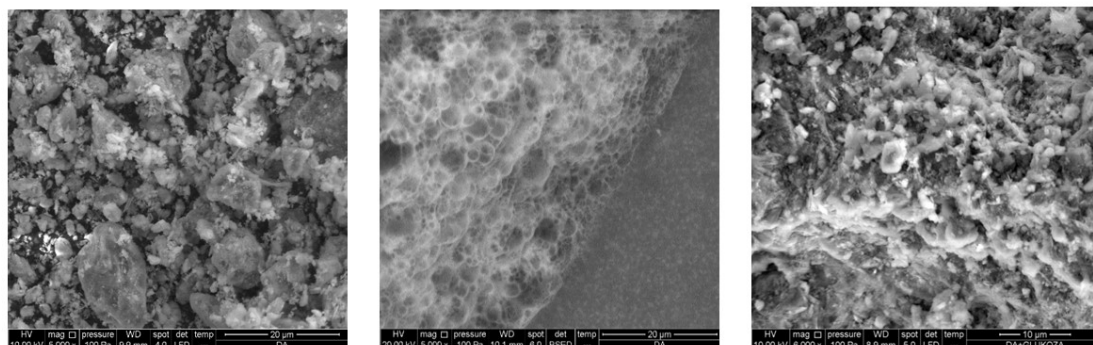


**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika 15.** SEM slike krutog zeolita TMAZ (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

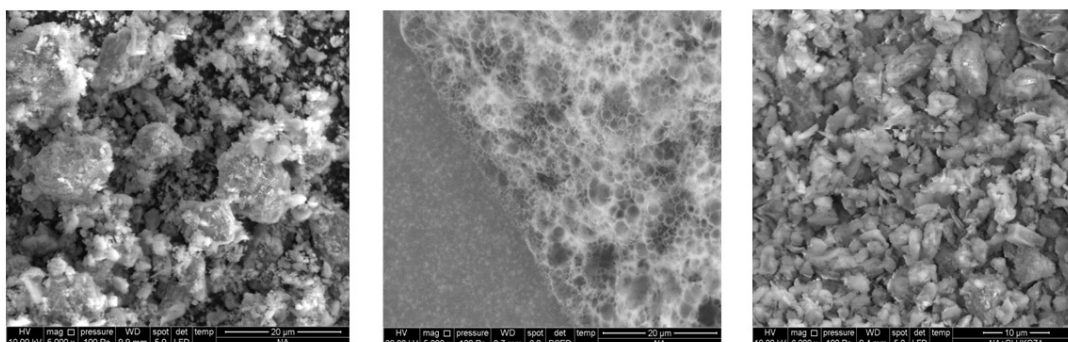


**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika16.** SEM slike krutog zeolita PMA (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.



**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika17.** SEM slike krutog zeolita PMAO2 (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

#### **4.2.3. Analiza površine testiranih zeolita ZA,TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnim otopinama želucai crijeva uz pomoć skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i elementne analize EDS**

Analiza adsorpcije D-glukoze na površinu klinoptilolitnih materijala ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 u modelnim otopinama želucai crijeva provedena je uz pomoć elektronske mikroskopije SEM u kombinaciji s elementnom analizom EDS. Suspenzija zeolita je nakon inkubacije s D-glukozom u mQ H<sub>2</sub>O i modelnim otopinama želuca(pH =1,94) i crijeva (pH = 5,7) podvrgnuta centrifugiranju pri 4000 rpm. Slike uzoraka prikazane su na slikama18 – 21 (slike 18 – 21). Talози su podvrgnuti i analizi EDS kako bi se analizirala adsorpcija glukoze i/ili interakcije na testiranim površinama zeolita u modelnim otopinama kao promjena masenog postotka (w%) ugljika na površinama zeolitnih materijala. Rezultati su prikazani u tablici 19 (tablica 19).

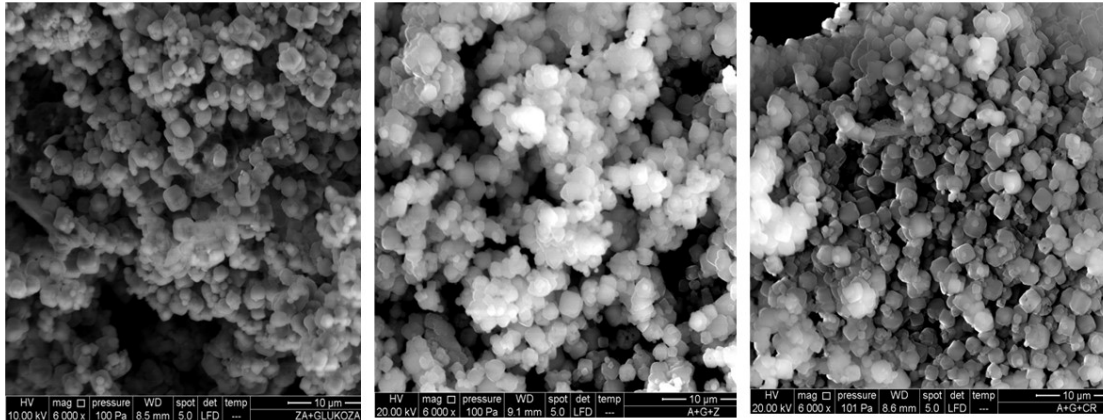
Tanki sloj D-glukoze kao i u pokusima inkubacije zeolita s otopinom D-glukoze u mQ H<sub>2</sub>O, također nije ili je jedva bio vidljiv na površinama zeolita u kiselim modelnim

otopinama D-glukoze želuca i crijeva. Međutim, povećani w% ugljika ukazuje na vezanje i/ili interakciju određene količine D-glukoze za površinu materijala. Sukladno tomu, može se pretpostaviti i potencijalna adsorpcija i/ili interakcija D-glukoze na površinu zeolita u probavnom sustavu u *in vivo* uvjetima. Međutim, ovu bi mogućnost trebalo zasebno istražiti u složenijim intestinalnim modelima.

Za razliku od Zeolita A koji je adsorbirao i/ili stupio u interakciju s D-glukozom, prirodni klinoptiloliti materijali adsorbirali su i/ili imali interakciju s D-glukozom u višoj stopi u modelnim otopinama želuca i crijeva. Na primjer, u otopini intestinalnog modela (pH = 5,7), postotak C bio je za TMAZ 51,02%, PMA 67,85% i PMAO2 65,11% (tablica 19). Ti su postoci bili viši od postotaka izmjerenih za zeolite TMAZ, PMA, PMAO2 u otopini D-glukoze u mQ H<sub>2</sub>O. U modelnoj otopini želuca, elementna analiza nije dala podatke za C što može biti posljedica visokih razina otpuštenih atoma Si i Al s površine materijala pri vrlo niskom pH (pH = 1,94).

**Tablica 19.** Elementna EDS analiza taloga suspenzija testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 inkubiranih u otopini D-glukoze 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O te u modelnim otopinama želuca (pH =1,94) i crijeva (pH = 5,7) nakon centrifugiranja pri 4000 rpm.

Materijal / talozi	Elementi u prosječnim masenim postocima (w %)				
	Si	O	C	Na	Al
<b>Zeolit A + D-glukoza u mQ vodi</b>	4,21	45,09	41,04	4,69	4,97
<b>Zeolit A + D-glukoza u modelnoj otopini želuca</b>	7,45	50,20	26,83	6,81	8,71
<b>Zeolite A + glukoza u modelnoj otopini crijeva</b>	5,77	46,68	34,46	6,36	6,63
<b>TMAZ + D-glukoza u mQ vodi</b>	14,75	47,40	33,04	/	2,68
<b>TMAZ + D-glukoza u modelnoj otopini želuca</b>	23,28	62,60	/		5,29
<b>TMAZ + D-glukoza u modelnoj otopini crijeva</b>	7,87	37,74	51,02	0,75	1,46
<b>PMA + D-glukoza u mQ vodi</b>	14,77	43,98	35,18	/	2,7
<b>PMA + D-glukoza u modelnoj otopini želuca</b>	2,11	33,61	62,43	/	0,43
<b>PMA + D-glukoza u modelnoj otopini crijeva</b>	1,71	27,35	67,85	/	0,54
<b>PMAO2 + D-glukoza u mQ vodi</b>	15,91	45,13	32,46	/	3,02
<b>PMAO2 + D-glukoza u modelnoj otopini želuca</b>	17,52	60,01	/	/	14,20
<b>PMAO2 + D-glukoza u modelnoj otopini crijeva</b>	1,33	27,61	65,11	/	1,83

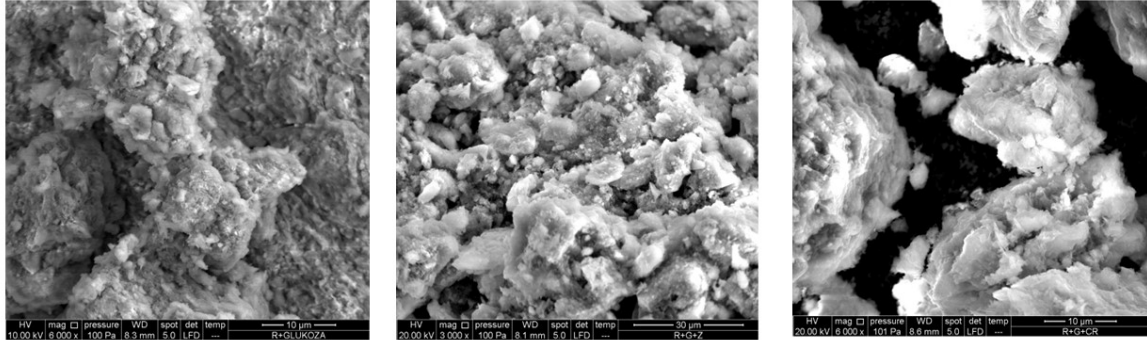


**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika 18.** Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate ZA u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.

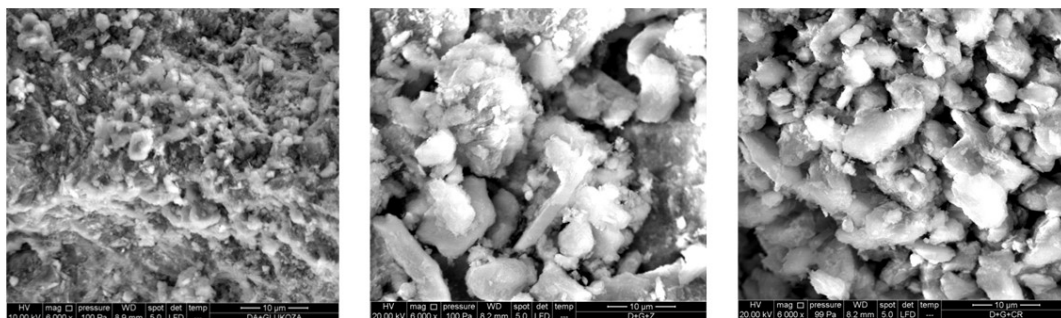


**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika 19.** Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate TMAZ u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 3000x ili 6000x.



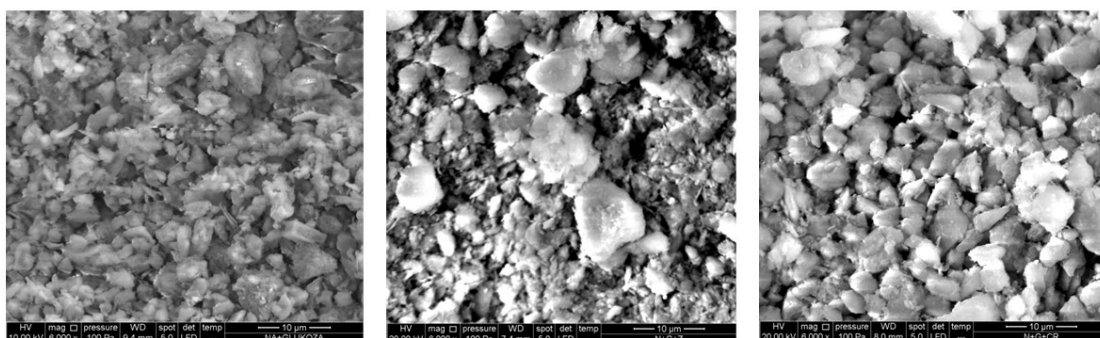
**Panel A**

**Panel B**

**Panel C**

**Slika 20.** Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate PMA u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.





Panel A

Panel B

Panel C

**Slika 21.** Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate PMAO<sub>2</sub> u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.

#### **4.3. Kvantifikacija interakcije i/ili vezanja D-glukoze na površinu sintetskog ZA i klinoptilolitne zeolite TMAZ, PMA i PMAO2 uz pomoć tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti (UHPLC)**

Vežanje i/ili interakcija D-glukoze na površinu sintetskog ZA i prirodne klinoptilolitne zeolitne materijale TMAZ, PMA i PMAO2 provedena je uz pomoć tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti UHPLC. U tu svrhu pripremljene su suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 koje su inkubirane s otopinom D-glukoze te su talozi odvojeni od supernatanta centrifugiranjem pri 4000 rpm. Analizom uzoraka utvrđeno je kako je koncentracija D-glukoze nakon inkubacije sa zeolitom ZA smanjena za 11,85 %, koncentracija D-glukoze nakon inkubacije sa zeolitom TMAZ smanjena za 11,34 %, koncentracija D-glukoze nakon inkubacije sa zeolitom PMA smanjena je za 10,82% te koncentracija D-glukoze nakon inkubacije sa zeolitom PMAO2 smanjena za 8,76% u usporedbi s kontrolnom otopinom D-glukoze bez zeolita. Usporedba efikasnosti vezanja D-glukoze za površinu testiranih zeolita provedena je i za D-fruktozu, saharozu i laktozu. Rezultati su prikazani u tablicama 20 – 23 (tablice 20 – 23).

**Tablica 20.** Rezultati analize UHPLC i kvantifikacija D-glukoze. Rezultati su dobiveni za suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 nakon inkubacije s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Razlika koncentracije D-glukoze ( $\Delta$ ) u postotku dana je usporedbom kontrolne otopine D-glukoze i supernatanta nakon centrifugiranja. Kontrola: otopina D-glukoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za glukozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

<b>Materijal</b>	<b>Koncentracija (mg/ml)</b>
D-glukoza u mQ vodi	1,94
Zeolit A + D-glukoza	1,71
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>11,85 %</b>
D-glukoza u mQ vodi	1,94
TMAZ + D-glukoza	1,72
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>11,34 %</b>
D-glukoza u mQ vodi	1,94
PMA + D-glukoza	1,73
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>10,82 %</b>
D-glukoza u mQ vodi	1,94
PMAO2 + D-glukoza	1,77
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>8,76 %</b>

UHPLC analiza je pokazala kako je koncentracija glukoze nakon inkubacije 24 h sa zeolitom ZA smanjena za 11,85 %, nakon inkubacije sa zeolitom TMAZ smanjena za 11,34 %, nakon inkubacije sa zeolitom PMA smanjena za 10,82 % i nakon inkubacije sa zeolitom PMAO2 smanjena za 8,76 % u usporedbi s kontrolnom otopinom D-glukoze bez zeolita.

**Tablica 21.** Rezultati analize UHPLC i kvantifikacija D-fruktoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 nakon inkubacije s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm0 rpm i prikazani su kao koncentracije D-fruktoze u mg/ml. Razlika koncentracije D-glukoze ( $\Delta$ ) u postotku dana je usporedbom kontrolne otopine D-fruktoze i supernatanta nakon centrifugiranja. Kontrola: otopina D-fruktoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za D-fruktozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

<b>Materijal</b>	<b>Koncentracija (mg/ml)</b>
D-Fruktoza u mQ vodi	1,71
Zeolit A + D-fruktoza	1,59
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>7 %</b>
D-Fruktoza u mQ vodi	1,71
TMAZ + D-fruktoza	1,52
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>1,11 %</b>
D-Fruktoza u mQ vodi	1,71
PMA + D-fruktoza	1,66
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>3 %</b>
D-Fruktoza u mQ vodi	1,71
PMAO2 + D-fruktoza	1,67
<b><math>\Delta</math> vrijednost (%)</b>	<b>2,33 %</b>

UHPLC analiza je pokazala kako je koncentracija D-fruktoze nakon inkubacije 24 h sa zeolitom ZA smanjena za 7 %, nakon inkubacije sa zeolitom TMAZ smanjena za 11,11 %, nakon inkubacije sa zeolitom PMA smanjena za 3 % i nakon inkubacije sa zeolitom PMAO2 smanjena za 2,33 % u usporedbi s kontrolnom otopinom D-fruktoze bez zeolita.

**Tablica 22.** Rezultati UHPLC i kvantifikacija saharoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 sa saharozom, nakon centrifugiranja na 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Kontrola: otopina saharoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za saharozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL

<b>Materijal</b>	<b>Koncentracija (mg/ml)</b>
Saharoza u mQ vodi	1,74
Zeolit A + saharoza	1,70
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>2,29 %</b>
Saharoza u mQ vodi	1,74
TMAZ + saharoza	1,71
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>1,75 %</b>
Saharoza u mQ vodi	1,74
PMA + saharoza	1,71
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>1,75 %</b>
Saharoza u mQ vodi	1,74
PMAO2 + saharoza	1,71
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>1,75 %</b>

UHPLC analiza je pokazala kako je koncentracija saharoze nakon inkubacije sa zeolitom ZA smanjena za 2,29 %, nakon inkubacije sa zeolitom TMAZ smanjena za 1,73 %, nakon inkubacije sa zeolitom PMA smanjena za 1,75 % i nakon inkubacije sa zeolitom PMAO2 smanjena za 1,75 % u usporedbi s kontrolnom otopinom saharoze bez zeolita (tablica 22).

**Tablica 23.** Rezultati UHPLC i kvantifikacija laktoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 sa saharozom, nakon centrifugiranja na 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Kontrola: otopina saharoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za laktozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

<b>Materijal</b>	<b>Koncentracija (mg/ml)</b>
Laktoza u mQ vodi	1,93
Zeolit A + laktoza	1,70
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>11,92 %</b>
Laktoza u mQ vodi	1,93
TMAZ + laktoza	1,80
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>6,73 %</b>
Laktoza u mQ vodi	1,93
PMA + laktoza	1,69
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>12,43 %</b>
Laktoza u mQ vodi	1,93
PMAO2 + laktoza	1,85
<b>Δ vrijednost (%)</b>	<b>4,93 %</b>

Rezultati UHPLC analize pokazali su kako je koncentracija laktoze nakon inkubacije sa zeolitom ZA smanjena za 11,92 %, nakon inkubacije sa zeolitom TMAZ smanjena za 6,73 %, nakon inkubacije sa zeolitom PMA smanjena za 12,43 % i nakon inkubacije sa zeolitom PMAO2 smanjena za 4,93 % u usporedbi s kontrolnom otopinom laktoze bez zeolita (tablica 23).

#### 4.4. *In vivo* studija na miševima

##### 4.4.1. Oralni test razina D-glukoze u krvi u miševa tretiranih s PMA i D-glukozom te predtretiranih s PMA i naknadno tretiranih s D-glukozom

S obzirom da je u *in vitro* pokusima utvrđeno vezanje i/ili interakcija D-glukoze s površinom testiranih zeolitnih materijala, provedeno je istraživanje *in vivo* na zdravim miševima s ciljem utvrđivanja potencijalne interakcije zeolita s D-glukozom u organizmu. Pokus je dizajniran za analizu učinka PMA zeolita na razine glukoze u krvi uz pomoć oralnog test razina glukoze u krvi. PMA zeolit je odabran s obzirom da je ovaj materijal registriran u Europskoj uniji kao medicinski proizvod (registracija prema direktivi: European directive 93/42/EEC) za uporabu u ljudi.

Na dan testiranja razina D-glukoze u krvi, životinjama je aplicirana D-glukoza (2 g/kg) kao tretman zajedno s PMA zeolitom (4 g/kg) ili je proveden predtretman s PMA zeolitom (4 g/kg) u sirovom obliku 3 dana prije davanja D-glukoze na dan testiranja razina glukoze u krvi (2 g/kg). U pokusu su korištene kontrole bez ikakvog tretmana (negativna kontrola), miševi tretirani samo PMA zeolitom (4 g/kg) i miševi tretirani samo D-glukozom (2 g/kg). Rezultati analize razina D-glukoze u krvi testiranih životinja prikazani su u tablici 24 (tablica 24) u mmol/L za vremenske intervale mjerenja 15 min, 30 min, 60min i 120min nakon odgovarajućih tretmana. Rezultati ukazuju na to kako su se razine glukoze u krvi smanjile u odnosu na pozitivnu kontrolu koja je primala samo D-glukozu u životinja s predtretmanom s PMA i naknadnim tretmanom s D-glukozom i životinjama s tretmanom PMA i D-glukoze (tablica 24).

**Tablica 24.** Rezultati analize razina D-glukoze u krvi miševa za kombinirani tretman PMA + D-glukoza i predtretman s PMA prije davanja D-glukoze. Rezultati su prikazani kao koncentracija D-glukoze u krvi u mmol/L za kontrolne skupine i tretmane u vremenskim 15 min, 30 min, 60 min i 120 min.

Vrijeme (min)	Prosječna koncentracija D-glukoze u krvi ( mmol/L)				
	Negativna kontrola	PMA	PMA + D-glukoza	Predtretman s PMA + D-glukoza	D-glukoza
15	5,3	6,2	14,7	14,3	16,9
30	6,5	6,5	16,0	16,9	19,6
60	6,1	5,7	12,6	12,7	13,7
120	4,1	4,6	5,5	6,5	6,8

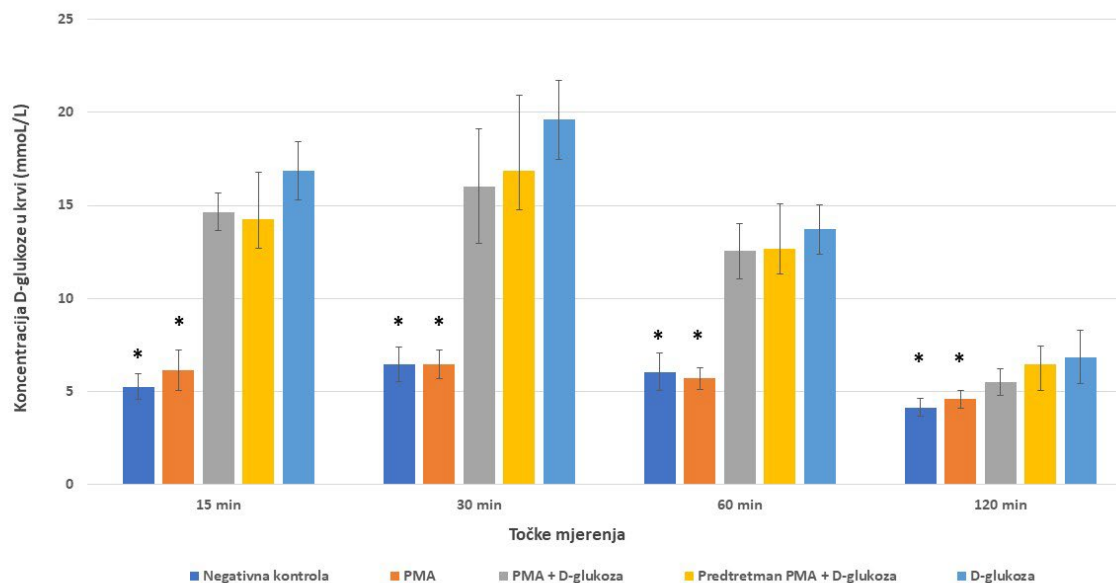
Međutim, razina D-glukoze u istovremenom tretmanu PMA i D-glukoze iznosila je 13 % nakon 15 min i 18 % nakon 30 min bez statističke značajnosti (tablica 25). Smanjenje razina D-glukoze u krvi za 15 % opservirano je u miševa u predtretmanu sa PMA zeolitom i naknadnim tretmanom s D-glukozom nakon 15 min sa statističkom značajnošću ( $p > 0.001$ ) i 14% nakon 30 min bez statističke značajnosti (tablica 25). Postoci smanjenja razine D-glukoze u krvi miševa bili su usporedivi sa prethodno utvrđenim postocima UHPLC analize pri čemu se D-glukoza vezala za PMA-zeolit u postotku do 10,82 %.

**Tablica 25.** Prosječni postoci sniženja razina D-glukoze u krvi miševa u istovremenom tretmanu PMA i D-glukoze te predtretmanu s PMA i naknadnom tretmanu s D-glukozom. Rezultati su prikazani kao postoci (%) smanjenja razine D-glukoze u krvi izmjerenih nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min.

<b>Vrijeme mjerjenja (min)</b>	<b>Prosječni % smanjenja razina D-glukoze u krvi (tretman PMA + D-glukoza)</b>	<b>Prosječni % smanjenja razina D-glukoze u krvi (predtretman PMA + D-glukoza)</b>
15	13%	15%
30	18%	14%
60	8%	7%
120	19%	4%

Rezultati su grafički prikazani na slici 22 (slika 22).





**Slika 22.** Razine D-glukoze u krvi miševa izmjerene u mmol/L u istovremenom tretmanu PMA-zeolit + D-glukoza te predtretmanu s PMA-zeolitom i naknadnom tretmanu s D-glukozom. Rezultati su prikazani kao koncentracije razina D-glukoze u mmol/L u krvi izmjereno nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min. Statistički značajne razlike (označeno zvjezdicom \*) u koncentraciji D-glukoze u krvi miševa također su utvrđene usporedbom pozitivne kontrole tretirane s D-glukozom sa negativnom kontrolom i skupinom životinja tretiranom samo s PMA-zeolitom ( $p > 0,05$ ).

Osim razina D-glukoze u miševa, mjereni su i relevantni biokemijski parametri sa svrhom praćenja eventualnih biokemijskih promjena uzrokovanih samim tretmanom s PMA-zeolitom. PMA-zeolit nije uzrokovao promijene mjerenih parametara (tablica 26). Međutim, omjer albumina i globulina, amilaza i ukupnih proteina su bili promijenjeni u tretmanu s D-glukozom .

**Tablica 26.** Biokemijski parametri izmjereni u krvi miševa tijekom *in vivo* pokusa. Test pune krvi je napravljen na uređaju Auto Hematology Analyzer BC-30 Vetfor (Mindray, Shenzhen, Kina): WBC – bijele krvne stanice; RBC – crvene krvne stanice; HB – hemoglobin; HCT – hematokrit; MCV -srednji korpuskularni volumen; MCH – srednji korpuskularni hemoglobin; MCHC – srednji korpuskularni hemoglobin koncentrat; PCT - trombociti; RWD – širina distribucije eritrocita. Jetreni testovi napravljeni su uz pomoć uređaja RC clinical chemistry analyzer (Scil Animal Care Company, Njemačka) nakon uzorkovanja s heparinom kako slijedi: Alanin aminotransferaza (ALT); Albumin (ALB); Alkalna fosfataza (ALP); Amilaza (AMY); Gama glutamiltransferaza (GGT); Glukoza (Glu); Kreatinin (CREA); Globulin (Glob); T bilirubin (TBIL); Urea (BUN); Albumin/Globulin omjer (A\_G); Fosfati (PHOS); Ukupni proteini (TP); Ukupni kolesterol(TC). Statistička značajnost ( $p < 0.05$ ) i *post hoc* usporedba grupa prikazane su u zadnja dva stupca.

	Negativna kontrola (grupa A)	PMA-zeolit (grupa B)	Tretman s PMA-zeolitom + D-glukoza (grupa C)	Predtretman s PMA-zeolitom + D-glukoza (grupa D)	D-glukoza (grupa E)	Statistička značajnost ( $p < 0.05$ )	post-hoc usporedba grupa
<b>ALB</b>	3,00±0,06	3,08±0,08	3,13±0,12	3,02±0,08	3,02±0,12	F = 2,195; df = 4; p = 0,099	
<b>TP</b>	5,47±0,14	5,62±0,10	5,65±0,23	6,10±0,89	5,72±0,42	F = 1,599; df = 4; p = 0,206	
<b>GLOB</b>	2,45±0,12	2,55±0,10	2,58±0,13	3,07±0,89	2,72±0,31	F = 1,841; df = 4; p = 0,152	
<b>A_G</b>	1,24±0,03	1,22±0,04	1,22±0,04	1,03±0,22	1,12±0,07	F = 3,868; df = 4; p = <b>0,014</b>	A,B,C vs D
<b>TB</b>	0,18±0,08	0,23±0,19	0,22±0,08	0,33±0,39	0,18±0,10	F = 0,553; df = 4; p = 0,698	
<b>GGT</b>	2,83±2,04	3,83±4,49	2,50±0,84	11,33±13,94	4,00±4,90	F = 1,645; df = 4; p = 0,194	
<b>ALT</b>	48,17±6,97	77,83±13,29	88,33±16,91	106,83±116,14	113,67±33,15	F = 1,340; df = 4; p = 0,283	
<b>ALP</b>	126,17±59,75	143,67±6,22	148,50±12,52	129,00±29,51	142,00±8,58	F = 0,604; df = 4; p = 0,663	
<b>AMY</b>	3.151,00±496,07	3.796,17±414,89	3.698,17±320,64	2.578,50±586,72	3.425,00±651,65	F = 5,574; df = 4; p = <b>0,002</b>	B,C vs D

<b>Crea</b>	0,12+-0,04	0,10+-0,00	0,12+-0,04	0,10+-0,00	0,10+-0,00	F = 0,750; df = 4; p = 0,567	
<b>BUN</b>	29,40+-2,77	30,95+-3,89	27,63+-3,73	25,05+-5,61	30,75+-4,46	F = 2,062; df = 4; p = 0,116	
<b>GLU</b>	109,36+-20,35	89,23+-26,99	84,60+-25,34	93,19+-24,43	70,70+-23,72	F = 2,001; df = 4; p = 0,125	
<b>TC</b>	91,32+-10,96	86,68+-11,73	94,13+-8,18	138,31+-40,05	100,26+-14,12	F = 6,103; df = 4; <b>p = 0,001</b>	A,B,C,E vs D
<b>Ca</b>	9,56+-0,11	9,66+-0,13	9,72+-0,20	9,95+-0,54	9,67+-0,19	F = 1,584; df = 4; p = 0,209	
<b>PHOS</b>	7,38+-1,06	6,77+-0,97	7,13+-1,47	8,97+-1,73	9,97+-1,41	F = 6,114; df = 4; <b>p = 0,001</b>	A,B,C vs E

## 5. RASPRAVA

Zeolit klinoptilolit je jedinstveni materijal čija je upotreba u medicinskim aplikacijama zadnjih godina značajno porasla. Tomu su razlog jedinstvena svojstva adsorpcije i ionske izmjene zeolita koja su dobro opisana u literaturi (Tessema et al. 2021.), te koja proizlaze iz velike aktivne površine i porozne alumosilikatne kristalne strukture ispunjene kationima. Naime, ionska izmjena zeolita klinoptilolita temelji se na prisutnosti izmjenjivih kationa u porama i šupljinama kristalne rešetke. S obzirom da su kationi u šupljinama vezani uz alumosilikatnu strukturu slabim elektrostatskim vezama, to omogućuje njihovu mobilnost u strukturu materijala i iz nje, što rezultira izmjenom iona s kationa iz okoline u stehiometrijskom omjeru. (Kraljević Pavelić et al. 2017.; Tessema et al. 2021.)

U ovom istraživanju fokusirali smo se na adsorpcijska svojstva zeolita klinoptilolita. Svojstva površine za adsorpciju zeolita se temelje na Brønsted-Lewisovoj teoriji prema kojoj postoje kisela i alkalna mjesta u strukturi zeolita. To znači da atom kisika u alumosilikatnoj strukturi zeolita ( $\equiv \text{Si-O-Al} \equiv$ ) je akceptor protona, ima negativan naboj i predstavlja potencijalno adsorpcijsko mjesto za pozitivne ione ili polarne organske molekule. (Atkins., 2009.) Ovakva kemijska struktura omogućuje stvaranje različitih interakcija s molekulama iz okoline što uključuje stvaranje ionske veze, dipol-dipol interakcije, dipol-inducirani dipol interakcije, vodikove veze (Manda et al., 2024.) ali i interakcija kojima su u podlozi Van der Waalsove sile ili vrlo specifične kemijske interakcije s određenim molekulama koje rezultiraju stvaranjem supramolekularnih struktura. (Tabacchi., 2018.)

S obzirom da glavnu ulogu u adsorpciji ima upravo status površine zeolita klinoptilolita, prvi dio istraživanja odnosio se na analizu površine materijala i pripadajućih suspenzija zeolita klinoptilolita i zeolita A kao sintetskog alumosilikata, u mQ H<sub>2</sub>O i modelnim otopinama želucaj crijeva što je relevantno za procjenu procesa u ljudskom probavnom traktu. Važan se rezultat odnosi na promjenu površine testiranih minerala u mQ H<sub>2</sub>O pri čemu je opaženo otpuštanje silicijevih (Si) formi u suspenziju. U literaturi je opisano kako topljivi oblici Si koji se oslobađaju s površine zeolita u vodi, tvore različite polimere s visokim afinitetom za vrste Al u reakciji kemijske ravnoteže u vodi. Primjerice, Jugdaohsingh i suradnici pokazali su *in vitro* da dolazi do interakcije između razrijeđenih otopina polimera silicijevog dioksida s visokim afinitetom prema Al i iona Al(III) što rezultira stvaranjem kristalnih nanočestica silicija bogatih Al (Jugdaohsingh et al., 2013.) Jugdaohsingh i suradnici (Jugdaohsingh et al., 2000.) su također pokazali kako je za ovaj efekt i visoki afinitet prema aluminiju nužan oligomerni, a ne monomerni oblik topljivog silicijevog dioksida te da upravo on smanjuje dostupnost i ulazak aluminija iz ljudskog gastrointestinalnog trakta u krv. Na isti način, čvrsta struktura zeolita koja oslobađa Si forme u vodenom okruženju, također stvara silicijeve forme s visokim afinitetom prema Al-formama iz okoline. Promjena u sastavu površine testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> u centrifugiranim frakcijama dokazana je EDS analizom te je bila vidljiva kao promjena omjera Si/Al materijala. Omjer Si/Al se

naime, povećao nekoliko puta u centrifugiranim frakcijama, potvrđujući prisutnost Si-formi u otopinama. Vizualizacijom uzoraka centrifugiranih frakcija uz pomoć SEM je isključena mogućnost da se radi o manjim česticama zeolitnih materijala jer su kristalni oblici centrifugiranih frakcija imali su potpuno drugačiji oblik od krutih uzoraka zeolitnih materijala. Opservirane čestice zeolita u dekantiranim frakcijama s druge strane, očekivano, održale su oblik i sadržaj zeolitnih materijala u čvrstom stanju. Za razliku međutim, od prirodnih klinoptilolitnih materijala TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub>, ZA otpušta i značajne količine aluminija što ima implikaciju za uporabu *in vivo* kao što pokazali Kraljević Pavelić i suradnici u pokusu sa štakorima hranjenim različitim zeolitima. U navedenoj studiji su izmjerene povećane količine aluminija u krvi štakora nakon hranjena sa ZA. (Kraljević Pavelić et al., 2017.) Istovremeno je s otpuštanjem silicija s površine klinoptilolitnih materijala, otpušteno manje od 3 % aluminijevih formi. Brzo stvaranje netopivih hidroksida te vezanje uz polimere silicija i ovu malu količinu otpuštenog aluminija čini inertnom s biološkog stajališta te se nakon konzumiranja zeolita klinoptilolita ne bilježi ulazak aluminija u krv. (Kraljević Pavelić et al., 2022.) Otpuštanje silicijevih formi vjerojatno je u podlozi niza prethodno opserviranih pozitivnih učinaka zeolita na organizam s obzirom da je poznato kako silicij primjerice, ima važnu ulogu u mineralizaciji kostiju i osteoporozi, sintezi kolagena i starenju kože, stanja kose i noktiju, aterosklerozi i Alzheimerovoj bolesti. (Jurkić et al., 2013.) Promjene površine zeolita klinoptilolita u različitim medijima poznate su u literaturi i kao aktivacija površine zeolita što se primjerice provodi uz pomoć kiseline (npr. HCl) ili soli (npr. NaCl). Naime, promijene na površini zeolita klinoptilolita koje se odvijaju u prisutnosti kiseline ili soli u vodenom mediju mogu poboljšati svojstva ionske izmjene poput primjerice povećanja adsorpcije radionuklida i teških metala. (Prajitno et al., 2020.)

Adsorpcijska svojstva zeolita su i u direktnoj vezi s kisikovim atomom u strukturi zeolitnih tetraedara pri čemu se kisik ponaša kao proton akceptor te ima negativan naboj. Ovo mjesto je potencijalno adsorpcijsko/interakcijsko mjesto za vodikove katione (protone) u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) koja sadrži HCl. U vodenoj otopini HCl disocira na H<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>. Stoga je logična interakcija kisikovih atoma sa površine zeolita koji imaju negativni naboj i vodikovih kationa iz modelne otopine želucakoji imaju pozitivan naboj (ionska veza). U ovom procesu se formiraju jake privlačne sile između površine zeolita i vodikovih kationa (protona) iz modelne otopine želuca što rezultira smanjenjem pH otopine koji je izmjeren tijekom pokusa. Svi testirani zeoliti su povećali pH modelne otopine želucabog adsorpcije kationa na površinu. Slično je utvrđeno za modelnu otopinu crijeva (pH je 5,7) čiji se pH također podigao nakon dodatka testiranih zeolita. Najveći porast vrijednosti pH izazvao je zeolit PMA ( $\Delta$ pH = 2,89). Veću promjenu pH su općenito zeoliti TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> izazvali u modelnoj otopini crijeva u odnosu na modelnu otopinu želudca. Stoga se može zaključiti kako se u modelnoj otopini crijeva veći broj vodikovih kationa veže za površinu zeolita, a njihova koncentracija u otopini opada, što rezultira porastom pH. Vjerojatno su tomu razlog stabilne interakcije između negativnog kisikovog atoma iz kristalne rešetke zeolita i vodikovih kationa iz otopine.

Nadalje, zbog istog svojstva, klinoptilolitni zeoliti mogu imati dobra adsorpcijska svojstva za glikozide iz vode zbog prisutnosti aktivnih atoma kisika na površini, koji mogu vezati hidroksilne (ionska veza) i aldehidne skupine iz šećera (dipol-dipol interakcija). Iako se molekule ugljikohidrata obično smatraju hidrofilnim, one imaju hidrofobne CH<sub>2</sub>-dijelove te u slučaju hidrofobnih zeolita postoji i geometrijsko ograničenje adsorpcije te adsorpcija u visokom postotku nije očekivana. U ovom doktoratu smo stoga istražili svojstva testiranih prirodnih klinoptilolitnih materijala TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> specifično prema D-glukozi u mQ H<sub>2</sub>O koja je relevantan šećer za metabolizam čovjeka. Molekule D-glukoze naime, sadrže OH skupine i aldehidnu skupinu COH. Afinitet za D-glukožu bio je značajno veći u modelnim otopinama s kiselim pH u odnosu na otopinu mQ H<sub>2</sub>O, vjerojatno zato što je atom kisika u strukturi zeolita akceptor protona. Na primjer, postotak izmjenenog ugljika koji ukazuje na prisutnost D-glukoze na površini zeolitnih materijala koji su se istaložili prije i nakon centrifugiranja pri 4000 rpm, povećan je u uzorcima modelnih otopina crijeva (17,98 % za TMAZ, 32,69 % za PMA i za 32,65% za PMAO<sub>2</sub>) u usporedbi s otopinama mQ H<sub>2</sub>O. Ovaj afinitet za adsorpciju D-glukoze potvrđen je i kvantificiran tekućinskom kromatografijom (UHPLC) gdje je pokazano kako se D-glukoza veže za površinu zeolita TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> u rasponu 8,76% - 11,34%. Adsorpcija šećera na zeolite testirana je uglavnom za industrijske aplikacije i rađena je na ne-klinoptilolitnim materijalima poput primjerice FAU tipa zeolita (Fornfett et al., 2016.) ili BEA tipa zeolita (Holtkamp et al., 2012.) što nije usporedivo s opserviranim učinkom za zeolite HEU tipa TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub>. Točan mehanizam interakcije površine zeolita s D-glukozom koji smo opservirali mogao bi stoga uključivati izravnu adsorpciju putem stvaranja ionske veze, dipol-dipol interakcije, dipol inducirani dipol interakcije, te vodikove veze između površine klinoptilolita i hidroksilne ili aldehidne skupine D-glukoze.

Uočeni efekt mogao bi se iskoristiti u *in vivo* sustavima, s obzirom da su Hossein i suradnici u svojoj studiji pokazali da su razine glukoze i oksidativni stres smanjeni kod štakora s dijabetesom tipa 1 nakon primjene klinoptilolitnog materijala. (Hossein et al., 2018.) U ovoj studiji međutim, autori su za tretman štakora koristili materijal nano veličine, dok je materijal testiran u našoj studiji bio mikronizirani materijal s rasponom promjera od 1,2 μm do 24,2 μm. Također, u ovoj studiji autori su koristili model proučavali štakora s dijabetesom. a u našoj studiji smo testirali učinke PMA na razinu glukoze u krvi zdravih miševa. Zanimljivo je da je u studiji Hosseina i sur. pokazano da klinoptilolitni materijal nanoveličine smanjuje razinu glukoze u krvi kod štakora s dijabetesom na gotovo normalne razine. S obzirom na razlike u studijama, naši se rezultati ne mogu izravno usporediti s ovom studijom i imaju relevantnost u potencijalnoj preventivnoj primjeni u fiziološkim uvjetima. Važno je napomenuti da nanočestice zeolita mogu izravno ući u cirkulaciju dok PMA korišten u našoj studiji ne ulazi u cirkulaciju, kao što je dokazano u prethodnim studijama. (Kraljević et al., 2022.) Sniženje razine glukoze u krvi u miševa hranjenih D-glukozom u našoj studiji pokazalo se statistički značajno samo u skupini prethodno tretiranoj s PMA tijekom 3 dana. To implicira dodatne mehanizme djelovanja, koji vjerojatno uključuju neke učinke na

stanje crijeva i crijevni mikrobiom koji su kao hipoteza prethodno navedeni u literaturi. (Kraljević et al., 2018.)

Razina glukoze u krvi regulirana je homeostatskim mehanizmima, a poremećaji središnje signalizacije inzulina i metabolizma glukoze dovode do poremećaja homeostaze glukoze u cijelom tijelu. (Tups et al., 2017.) Patologije koje se pri tome razvijaju uključuju dijabetes i metabolički sindrom, pri čemu dolazi do poremećaja razina glukoze u krvi. (Aronoff et al., 2004.) U ovih bolesti, potrebno je stoga intervenirati kako farmakološki, lijekovima tako i kroz prehranbene smjernice kojima je cilj pomoć u održavanju normalnih razina glukoze u krvi. Postoje i neki drugi pristupi, poznati kao integrativni pristupi, koji su još uvijek u eksperimentalnoj fazi ispitivanja te uključuju i korištenje dodataka prehrani poput primjerice vitamina E (Al-Shamsi et al., 2006.), polifenola poput primjerice resveratrola i antocijanina. (Huang et al., 2020; Kim et al. 2016.) Naime, epidemiološka istraživanja pokazuju da su upravo polifenoli oni koji pridonose i sprečavaju dijabetes tipa 2 (T2D). Primjerice su to polifenoli iz kave, borovnice, maslinovog ulja, propolisa, čokolade, crnog vina, sjemenki grožđa i kakaovca. No, ukoliko se pojedinačne komponente izdvoje iz hrane nije jednoznačno pokazano da ima koristi u dijabetičara. U kliničkim ispitivanjima je međutim, učinak resveratrola i antocijanina potvrđen kao antidijabetički smanjujući razinu glukoze u krvi poboljšavajući lučenje inzulina i otpornost na inzulin. (Cao et al., 2019.) Zanimljivi su rezultati dobiveni i u istraživanjima antiglikemičkog i antidijabetičkog učinka cimeta u životinja i ljudi. U osam kliničkih ispitivanja potvrđen je njegov pozitivan učinak na kontrolu razina šećera u krvi što se pripisuje pojačanoj ekspresiji proteina uključenih u transport glukoze, učincima na signalizaciju inzulina i regulaciji dislipidemije. (Sharma et al., 2020.)

Jedna moguća prehranbena intervencija mogla bi stoga biti i primjena zeolita klinoptilolita kao zasebna intervencija koja smanjuje razine glukoze u krvi tijekom unosa glukoze u tijelo ali i kao potencijalnih nosača lijekova. (Servatan et al., 2020.) Tomu u prilogu govore i rezultati našeg istraživanja s obzirom da smo pokazali da se tretmanom s PMA kod miševa smanjuje razina glukoze u krvi za 13 % u 15 min do 18 % nakon 30 min. U usporedbi s dobivenim rezultatom primjerice, učinkovitost zeolita bila je veća no dokazan učinak cimeta koji je u prosjeku snizio razinu glukoze u krvi ljudi 20. i 40. dana suplementacije za 4,17 % i 4,90 % pri 1g cimeta dnevno, za 1,84 % i 2,75 % pri 3g cimeta dnevno te za 4,55 % i 5,92 % pri 6g cimeta po danu. (Kizilasan i Erdem ., 2019.)

Kubo i sur. nedavno su demonstrirali korisnost dodavanja prirodnog zeolita u ishranu miševa na modelu miša s pretilošću izazvanom visokim udjelom masti i dijabetes melitusom tipa 2. Dodavanje 10 % zeolita unutar redovne prehrane zaustavilo je debljanje i snizilo triacilglicerol u plazmi, ukupni kolesterol i kolesterol lipoproteina visoke gustoće kao i razinu glukoze u krvi natašte. Slično našem istraživanju, postprandijalne razine glukoze u krvi bile su smanjene u oralnom testu tolerancije glukoze u 12. tjednu. (Kubo i Kawai., 2021.) Pavelić i Hadžija također su objavili rezultate koji ukazuju na pozitivne učinke zeolita klinoptilolita kod dijabetičkih miševa.

(Pavelić i Hadžija., 2003.) Autori međutim ukazuju da za opservirana pozitivna svojstva osim adsorpcije, mehanizam učinka zeolita možda uključuje silicij otpušten iz zeolita *in vivo* s obzirom da je već prethodno u literaturi pokazano da dodatak silicijevog dioksida može u potpunosti spriječiti spontani dijabetes u BB miševa. (Oschilewski et al., 1985). I rezultati ove studije pridonose dokazima koji ukazuju na zeolit klinoptilolit kao potencijalnu supstanciju od koristi i kontroli razina glukoze u krvi bilo kod osoba s poremećenim metabolizmom glukoze ili onih s dijagnosticiranim dijabetesom. Predložena primjena klinoptilolitnih zeolitnih materijala posebno je interesantna u kontekstu razvoja integrativnih medicinskih pristupa temeljenih na dokazima u segmentu oralnih intervencija s različitim prirodnim spojevima, nutraceuticima i biljnim ekstraktima koji su iznimno biokompatibilni te stoga i niske toksičnosti koja bi se mogla dalje proučavati kao podrška standardnim terapijskim protokolima. (Chan et al., 2022; Thottapillil et al., 2021.)

Interakcije klinoptilolitnog zeolitnog materijala s D-glukozom koje smo opservirali *in vitro* i potvrđene *in vivo* kod miševa, potrebno je dodatno istražiti s obzirom da temeljem dobivenih rezultata vrsta interakcije nije u cijelosti razjašnjena. Nadalje, opservirano sniženje razine D-glukoze u krvi kod miševa hranjenih s D-glukozom sa statističkom značajnosti opservirano je samo u skupini prethodno tretiranoj s PMA tijekom 3 dana. Stoga se moraju pretpostaviti drugi mehanizmi učinka zeolita klinoptilolita PMA koji nisu samo vezani uz potencijalnu adsorpciju D-glukoze na materijal već i na moguće otpuštanje topivih silicijevih formi s površine materijala te interakciju s mikrobiomom i Peyerovim pločama što u konačnici ima moguće sistemske reperkusije na homeostazu organizma poput primjerice, intenziviranja prirodnog imunološkog odgovora putem IgA, stabilizacije sastava mikrobioma ili jačanje antioksidativnih mehanizama u tijelu. Naime, u jednom je kliničkom ispitivanju dokazano kako suplementacija mikroniziranim zeolitom u pušača, smanjuje oksidativni stres što je bilo vidljivo smanjenjem lipidne peroksidacije u krvi ispitanika. To je posebno zanimljiv mehanizam s obzirom da je pušenje jedan od predisponirajućih faktora za dijabetes. (Atitlán-Gil et al., 2017.)



## 6. ZAKLJUČCI

- Svi testirani zeolitni materijali, sintetski zeolit A (ZA), te klinoptilolitni materijali dobiveni različitim metodama mikronizacije TMAZ, PMA i PMAO2 su pokazali svojstvo promijene strukture površine u mQ H<sub>2</sub>O što se dokazalo otpuštanjem aluminija u w % 16,62 u dekantiranoj frakciji za ZA te 0,22 - 2,91% u dodatno centrifugiranim frakcijama pri 4000 rpm, 12000 rpm i 140000 rpm. Aluminij je otpušten u manjem w % (5,8 %) u dekantiranim frakcijama klinoptilolitnih materijala TMAZ, PMA i PMAO2 i dodatno centrifugiranim frakcijama pri 4000 rpm, 12000 rpm i 140000 rpm (0,1% - 1,28%). Silicij je otpušten s površine ZA u manjem w % (12 % - 16,69 %) u odnosu na TMAZ, PMA i PMAO2 (15 % - 46,23 %).
- U modelnim otopinama želuca (pH = 1.94) i crijeva (pH = 5.7) svi su testirani zeoliti (ZA, TMAZ, PMA, PMAO2) povećali pH otopina kao posljedicu aktivacije površine u kiselom mediju.
- D-glukoza u vodenoj suspenziji testiranih zeolita smanjila je vrijednosti pH za 0,28 (ZA) i u rasponu od 0,45 - 0,9 pH jedinica za klinoptilolitne materijale TMAZ, PMA i PMAO2 što pokazuje da D-glukoza ulazi u interakciju sa površinom zeolita te povećava koncentraciju vodikovih kationa (H<sup>+</sup>) u mediju zbog čega pH vrijednost pada. Promjena pH u zeolitnim suspenzijama u modelnoj otopini želuca bila je manja uz dodatak D-glukoze nego promjena u modelnoj otopini crijeva, što se povezuje s otpuštanjem manjeg broja OH<sup>-</sup> i većeg broja H<sup>+</sup> skupina sa površine zeolita.
- Adsorpcija ili interakcija D-glukoze s površinom testiranih zeolita potvrđena je metodom EDS kao povećanje masenog udjela ugljika na površini materijala iz suspenzija s D-glukozom izrađenog kao maseni postotak:
  - o ZA: 14,21 % u mQ H<sub>2</sub>O, do 48,13 % u otopini D-glukoze
  - o za zeolite TMAZ, PMA, PMAO2 9,8 % u mQ H<sub>2</sub>O, do 64,17 % u otopini D-glukoze.
- Adsorpcija ili interakcija D-glukoze s površinom testiranih zeolita kvantificirana je uz pomoć metode UHPLC: za ZA 8,76 %, za TMAZ 11,34 %, za PMA 10,82 % te PMAO2 11,85%.
- U uvjetima *in vivo*, smanjene razine D-glukoze u krvi izmjerene su u svih zdravih miševa suplementiranih sa D-glukozom i klinoptilolitnim zeolitom PMA u usporedbi s miševima suplementiranih samo s D-glukozom bez utjecaja na glavne biokemijske parametre krvi i jetra. Statistički značajno smanjenje razina D-glukoze u krvi za 15 % opservirano je samo u miševa u predtretmanu sa PMA zeolitom i naknadnim tretmanom s D-glukozom nakon 15 min sa statističkom značajnošću (p>0.001).

## 7. LITERATURA

Ackley, M., Yang, R.T. 1991. Diffusion in Ion-Exchanged Clinoptilolites. *AIChE J.* 37: 1645-1656.

Ajiboye ,T.O., Aliyu, H., Tanimu, M.A., Muhammad, R.M., Ibitoye, O.B. 2016. *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels leaves halt high-fructose induced metabolic syndrome:Hyperglycemia, insulin resistance, inflammation and oxidative stress. *J Ethnopharmacol.* 4(192):471–479.

Alfaro, V. 2005. Specification of laboratory animal use in scientific articles: current low detail in the journals' instructions for authors and some proposals. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 27:495-502.

Alietti, A. 1972. Polymorphism and crystal-chemistry of heulandites and clinoptilolites. *Am Mineral.* 57:1448-1462.

Al-Ishaq, R.K., Abotaleb, M., Kubatka, P., Kajo, K., Büsselberg, D. 2019. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules.* 9(9):430-435.

Al-Shamsi, M., Amin, A., Adeghate, E. 2006. Vitamin E decreases the hyperglucagonemia of dia-betic rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1084:432-441.

American Diabetes Associations. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2015, 38 (Suppl. 1):S8–S16.

Andronikashvili, T., Pagava, K., Kurashvili, T., Eprikashvili, L. 2009. Possibility of Application of Natural Zeolites for Medicinal Purposes, *Bull Georgian Natl Acad Sci.* 3:158-167.

Aron, A., Coups, E.J., Aron, E.N. 2021. *Statistics for Psychology*, 6th edition, Pearson, Velika Britanija.

Aronoff, S.L., Berkowitz, K., Shreiner, B., Want, L. 2004. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* 17 (3): 183–190.

Atitlán-Gil, A., M.M., Bretón-de la Loza, J., Jiménez-Ortega,C., Belefant-Miller,H., Betanzos-Cabrera,G. 2017.Activated and Micronized Zeolite in the Modulation of Cellular Oxidative Stress in Mexican Smokers: A Randomized Clinical Trial, *Rev Invest Clin.* 69:146-151.

Atkins, P.W. 2009. *Physical Chemistry*; 5th ed., Oxford, Oxford University Press.

Auerbach, S.M., Carrado, K.A., Dutta, P.K. 2003. *Handbook of Zeolite Science and Technology.* Marcel Dekker, New York pp. 1143-1173.

Ayala, J.E., Samuel, T.V., Morton, L.G., Obíci, S., Croniger, C.M., Shulman, G.I., Wasserman, D.H., McGuinness, O.P. 2010. Standard operating procedures for

describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 3(9-10):525–534.

Baerlocher, Ch., McCusker, L. B., Olson, D. H. 2007. *Atlas of zeolite framework types*, 6th Revised Edition, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Belete, R., Ataro, Z., Abdu, A., Sheleme, M. 2021. Global prevalence of metabolic syndrome among patients with type I diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr.* 13(1):25-38.

Beltcheva, M., Metcheva, R., Popov, N., Teodorova, S.E., Heredia-Rojas, J.A., Rodríguez-de la Fuente, A.O., Rodríguez-Flores, L.E., Topashka-Ancheva, M. 2012. Modified natural clinoptilolite detoxifies small mammal's organism loaded with lead I. Lead disposition and kinetic model for lead bioaccumulation. *Biol Trace Elem Res.* 147(1-3):180-188.

Bhatt, H., Elias, M., Mandoki, A. 1999. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology.* 52(7):1467–1471.

Blanchard, G., Maunaye, M., Martin, G. 1984. Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolite, *Water Res.* 18:1501–1507.

Bogdanov, B., Georgiev, D., Angelova, K., aneva, K. 2009. Natural zeolites: Clinoptilolite Review, International Science conference Economics and Society Development on the Base of Knowledge, Stara Zagora.

Boles, J. R. 1972. Composition, optical properties, cell dimensions, and thermal stability of some heulandite group zeolites. *Am Mineral.* 57:1463-1493.

Breck, D. W. 1964. Crystalline Molecular Sieves. *J. Chem. Educ.* 41:678-689.

Brown, T.J., Brainard, J., Song, F., Wang, X., Abdelhamid, A., Hooper, L. (u ime PUFAM Group). 2019. Omega-3, omega-6, and total dietary polyunsaturated fat for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 366:l4697.

Burgess, R.M., Perron, M.M., Cantwell, M.G., Ho, K.T., Serbst, J.R., Pelletier, M.C. 2004. Use of Zeolite for Removing Ammonia and Ammonia-Caused Toxicity in Marine. Toxicity Identification Evaluations. *Arch Environ Contam Toxicol.* 47(4):440-447.

Candy, J., Klinowski, J., Perry, R., Perry, E., Fairbairn, A., Oakley, A., Carpenter, T., Atack, J., Blažen, G., Edwardson, J. 1986. Aluminosilicate zeolite and senile forgetfulness in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1:354-356.

Cao, H., Ou, J., Chen, L., Zhang, Y., Szkudelski, T., Delmas, D., Daglia, M., Xiao, J. 2019. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 59(20):3371-3379.

Cattaneo, V., Chang, M. 1991. Potential of micronized encapsulated zeolite as an oral adsorbent for urea removal in uremia. *Asaio Trans.* 37 (2) 80-87.

Chan, K.W., Chow, T.Y., Yu, K.Y., Feng, Y., Lao, L., Bian, Z., Wong, V.T., Tang, S.C. 2022. Effectiveness of Integrative Chinese-Western Medicine for Chronic Kidney Disease and Diabetes: A Retrospective Cohort Study. *Am J Chin Med.* 50(2):371-388.

Cheng, H.S., Ton, S.H., Phang, S.C.W., Tan, J.B.L. 2017. Increased susceptibility of post-weaning rats on high-fat diet to metabolic syndrome. *J Adv Res.* 52(8):743-752.

Chuřkova, K.I., Vozhakov, S.V. 2005. Assessment of efficacy of the drug litovit as a novel pathogenetic modality in acute virus hepatitis. *Ter Arkh.* 77(11): 29-31.

Cortez-Navarrete, M., Pérez-Rubio, K.G., Escobedo-Gutiérrez, M.J. 2023. Role of Fenugreek, Cinnamon, Curcuma longa, Berberine and Momordica charantia in Type 2 Diabetes Mellitus Treatment: A Review. *Pharmaceuticals.* 16(4):515-538.

Crapo, P.A., Reaven, G., Olefsky, J. 1997. Postprandial plasma-glucose and - insulin responses to different complex carbohydrates. *Diabetes* 26: 1178–1183.

Cummings, J.H., Stephen, A.M. 2007. Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin Nutr.* 1:5-18.

Dana, E. S. 1914. *The System of Mineralogy of James Dwight Dana.* 6th Edition. John Wiley & Sons, London, pp. 574-576.

Deka, R.C. 1998. Acidity in zeolites and their characterisation by differentspectroscopic methods. *Indian J Chem Technol.* 5:109-203.

Duncan, A., Klemm, P., Raymond, K., Landry, C. 2012. Silica Microparticles as a Solid Support for Gadolinium Phosphonate Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J Am Chem Soc.* 134(19):8046–8048.

Erdem, E., Karapinar, N., Donat, R. 2004. The removal of heavy metal cations by natural zeolites. *J Colloid Interface Sci.* 280:309-314.

Evert, A.B., Boucher, J.L., Cypress, M., Dunbar, S.A., Franz, M.J., Mayer-Davis, E.J., Neumiller, J.J., Nwankwo, R., Verdi, C.L., Urbanski, P., Yancy, W.S. 2014. Nutrition Therapy Recommendations for the Management of Adults With Diabetes. *Diab Care.* Suppl 1:120-143.

Evert, A.B., Dennison, M., Gardner, C.D., Garvey, W.T., Lau, K.H.K., MacLeod J., Mitri, J., Pereira, R.F., Rawlings, K., Robinson, S., Saslow, L., Uelmen, S., Urbanski P.B., Yancy W.S. 2019. Nutrition Therapy for Adults With Diabetes or Prediabetes: A Consensus Report. *Diab Care.* 42(5):731-754.

- Fabiano, A., Piras, M., Calderone, V., Testai, L., Flori, L., Puppi, D., Chiellini, F., Zambito, Y. 2019. New calcium oral Controlled-Release system based on zeolite for prevention of osteoporosis. *Nutrients*. 11: 2467–2480.
- Flanigen, E.M., Broach, R.W., Wilson, S.T. 2010. Zeolites in industrial separation and catalysis (Edited by Santi Kulprathipanja), WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, USA, pp. 1-26.
- Fornefett, I., Rabet, D., Buttersack, C., Buchholz, K. 2016. Adsorption of sucrose on zeolites, *Green Chem*. 18:3378–3388.
- Fowler, M. 2009. Hyperglycemic crisis in adults: Pathophysiology, presentation, pitfalls, and prevention. *Clin Diabetes*. 27:19-23.
- Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., Smith, A.L. 2017. The mouse in biomedical research. Elsevier Inc.; 2007.; Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Ciênc*. 91(suppl 1):e20170238.
- Franz, M.J. 1997. Protein: metabolism and effect on blood glucose levels. *Diabetes Educ*. 23(6), pp. 643-646, 648, 650-651.
- Gaál, Z. i Balogh, I. 2019. Monogenic Forms of Diabetes Mellitus. In: Igaz P., Patócs A., editors. *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes*. Volume 111. Springer International Publishing; Cham pp. 385–416.
- Gamulin, S., Marušić, M., Kovač, Z. 2014. Patofiziologija. *Nutr Metab Insights*. 51-59:174 – 178.
- Gianotti, L., Belcastro, S., D’Agnano, S., Tassone, F. 2021. The Stress Axis in Obesity and Diabetes Mellitus: An Update. *Endocrines*. 2:334-347.
- Godelitsas, A., Armbruster T. 2003. HEU-type of zeolites modified by transition elements and lead. *Micropor Mesopor Mat*. 61:3-24.
- Grce, M., Pavelić, K. 2005. Antiviral properties of clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat*. 79:165–169.
- Gunawan, S., Aulia, A., Soetikno, V. 2021. Development of rat metabolic syndrome models: A review. *Vet World*. 14(7):1774-1783.
- Haggerty, G. M., Bowman, R. S. 1994. Sorption of Chromate and Other Inorganic Anion by Organo–Zeolite. *Eviron Sci Technol*. 28: 452–459.
- Hancock, D., Martin, E., Mayhew, G., Stajich, J., Jewett, R., Stacy, M., Scott, B., Vance, J. i Scott, W. 2008. Izloženost pesticidima i rizik od Parkinsonove bolesti: obiteljska studija slučaj-kontrola. *BMC Neurology*. 8:članak 6.

- Hannon, B.A., Fairfield, W.D., Adams, B., Kyle, T., Crow, M., Thomas, D.M. 2020. Use and abuse of dietary supplements in persons with diabetes. *Nutr Diabetes*. 10(1):14-26.
- Hay, R.L., Sheppard, R.A., Bish, D.L., Ming, D.W. 2001. Occurrence of zeolites in Sedimentary Rocks: An Overview: Occurrence, properties, application. *Rev mineral geochem*. 45:217-234.
- Hendrichs, D. 2006. Water treatment unit processes physical and chemical, CRC Press. Taylor & Francis Group, New York, pp. 856-910.
- Holtkamp, M., Waluga, T., Scholl, S. 2012. Adsorption properties of glucose and isomaltose on different BEA zeolites. *J Non-Equil Thermodyn*. 37(3):247-272.
- Hossein, N. B., Khorram, S., Rezazadeh, H., Safaiyan, A., Tarighat-Esfanjani, A. 2018 The Effects of Natural Clinoptilolite and Nano-Sized Clinoptilolite Supplementation on Glucose Levels and Oxidative Stress in Rats With Type 1 Diabetes. *Can J Diabetes*. 42(1):31-35.
- Huang, D.D., Shi, G., Jiang, Y., Yao, C., Zhu, C. 2020. A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. *Biomed Pharmacother*. 125:109767.
- Inglezakis, V.J. 2005. The concept of "capacity" in zeolite ion-exchange system. *J Colloid Interface Sci*. 281:68-79.
- Ivković, S., Deutsch, U., Silberbach, A., Walraph, E., Mannel, M. 2004. Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system. *Adv Ther*. 21(2):135-147.
- Jainkittivong, A., Aneksuk, V., Langais, R. 2002. Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral dis*. 8(4):218-223.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Augustin, L.S., Franceschi S, Hamidi M, Marchie A, Jenkins AL, Axelsen M. 2002. Glycemic index: overview of implications in health and disease. *Am J Clin Nutr*. 76(1):266-273.
- Jenkins, D.J., Wolever, T.M., Taylor, R.H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J.M., Bowling A.C., Newman, H.C., Jenkins, A.L., Goff, D.V. 1981. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*. 34:362-366
- Jugdaohsingh, R., Brown, A., Dietzel, M., Powell, J.J. 2013. High-aluminum-affinity silica is a nanoparticle that seeds secondary aluminosilicate formation. *PLoS One*. 8(12):e84397.
- Jugdaohsingh, R., Reffitt, D., Oldham, C., Phillip, D., Keith, F., Thompson, R., Powell, J. 2000. Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans, *Am J Clin Nutr*. 71(4):944-949.

Jurkić, L.M., Capanec, I., Kraljević, P.S., Pavelić, K. 2013. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy. *Nutr Metab (Lond)*. 10:2.

Khalid, M., Joly, G., Renaud, A. i Magnoux, P. 2004. Removal of phenol from water by Adsorption Using Zeolites. *Ind & Eng Chem Res*. 43(17):5275-5280.

Khosla, S. i Hofbauer, C. 2017. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 5: 898–907.

Kijmanawat, A., Panburana, P., Reutrakul, S., Tangshewinsirikul, C. 2019. Effects of probiotic supplements on insulin resistance in gestational diabetes mellitus: A double-blind randomized controlled trial. *J Diabetes Investig*. 10(1):163-170.

Kim, Y., Keogh, J.B., Clifton, P.M. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 8(1):17-44.

Kizilaslan, N., Erdem, N.Z. 2019. The Effect of Different Amounts of Cinnamon Consumption on Blood Glucose in Healthy Adult Individuals. *Int J Food Sci*. 2019:4138534.

Kraljevic Pavelic, S., Krpan, D., Žuvić, M., Eisenwagen, S., Pavelić, K. 2022 Clinical Parameters in Osteoporosis Patients Supplemented With PMA-Zeolite at the End of 5-Year Double-Blinded Clinical Trial. *Frontiers in Medicine*. 9: 870962.

Kraljević Pavelic, S., Simović, M. S., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., Pavelić, K. 2018. Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. *Front Pharmacol*. 9:1350.

Kraljević Pavelić S., Micek, V., Filošević, A., Gumbarević, D., Žurga, P., Bulog, A., Orct, T., Yamamoto, Y., Preočanin, T., Plavec, J., Peter, R., Petravić M., Vikić-Topić, D., Pavelić, K. 2017. Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo. *Micropor Mesopor Mat*. 249(1):146-156.

Kraljević Pavelić, S., Micek, V., Bobinac, D., Bazdulj, E., Gianoncelli, A., Krpan, D., Žuvić, M., Eisenwagen, S., Stambrook, P., Pavelić, K. 2021. Treatment of osteoporosis with a modified zeolite shows beneficial effects in an osteoporotic rat model and a human clinical trial. *Exp Biol Med*. 246(5): 529–537.

Kraljević Pavelić, S., Saftić, M., L., Simović, M.J., Žuvić, M., Perdija, Ž., Krpan, D., Eisenwagen, S., Orct, T., Pavelić, K. 2022. Clinical Evaluation of a Defined Zeolite-Clinoptilolite Supplementation Effect on the Selected Blood Parameters of Patients. *Front Med (Lausanne)*. 9:851782.

Kubo, K., Kawai, Y. 2021. Zeolite Improves High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia, Hyperlipidemia and Obesity in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol*. 67(5):283-291.

Lamprecht, M., Bogner, S., Steinbauer, K., Schuetz, B., Greilberger, J.F., Leber, B., Wagner, B., Zinser, E., Petek, T., Wallner-Liebmann, S., Oberwinkler, T., Bachl, N., Schippinger, G. 2015. Effects of zeolite supplementation on parameters of intestinal barrier integrity, inflammation, redoxbiology and performance in aerobically trained subjects. *J Int Soc Sports Nutr.* 12:40.

Langella, A., Cappelletti, P., De' Gennaro, M., Bish, D. L., Ming, D. W. 2001. Zeolites in Closed Hydrologic Systems: Occurrence, properties, application. *Reviews in mineralogy and geochemistry.* Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg 45: 235-260.

Lipinski, C., Hopkins, A. (2004). Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature.* 432(7019):855–861.

Loewa, A., Feng, J.J., Hedtrich, S. 2023. Human disease models in drug development. *Nat Rev Bioeng.* 1:545–559.

Lonwenstein, W. 1954. The distribution of alumina in the tetrahedral of silicates and Aluminates. *Am. Miner.* 35:92-96.

Manda, T., Omwoma, S., Okumu Barasa, S., Pembere, A.M., Sifuna, D., Ochilo, L., Lagat, S., Ngeno, E., Ssebugere, P., Nagawa, C.B., Kyarimpa, C. 2024. Sorption Mechanisms and Enhancement of Selected Organochlorine Pollutants in Water on Zeolites. *Journal of Chem.,* 2024: ID 4008315.

Maret W. 2019. Chromium Supplementation in Human Health, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Met Ions Life Sci.* 19: /books/9783110527872/9783110527872-015/9783110527872-015.xml. doi: 10.1515/9783110527872-015.

Margeta, K., Zabukovec Logar, N., Šiljeg, M., Farkaš, A. 2013. Natural Zeolites in Water Treatment – How Effective Their Use. *Water treatment.* Elshorbagy, Walid Chowdhury, Rezaul Kabir (ur.), Rijeka: InTech 81-112.

Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C. 2016. High-fat diet-induced obesity Rat model: A comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 5(1):11–21.

Masters, A.F., Maschmeyer, T. 2011. Zeolites – From curiosity to cornerstone. *Micropor Mesopor Mat.* 142(2–3):423-438.

Mastinu, A., Kumar, A., Maccarinelli, G., Bonini, S.A., Premoli, M., Aria, F., Gianoncelli, A., Memo, M. 2019. Zeolite Clinoptilolite: Therapeutic Virtues of an Ancient Mineral. *Molecules.* 24(8):1517.

Mc Manus, J. Hurtado, T., Pusateri A, Knoop K.J. 2007. Use of zeolite for burns and to stop bleeding. *PHEM.* 11:67–71.



- Mercer, B.W., Ames, L.L., Touhill, C.L., Van Slike, W.J., Dean, R.B. 1970. *J Water Pollut Control Fed.* 42: R95.
- Ming, D.W., Boettinger, J.L., Bish, D.L. 2001. *Zeolites in Soil Environments: Occurrence, properties, application. Reviews in mineralogy and geochemistry*, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, pp. 323-345.
- Morishita, M., Miyagi, M., Yamasaki, Y., Tsuruda, K., Kawahara, K., Iwamoto, Y. 1998. A pilot study on the effects of zeolites on plaque formations. *Japan J Clin Dent.* 9(4):94-96.
- Mukerjee, M. 2007. Trends in animal research. *Sci Am.* 276(2): 86-93.
- Mukherjee, P., Roy, S., Ghosh, D. Nandi, S.K. 2022. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res.* 38:18.
- Mumpton, F.A. 1960. Clinoptilolite redefined. *Am Mineral.* 45: 351-369.
- Mumpton, F.A. 1999. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:3463–3470.
- Nakano, T., Nozue, Y. 2007. Orbital degeneracy and magnetic properties of potassium clusters incorporated into nanoporous crystals of zeolite A. *Journal of Computational Methods in Sciences and Engineering.* 7: 443–462.
- Neag, E., Stupar, Z., Torok, A.I., Surupaceanu, I., Senila, M., Cadar, O. 2022. Exploring the Properties of Micronized Natural Zeolitic Volcanic Tuff as Cosmetic Ingredient. *Materials.* 15(7):2405.
- Nyankson, E.J.K., Efavi, J.K., Yaya, A., Manu, G., Asare, K., Daafuor, J. 2018. Synthesis and characterization of zeolite-A and Zn-exchanged zeolite-A based on natural aluminosilicates and their potential applications, *Cogent Eng.* 5:1–23.
- Oh, Y.S., Jun, H.S. 2014. Role of bioactive food components in diabetes prevention: effects on Beta-cell. *Nutr Metab Insights.* 7: 51-59.
- Ojo O. 2019. Dietary Intake and Type 2 Diabetes. *Nutrients.* 11(9):2177.
- Oschilewski, U., Kiesel, U., Kolb, H. 1985. Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes,* 34(2):197-199.
- Ozougwu, J., Obimba, K., Belonwu, C., Unakalmba, C. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol.* 4:46–57.
- Pabalan, R.T., Beretti, F.P. 2001. Cation-Exchange Properties of Natural Zeolite. *RIMG.* 45: 453- 518

Pavelić, K., Hadžija, M. 2003. Medical application of zeolites. Handbook of Zeolite, Science and Technology, Ed(s): S.M. Auerbach, K.A. Carrado., P. K. Dutta (Marcel Dekker, New York), pp1141-1172.

Pavelić, K., Hadžija, M., Bedrica, L., Pavelić, J., Dikić, J., Katić, M., Kralj, M., Bosnar, M., Kapitanović, S., Poljak Blazi, M., Križanac, S., Stojković, R., Jurin, M., Subotić, B., Čolić, M. 2001. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *J Mol Med.* 78:708-720.

Pellegrino, P., Mallet, B., Delliaux, S., Jammes, Y., Guieu, R., Schäf, O. 2011. Zeolites are effective ROS-scavengers in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 410(3):478-483.

Petz, B., Kolesarić, V., Ivanec, D. 2012. *Petzova statistika: Osnovne statističke metode za nematematičare.* Jastrebarsko: Naklada Slap

Poljak Blazi, M., Katic, M., Kralj, M., Zarkovic, N., Marotti, T., Bosnjak, B., Sverko, V., Balog, T., Pavelic, K. 2001. 32-P-09-In vitro and in vivo effect of natural clinoptilolite on malignant tumors. Ed.(s): Galarnau, A., Fajula, F., Di Renzo, F., Vedrine, J. *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier. 135:374.

Post, R.E., Mainous A.G., King, D.E., Simpson, K.N. 2012. Dietary fiber for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Am Board Fam Med.* 25(1):16-23.

Prajitno, Y.M., Harbottle, D., Hondow, N., Zhang, H., Hunter, N.T. 2020. The effect of pre-activation and milling on improving natural clinoptilolite for ion exchange of cesium and strontium. *J Env Chem Eng.* 8(1): 102991.

Primo, A., Garcia, H. 2014. Zeolites as catalysts in oil refining. *Chem Soc Rev.* 43:7548-7561.

Qi, Y., Qian, K., Chen, J., Yifeng, E., Shi, Y., Li, H., Zhao L. 2021. A thermoreversible antibacterial zeolite-based nanoparticles loaded hydrogel promotes diabetic wound healing via detrimental factor neutralization and ROS scavenging. *J Nanobiotechn.* 19(1):414-434.

Raut, S.K., Bandawane, D. 2018. A systematic review on animal models of metabolic syndrome. *Int J Pharm Res Health Sci.* 6(1):2089–2098.

Rivera-Garza, M., Olguín, M., García-Sosa, I., Alcántara, D., Rodríguez-Fuentes, G. 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Micropor Mesopor Mat.* 39:431-444.

Rodrigues Oliveira, S.M., Rebocho, A., Ahmadpour, E., Nissapatorn, V., de Lourdes Pereira, M. 2023. Type 1 Diabetes Mellitus: A Review on Advances and Challenges in Creating Insulin Producing Devices. *Micromachines.* 14(1):151-181.

Rodriguez-Fuentes, G., Aramis, R., Maria, A., Barrios, A., Colarte, A. 2006. Antacid drug based on purified natural clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat.* 94:200-207.

Rodríguez-Iznaga, I., Shelyapina, M.G., Petranovskii, V. 2022. Ion Exchange in Natural Clinoptilolite: Aspects Related to Its Structure and Applications. *Minerals.* 12:1628.

Rožić, M., Cerjan-Stefanović, S., Curković, L. 2002. Evaluation of Croatian Clinoptilolite Tuffs for ammonium removal. *Croat Chem Acta.*75(1):255-269.

Rožić, M., Bolanča, Z., Cerjan-Stefanović, Š. 2004. Prirodni zeoliti i mogućnosti njihove primjene u kontroli polutanata grafičke industrije. *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske.* 53(10): 449-458.

Rubashvili, I., Zautashvili, M., Eprikashvili, L., Kordzakhia, T., Dzaganja, M., Pirtskhalava, N. 2019. Development and validation HPLC methods for determination of some antibiotics in support of their adsorption study on natural zeolite. 10th International Conference on Chemistry, Amsterdam, Netherlands.

Satya, A., Subramanian, S., Seeram, R. 2012. Functionalized Cellulose: PET Polymer Fibers with Zeolites for Detoxication Against Nerve Agents. *J Inorg Mater.* 27:332–336.

Schaller, W. T. 1932. The mordenite-tilolite group: Clinoptilolite, a new species. *Am Mineral.* 17: 128-134.

Servatan, M., Zarrintaj, P., Mahmodi, G., Kim, S.J., Ganjali, M.R., Saeb, M.R., Mozafari, M. 2020. Zeolites in drug delivery: Progress, challenges and opportunities. *Drug Discov Today.* 25(4):642-656.

Sharma, S., Mandal, A., Kant, R., Jachak, S., Jagzape, M. 2020. Is Cinnamon Efficacious for Glycaemic Control in Type-2 Diabetes Mellitus? *J Pak Med.* 70(11):2065-2069.

Sheppard, R. A., Hay, R. L., Bish, D. L., Ming, D.W., (eds). 2001. Formation of zeolites in Open Hydrologic Systems: Occurrence, properties, application. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg 45:261-275.

Liu; S.M.Z-P. 2021. The Role of Zeolite Framework in Zeolite Stability and Catalysis from Recent Atomic Simulation. *Top Catal.* 65:1-4.

Slawson, C. B. 1925. The thermo-optical properties of heulandite. *Am Mineral.* 10:305-331.

Sprynskyy, M., Ligor, T., Buszewski, B. 2008. Clinoptilolite in study of lindane and aldrin sorption processes from water solution. *J Hazard Mater.* 151(2-3):570-577.

Storlien, L.H., Higgins, J.A., Thomas, T.C., Brown, M.A. Wang, H.Q., 2000. Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr.* 1:S85-90.

Stryer, L. 1991. *Biokemija*. Zagreb, Školska knjiga, pp263–283.

Subramanian, S., Baidal, D. The Management of Type 1 Diabetes. 2021. In: Feingold, K.R., Anawalt, B., Blackman, M.R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Shah, A.S., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trence, D.L., Wilson, D.P., ed(s). *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

Sultan, H., Ashry, M., M H El-Bitar, A., Yassen, N., Abdelsalam, M., Moustafa, M. 2021. Synthetic Zeolite Supplementation as a Potential Candidate for the Therapy of Diabetic Syndrome. *Pak J Biol Sci.* 24(10):1067-1076.

Tabacchi, G. 2018. Supramolecular organization in confined nanospaces. *Chem Phys Chem.* 19(11):1249–1297.

Tahar, A., Choubert, J.M., Miège, C., Esperanza, M., Le Menach, K., Budzinski, H., Wisniewski, C., Coquery, M. 2014. Removal of xenobiotics from effluent discharge by adsorption on zeolite and expanded clay: An alternative to activated carbon. *Environ Sci Pollut Res.* 21(8):5660-5668.

Temneanu, O.R., Trandafir, L.M., Purcarea, M.R. 2016. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: a relatively new clinical problem within pediatric practice. *J Med Life.* 9(3):235-239.

Tessema, D., Shewaye, T., Mamaru, B. 2021. A Short Review on Synthesis, Characterization, and Applications of Zeolites. *Adv Mater Sci Eng.* 2021:ArticleID 6637898.

Thottapillil, A., Kouser, S., Kukkupuni, S.K., Vishnuprasad, C.N. 2021. An 'Ayurveda-Biology' platform for integrative diabetes management. *J Ethnopharmacol.* 268:113575.

Tups, A., Benzler, J., Sergi, D., Ladyman, S.R., Williams, L.M. 2017. Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Compr Physiol.* 7(2):741-764.

Turp, S.M., Turp, G.A., Ekinci, N., Özdemir, S. 2020. Enhanced adsorption of methylene blue from textile wastewater by using natural and artificial zeolite. *Water Sci Technol.* 82(3):513-523.

Tušek, D., Cetina, I., Pehar, V. 2019. Suvremena sredstva za dekontaminaciju bojnih otrova: I. dio. *Kem. Ind.* 68 (11-12):599–660.

Uchida, T., Maru, N., Furuhashi, M., Fujino, A., Muramoto, S., Ishibashi, A., Koshihara, K., Shiba, T., Kikuchi, T. 1992. [Anti-bacterial zeolite balloon catheter and its potential for urinary tract infection control – članak na japanskom jeziku]. *Hinyokika Kyo*. 38(8):973-978. (korišten samo sažetak rada)

Valdés-Ramos, R., Guadarrama-López, A.L., Martínez-Carrillo, B.E., Benítez-Arciniega, A.D. 2015. Vitamins and type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 15(1):54-63.

Velea, I.P., Paul, C., Brink, S.J. 2015. Type 2 Diabetes Mellitus in youth No benign disorder! In: *Update in Pediatric Endocrinology and Diabetes*. pp147–154.

Vitale, M.G., Barbato, C., Crispo, A., Habetswallner, F., Martino, B.M., Riccardi, F., Maione, A., Eisenwagen, S., Vitale, G., Carteni, G. 2020. ZeOxaNMulti Trial: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial of Oral PMA-zeolite to prevent Chemotherapy-Induced Side Effects, in particular, Peripheral Neuropathy. *Molecules*. 25(10):2297.

Vitale, M.G., Crispo, A., Arundine, D., Ronga, R., Barbato, C., Luongo, A., Habetswallner, F., De Martino, B.M., Maione, A., Eisenwagen, S., Vitale, G., Riccardi, F. 2022. Survival analyses of the ZeOxaNMulti trial: Follow-up randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of oral PMA-zeolite to prevent chemotherapy-induced side effects, especially peripheral neuropathy. *Front Pharmacol*. 13:874028.

Vrhovac, B., Jakšić, B., Reiner, Ž., Vucelić, B. 2008. *Interna medicina*. Zagreb, Naklada Ljevak, pp1244 – 1261.

Weitkamp, J. 2000. Zeolites and catalysis. *Solid State Ionics*. 131:175-188.

Wong, S.K., Chin, K.Y., Suhaimi, F.H., Fairus, A., Ima-Nirwana, S. 2016. Animal models of metabolic syndrome: A review. *Nutr Metab*. 13(65):1–12.

World Health Organization, 2023. World Health Organization model list of essential medicines: 21st. Geneva. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/371090/WHO-MHP-HPS-EML-2023.02-eng.pdf?sequence=1>, pristupljeno 11.3.2024.

Yeh, G.Y., Eisenberg, D.M., Kaptchuk, T.J., Phillips, R.S. 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care*. 26(4):1277-1294.

Zamzow, M.J., Eichbaum, B.R., Sandgren, K.R., Shanks, D.E. 1990. Removal of heavy metal and other cations from wastewater using zeolites. *Sep Sci Technol*. 25:1555–1569.

Žarković, N., Žarković, K., Kralj, M., Borović, S., Sabolović, S., Poljak-Blaži, M., Cipak, A., Pavelić, K. 2003. Anticancer and Antioxidative Effects of Micronized Zeolite Clinoptilolite. *Anticancer Res*. 23(2B):1589-1596.

## 8. POPIS TABLICA

Tablica 1. Bruto kemijske formule i strukturalna svojstva odabranih prirodnih zeolita (Margeta et al., 2013.)

Tablica 2. Sažeta tablica učinaka suplemenata kod dijabetesa adaptirana iz (Hannon et al., 2020.).

Tablica 3. Biomedicinski značaj i ograničenja malih životinjskih modela (tablica adaptirana iz (Mukherjee, 2022)).

Tablica 4. pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 (40 g/L) u mQ vodi u vremenskim intervalima: početni pH, nakon 5 min, 30 min i 24 h inkubacije na sobnoj temperaturi. Suspenzije su potom inkubirane do ukupno 48 h.

Tablica 5. Razlike za pH vrijednosti ( $\Delta$ pH) suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 (40 g/L) u mQ vodi izmjerene nakon 24 h i 48 h.

Tablica 6. pH vrijednosti zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 (koncentracija 40 g/L) u vodi i u modelnim otopinama želuca (pH = 1,94) i crijeva (pH = 5,7).

Tablica 7. Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija testiranih zeolita u modelnim otopinama želuca i crijeva nakon inkubacije 24 h u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 8. Izmjerene pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O i modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) sa dodatkom otopine D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 9. Vrijednosti  $\Delta$ pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) sa D-glukozom u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 10. pH vrijednosti suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) sa i bez dodatka otopine D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 11. Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) sa dodatkom D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 12. Vrijednosti  $\Delta$ pH suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ vode sa D-glukoze u koncentraciji 40 g/L nakon 24 h inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi.

Tablica 13. Elementna analiza Si, O, C, Na i Al za uzorke ZA, TMAZ, PMA i PMAO2 u mQ H<sub>2</sub>O dobivene dekantiranjem i centrifugiranjem frakcija pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm te uzoraka krutih zeolita uz pomoć metode EDS. Rezultati su prikazani u prosječnim masenim postocima (w) %.

Tablica 14. Omjer (Si/Al) testiranih zeolita (ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub>) u krutom stanju, dekantiranoj frakciji iz suspenzije zeolita u mQ H<sub>2</sub>O te u supernatantima nakon centrifugiranja suspenzije zeolita u mQ H<sub>2</sub>O pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm. Vrijednosti za Si i Al prikazane su u prosječnim masenim (w) postocima (%) iz čega se izračunao omjer Si/Al.

Tablica 15. Prosječna vrijednost omjera Si/Al površina zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u krutom stanju i supernatantima suspenzija zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O centrifugiranim pri 4000 rpm, 14000 rpm i 140000 rpm (prosjek centrifugiranih ovih frakcija).

Tablica 16. Prosječna vrijednost omjera Si/Al površina zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u krutom stanju i dekantiranih frakcija ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O.

Tablica 17. Rezultati EDS analize za krute materijale i taloge zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> nakon centrifugiranja suspenzija zeolita u mQ H<sub>2</sub>O uz inkubaciju s otopinom D-glukoze nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. Rezultati su prikazani kao prosječni maseni postotak (w%) elemenata Si, O, C, Na, Al.

Tablica 18. Rezultati EDS analize za supernatante zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O bez ili uz inkubaciju s otopinom D-glukoze nakon centrifugiranja pri 4000 rpm. Rezultati su prikazani kao prosječni maseni postotak (w %) elemenata Si, O, C, Na, Al.

Tablica 19. Elementna EDS analiza taloga suspenzija testiranih zeolita ZA, TMAZ, PMA i PMAO<sub>2</sub> inkubiranih u otopini D-glukoze 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O te u modelnim otopinama želuca (pH =1,94) i crijeva (pH = 5,7) nakon centrifugiranja pri 4000 rpm.

Tablica 20. Rezultati analize UHPLC i kvantifikacija D-glukoze. Rezultati su dobiveni za suspenzije zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> nakon inkubacije s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Razlika koncentracije D-glukoze ( $\Delta$ ) u postotku dana je usporedbom kontrolne otopine D-glukoze i supernatanta nakon centrifugiranja. Kontrola: otopina D-glukoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za glukozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

Tablica 21. Rezultati analize UHPLC i kvantifikacija D-fruktoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> nakon inkubacije s D-glukozom nakon centrifugiranja pri 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-fruktoze u mg/ml. Razlika koncentracije D-glukoze ( $\Delta$ ) u postotku dana je usporedbom kontrolne otopine D-fruktoze i supernatanta nakon centrifugiranja. Kontrola: otopina D-fruktoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za D-fruktozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

Tablica 22. Rezultati UHPLC i kvantifikacija saharoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO<sub>2</sub> sa saharozom, nakon centrifugiranja na 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Kontrola: otopina saharoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za saharozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

Tablica 23. Rezultati UHPLC i kvantifikacija laktoze. Rezultati su dobiveni za otopine zeolita ZA, TMAZ, PMA, PMAO2 sa saharozom, nakon centrifugiranja na 4000 rpm i prikazani su kao koncentracije D-glukoze u mg/ml. Kontrola: otopina saharoze od 2 mg/mL. Kalibracijska krivulja za laktozu konstruirana je za raspon koncentracija 2, 1,5, 1, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/mL.

Tablica 24. Rezultati analize razina D-glukoze u krvi miševa za kombinirani tretman PMA + D-glukoza i predtretman s PMA prije davanja D-glukoze. Rezultati su prikazani kao koncentracija D-glukoze u krvi u mmol/L za kontrolne skupine i tretmane u vremenskim 15 min, 30 min, 60 min i 120 min.

Tablica 25. Prosječni postoci sniženja razina D-glukoze u krvi miševa u istovremenom tretmanu PMA i D-glukoze te predtretmanu s PMA i naknadnom tretmanu s D-glukozom. Rezultati su prikazani kao postoci (%) smanjenja razine D-glukoze u krvi izmjerenih nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min.

Tablica 26. Biokemijski parametri izmjereni u krvi miševa tijekom in vivo pokusa. Test pune krvi je napravljen na uređaju Auto Hematology Analyzer BC-30 Vetfor (Mindray, Shenzhen, Kina): WBC – bijele krvne stanice; RBC – crvene krvne stanice; HB – hemoglobin; HCT – hematokrit; MCV -srednji korpuskularni volumen; MCH – srednji korpuskularni hemoglobin; MCHC – srednji korpuskularni hemoglobin koncentrat; PCT - trombociti; RWD – širina distribucije eritrocita. Jetreni testovi napravljeni su uz pomoć uređaja RC clinical chemistry analyzer (Scil Animal Care Company, Njemačka) nakon uzorkovanja s heparinom kako slijedi: Alanin aminotransferaza (ALT); Albumin (ALB); Alkalna fosfataza (ALP); Amilaza (AMY); Gama glutamiltransferaza (GGT); Glukoza (Glu); Kreatinin (CREA); Globulin (Glob); T bilirubin (TBIL); Urea (BUN); Albumin/Globulin omjer (A\_G); Fosfati (PHOS); Ukupni proteini (TP); Ukupni kolesterol(TC). Statistička značajnost ( $p < 0.05$ ) i post hoc usporedba grupa prikazane su u zadnja dva stupca.

## 9. POPIS SHEMA

Shema 1. Stvaranje ionske veze između negativno nabijenog tetraedra aluminija na površini zeolita klinoptilolita. Ionska veza može nastati u interakciji sa kationom bilo kojeg metala, molekulama s dipolnim momentom te vodikovim kationom.

## 10. POPIS SLIKA

Slika 1. Nastajanje zeolitne strukture. (Liu., 2021.)

Slika 2. Freiherr Axel Frederick Cronstedt (1722-1765) (desno) i zeolitna struktura (lijevo). Preuzeto s web stranice: <https://www.flickr.com/photos/108033873@N02/16083401351>, 8. siječanj 2024.

Slika 3. Prikaz formiranja kristalne (alumosilikatne) rešetke klinoptilolita.



Slika 4. Vrsta i položaj kanala i šupljina u strukturi klinoptilolita (Rodríguez et al., 2022)

Slika 5. Kationska mjesta M1, M2, M3 i M4 u A i B kanalima klinoptilolita prema Koyama i Takeuchi modelu gledano duž [001] ( $a' = a \sin\beta$ ). Preuzeto iz (Rodríguez et al., 2022.)

Slika 6. Struktura sintetskog zeolita A. Zatvoreni krugovi, otvoreni krugovi i oni s točkama prikazuju atome Si, O i Al. ( Nakano i Nozue., 2007.)

Slika 7. Molekula metformin hidroklorida

Slika 8. Ključni procesi uključeni u razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa koji se aktiviraju djelovanjem perzistentnih stresora.

Slika 9. Supernatant suspenzije zeolita A u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16% (panel A), 16 % (panel B), 16,96% (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.

Slika 10. Supernatant suspenzije TMAZ u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x

Slika 11. Supernatant suspenzije PMA u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.

Slika 12. Supernatant suspenzije PMAO<sub>2</sub> u mQ H<sub>2</sub>O iz dekantirane frakcije (panel A), frakcije 4000 rpm (panel B), frakcije 14000 rpm (panel C) i frakcije 140000 rpm (panel D). Prosječni maseni postotak Si u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16 % (panel A), 16 % (panel B), 16,96 % (panel C) i 12 % (panel D). Postotak Al u formiranim kristalima ili malim česticama zeolita u frakcijama bio je 16,62 % (panel A), 1,4 % (panel B), 0,22 % (panel C) i 2,91 % (panel D). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM Jeol JSM-7800F. Povećanje 10000x.

Slika 13. Usporedba izgleda površina ispitanih zeolita A, TMAZ, PMA i PMAO2 u krutim suhim uzorcima i talozima dekantiranih uzoraka iz suspenzija mQ vode. Slike krutih uzoraka su snimljene uz pomoć elektronskog mikroskopa SEM QUANTA FEG 250 FEI (povećanje 30000x). Slike dekantiranih taloga snimljene su uz pomoć elektronskog mikroskopa JEOL JSM-7800F. Povećanje 10000x.

Slika 14. SEM slike krutog zeolita A (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

Slika 15. SEM slike krutog zeolita TMAZ (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

Slika 16. SEM slike krutog zeolita PMA (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

Slika 17. SEM slike krutog zeolita PMAO2 (panel A), supernatanta nakon centrifugiranja suspenzije pri 4000 rpm u otopini D-glukoze pri 40 g/L (panel B) i talog nakon centrifugiranja od 4000 rpm suspenzije zeolita u D otopini glukoze pri 40 g/L (panel C). Slike su dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa Scanning Electron Mikroskop SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 5000x ili 6000x.

Slika 18. Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate ZA u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H2O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.

Slika 19. Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate TMAZ u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H2O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM

QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD).  
Povećanje 3000x ili 6000x.

Slika 20. Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate PMA u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.

Slika 21. Prikaz slika elektronske mikroskopije za precipitate PMAO<sub>2</sub> u otopini D-glukoze pri 40 g/L u mQ H<sub>2</sub>O (panel A), u modelnoj otopini želuca (pH = 1,94) (panel B) i modelnoj otopini crijeva (pH = 5,7) (panel C) nakon centrifugiranja suspenzije zeolita pri 4000 rpm. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA FEG 250 FEI, Low Vacuum SE detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD). Povećanje 6000x.

Slika 22. Razine D-glukoze u krvi miševa izmjerene u mmol/L u istovremenom tretmanu PMA-zeolit + D-glukoza te predtretmanu s PMA-zeolitom i naknadnom tretmanu s D-glukozom. Rezultati su prikazani kao koncentracije razina D-glukoze u mmol/L u krvi izmjereno nakon 15 min, 30 min, 60 min i 120 min. Statistički značajne razlike (označeno zvjezdicom \*) u koncentraciji D-glukoze u krvi miševa također su utvrđene usporedbom pozitivne kontrole tretirane s D-glukozom sa negativnom kontrolom i skupinom životinja tretiranom samo s PMA-zeolitom ( $p > 0,05$ ).

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Rumenka Markoška

Adresa: Put Sv. Karla 53, Okrug Gornji ,Čiovo

Država: Republika Hrvatska

Telefon: 0953776446

E-mail: [m.rumenka@yahoo.com](mailto:m.rumenka@yahoo.com)

Mjesto i datum rođenja: Struga, R. Makedonija, 23.08.1962.

### OBRAZOVANJE

Razdoblje: 1981-1986

Institucija: Univerzitet Sv. Kiril i Metodij, Prirodoslovni fakultet, Institut za kemiju, Skopje, R. Makedonija

Zvanje: kemijski inženjer; profesor kemije

Razdoblje 2016 –

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju (od 2023 Fakultet za biotehnologiju), Rijeka, R. Hrvatska

Doktorski studij „Medicinska kemija“

### RADNO ISKUSTVO

Razdoblje: 1987-1991

Poslodavac: Tvornica automobila Heroj Toza Dragovic, Ohrid, R. Makedonija

Radno mjesto: Načelnik proizvodnje ogledala za automobila i odgovorni kemičar u stanici za pročišćavanje otpadnih voda

Razdoblje: 1991-2000

Poslodavac: Srednja kemijsko tehnološka škola Niko Nestor, Struga, R. Makedonija

Radno mjesto: Profesor fizikalne kemije, profesor organske kemije i biokemije

Razdoblje: 2000 - 2016

Poslodavac: Gimnazija Taki Daskalo, Bitola, R. Makedonija

Radno mjesto: Profesor kemije

### DODATNA ZNANJA

Strani jezici:

Engleski jezik u govoru i pismu

Grčki jezik u govoru i pismu

Hrvatski jezik razina C2